FONDAZIONE TELETHON

XXII CONVENTION SCIENTIFICA

16-19 MARZO 2025
RIMINI - PALACONGRESSI

Fondazione Telethon

XXII SCIENTIFIC CONVENTION

VIII convegno delle Associazioni in Rete di Fondazione Telethon

VI Convegno Clinico Ricerca Neuromuscolare

RIMINI - PALACONGRESSI
16-19 marzo 2025

Front cover – Two smiles, one hope
Six-year-old Mattia has Wilson's disease, a radiant smile, and a new friend: researcher Pasquale Piccolo, who leads a team at the Telethon Institute of Genetics and Medicine (Tigem) focused on gene therapy for the liver, aiming to combat Mattia's disease.

Immagine di copertina – Due sorrisi, una speranza
Mattia, sei anni, ha la malattia di Wilson, un sorriso contagioso e un nuovo amico: il ricercatore Pasquale Piccolo, che all'Istituto Telethon di Genetica e Medicina (Tigem) guida un gruppo di lavoro sulla terapia genica diretta al fegato, per combattere per esempio la malattia di Mattia.

Grafica e stampa / Design and print: Gattinoni & Co Srl
12 marzo 2025 / March 12, 2025

RINGRAZIAMENTI
ACKNOWLEDGEMENTS

**“Un buon esempio non è quello che insegniamo agli altri,
ma quello che fanno gli altri con il nostro esempio”**
Nelson Mandela

Desideriamo esprimere un sincero ringraziamento a tutti gli organizzatori, sostenitori e partecipanti,
che hanno reso possibile questa XXII Convention di Fondazione Telethon ETS.
Il lavoro dei ricercatori, costante e instancabile, è un esempio di come l’impegno possa generare risultati tangibili,
costruendo un futuro migliore per le persone con malattie genetiche rare, che con speranza attendono risposte,
vigilando sul loro operato.

Grazie di cuore a tutti per il vostro prezioso contributo e le vostre testimonianze.

**“A good example is not what is taught to others,
but what others do with our example”**
Nelson Mandela

We would like to express our sincere thanks to all the organizers, supporters, and participants who made this
XXII Convention of the Telethon Foundation ETS possible.
The work of the researchers, constant and tireless, is an example of how commitment can generate tangible
results, building a better future for people with rare genetic diseases, who, with hope, await answers, closely
following the progress of their work.

A heartfelt thank you to everyone for your valuable contribution and your testimonies.

SPONSORS

PLATINUM

EUROCLONE SPA
NEGEDIA SRL
PRODOTTI GIANNI SRL special thanks for providing notepads
S.I.A.L. SRL

GOLD

AHSI SPA
Bio-Rad Laboratories S.R.L.
Biosigma S.p.A
GenScript Biotech
MERCK LIFE SCIENCE KGaA
Carl Zeiss SpA con socio unico Research Microscopy Solutions
QIAGEN SRL
SOL SPA
VODEN MEDICAL INSTRUMENTS SPA
Promega Italia s.r.l.
CAMPOVERDE S.R.L.
PHC Europe B.V.
V.W.R International S.r.l /Avantor
SARSTEDT Srl
Anemocyte S.r.l.
Nuova Genetica Italiana

SILVER

CHARLES RIVER LABORATORIES ITALIA
DBA Italia s.r.l.
EUROFINS GENOMICS ITALY SRL
GVS S.p.A.
LGC Standards S.r.L.
Macrogen Europe BV
Miltenyi Biotec Srl
TEMA RICERCA s.r.l.
RESNOVA special thanks for providing the congress bags
TWIN HELIX SRL
Aurogene Srl
CARLO ERBA Reagents srl
Cyanagen S.r.l.
Mettler-Toledo S.p.A.
TEBU-BIO SRL
Starlab S.r.l
CLINISCIENCES
Life Technologies Italia
Thermo Fisher Scientific Milano S.r.l.
LI-COR Biosciences GmbH
Media System Lab Srl special thanks for providing the badge lanyards
MedChemExpress special thanks for providing pens
BECKMAN COULTER FRANCE SAS
Revvity Italia SpA

RINGRAZIAMENTI

Institutions & Partners

Fondazione Telethon ETS would like to thank **Regione Emilia Romagna and APT** servizi for their generous economic contribution and hospitality.

Fondazione Telethon ETS acknowledges the precious professional collaboration of the **Gattinoni Events team** and **Rimini Palacongressi crew**.

Scientific Board

Fondazione Telethon ETS would like to thank the **Scientific Board members**
for their invaluable support and contribution to the design of the scientific program

Laura Cancedda
Italian Institute of Technology (Genoa)

Anna Cereseto
University of Trento (Povo, Trento)

Andrea Ditadi
San Raffaele - Telethon Institute of Gene Therapy (Milan)

Maria Pennuto
University of Padua and VIMM (Padua)

Leopoldo Staiano
Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli, Naples)

Milena Vitale
Fondazione Telethon ETS

Convention Team

A special thanks to
The Fondazione Telethon Convention Team
Alessandra Camerini, Andrea Paone, Arianna Plebani, Aurora De Rosa, Danila Baldessari, Giorgia Crimi, Laura Romano and Milena Vitale.

VI Convegno Clinico Neuromuscolare 8

VIII Convegno delle Associazioni in Rete 16

XXII Scientific Convention 24

FONDAZIONE Telethon

VI CONVEGNO CLINICO NEUROMUSCOLARE

Domenica 16 Marzo 2025 | *Sala del Tempio*

11.00 – 14.00 — *Accredito partecipanti*

14.00 – 14.30 — **Benvenuto ed apertura dei lavori**
Omero Toso, *Fondazione Telethon ETS*
Vincenzo Nigro, *Associazione Italiana di Miologia (AIM)*
Chiara Briani, *Associazione Italiana per lo studio del Sistema Nervoso Periferico (ASNP)*
Stefania Pedroni, *Unione Italiana Lotta alla Distrofia Muscolare (UILDM)*

14.30 – 15.00 — **Lo screening neonatale, diagnosi precoce**
Francesco Danilo Tiziano, *Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Gemelli, Roma*

15.00 – 15.30 — **Esplorando l'ecosistema dei PROMs:**
Un viaggio virtuale attraverso l'app ERN EURO-NMD, PROMMY
Michelangelo Mancuso, *Università di Pisa*

15.30 – 16.15 — **Progressi trasformativi nel trattamento neuromuscolare: Next Generation Therapies**
Giacomo P. Comi
Università di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico

16.15 – 16.45 — *Coffee Break (Foyer della Domus)*

16.45 – 18.45 — **I Progetti del Bando Telethon-UILDM 2023 e 2024**
Presentazione dei progetti e discussione

Standardizzazione di procedure operative e ricerca di misure cliniche quantificabili nella distrofia miotonica di tipo 1, in preparazione alle sperimentazioni cliniche farmacologiche
Valeria Sansone, *Centro Clinico NeMO, sede di Milano*

La salute dell'osso nei pazienti adulti con distrofia muscolare di Duchenne: indagine su osteoporosi, fratture e il loro trattamento (coord. Chiara Panicucci)
Marina Pedemonte, *Istituto Giannina Gaslini, IRCCS, Genova*

Storia naturale e biomarcatori nella Distrofia Muscolare facio-scapolo-omerale
Massimiliano Filosto, *Centro Clinico NeMO, sede di Brescia*

Sviluppo di modelli di intelligenza artificiale predittivi di progressione clinica nella distrofia muscolare facio-scapolo-omerale: lo studio DEAL-FSHD (coord. Mauro Monforte)
Eleonora Torchia, *Università Cattolica Del Sacro Cuore, Roma*

La progressione respiratoria in pazienti adulti con distrofia muscolare di Duchenne – storia naturale, identificazione di biomarcatori e creazione di un algoritmo predittivo
Federica Trucco, *Istituto Giannina Gaslini - IRCCS, Genova*

Transizione all'età adulta nelle persone con distrofia muscolare: meccanismi di cognizione sociale, adattamento psico-sociale, salute mentale e strategie di adattamento
Maria Grazia D'Angelo, *Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea - IRCC, sede di Bosisio Parini*

La paura di cadere nelle persone con distrofia muscolare: indagine del fenomeno e approccio riabilitativo multidisciplinare per il trattamento
Valentina Varalta, *Università di Verona*

Caratterizzazione della storia naturale dei pazienti italiani affetti da LAMA2-RD e identificazione di nuovi biomarcatori di malattia
Alberto Zambon, *Università Vita Salute San Raffaele, Milano*

18.45 – 19.30 — *Discussione*
Moderatore: **Danila Baldessari**, *Fondazione Telethon ETS*

VI CONVEGNO CLINICO NEUROMUSCOLARE

Lunedì 17 Marzo 2025 | *Sala del Tempio*

9.00 – 9.30	**Meccanismi immunologici e nuovi bersagli terapeutici nel nervo periferico** **Chiara Briani**, *Azienda Ospedale - Università di Padova*
9.30 – 10.00	**Meccanismi immunologici e nuovi bersagli terapeutici nella miastenia grave** **Lorenzo Maggi**, *Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta - IRCCS, Milano*
10.00 – 10.30	**Gli standard di cura: come traslare dalla clinica alla ricerca** **Valeria Sansone**, *Centro Clinico NeMO, sede di Milano*
10.30 – 11.00	*Coffee Break (Foyer della Domus)*
11.00 – 11.30	**Il follow-up clinico nell'era della tecnologia digitale** **Luigi Lavorgna**, *Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli*
11.30 – 12.30	*Discussione e Conclusioni* Moderatori: **Chiara Briani** *(ASNP)*, Vincenzo Nigro *(AIM)*, Danila Baldessari *(Fondazione Telethon ETS)*
12.30 – 13.30	*Light lunch (Foyer della Domus)*

LO SCREENING NEONATALE, DIAGNOSI PRECOCE

Francesco Danilo Tiziano
Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Gemelli, Roma

L'inclusione di condizioni patologiche tra quelle soggette a screening neonatale è stata sinora regolata sulla base dei criteri di Wilson e Jungner della WHO, pubblicati per la prima volta nel 1968 e rivalutati nel 2008. Tuttavia quei criteri sono stati pensati e disegnati in un contesto in cui la diagnosi precoce veniva effettuata sulla base di test metabolici o biochimici, rispetto ai quali il test genetico (in tempi più recenti e ove indicato e disponibile) ha significato di conferma diagnostica e di definizione del rischio di ricorrenza per la coppia. La sempre più diffusa disponibilità di piattaforme di analisi genomica high-throughput e la riduzione dei costi di laboratorio per campione offrono l'opportunità di ampliare la pletora di condizioni diagnosticabili. D'altro canto, hanno aperto il vaso di Pandora di nuovi quesiti che devono trovare risposta, prima dell'ampliamento dei pannelli di screening neonatale. In particolare, vi è la necessità di trovare risposte 1) alla disponibilità limitata di trattamenti efficaci per la maggior parte delle condizioni geneticamente determinate, 2) alla gestione del burden emotivo per la famiglia derivante dalla diagnosi di malattia rara in un neonato clinicamente sano, 3) all'approccio alle varianti genetiche di significato clinico incerto, 4) alla presa in carico del "paziente" e della famiglia, 5) alla mancanza di standard di cura adeguati per le singole condizioni, 6) alla mancanza di un quadro normativo adeguato che consenta di garantire l'accesso alla diagnosi precoce a tutti i cittadini, 7) alla sostenibilità economica dei trattamenti innovativi, 8) alla disponibilità di risorse umane adeguate necessarie alla presa in carico di un numero potenzialmente elevato di nuovi pazienti.
In questo panorama, lo screening neonatale per l'atrofia muscolare spinale (SMA) costituisce il primo esempio virtuoso di diagnosi di malattia rara effettuata mediante test genetico per la quale vi siano trattamenti efficaci e che ha prodotto eccellenti risultati. Verranno però discussi i dati oggi disponibili per altre condizioni candidate all'inclusione nei programmi di screening neonatale e nel conseguente management del paziente e della famiglia.
I prossimi anni dovranno essere dunque utilizzati per trovare risposte efficaci ai quesiti ed alle nuove problematiche che l'implementazione tecnologica sta offrendo ed offrirà nel prossimo futuro.

ESPLORANDO L'ECOSISTEMA DEI PROMS: UN VIAGGIO VIRTUALE ATTRAVERSO L'APP ERN EURO-NMD, PROMMY

Michelangelo Mancuso
Clinica Neurologica Università di Pisa & AOU Pisana, Pisa

I Patient-Reported Outcome Measures (PROMs) costituiscono strumenti di fondamentale importanza per la raccolta del punto di vista dei pazienti sulla propria qualità di vita, sintomi e risposta ai trattamenti. Nel contesto delle malattie neuromuscolari, la rete Europea ERN EURO-NMD sta sviluppando PROMMY, un'innovativa applicazione digitale ideata per ottimizzare la raccolta e l'analisi dei PROMs in tempo reale.
La relazione illustra le prospettive future per una medicina sempre più centrata sul paziente, anche attraverso l'esempio dell'APP PROMMY, in fase di sviluppo, e il suo potenziale ruolo nell'integrazione dei PROMs nella pratica clinica e nella ricerca.

PROGRESSI TRASFORMATIVI NEL TRATTAMENTO NEUROMUSCOLARE: NEXT GENERATION THERAPIES

Giacomo Comi
Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Le malattie neuromuscolari rappresentano una sfida significativa in ambito medico, ma gli ultimi sviluppi nelle terapie di nuova generazione stanno rivoluzionando le prospettive di trattamento. Questo lavoro esamina i progressi più recenti nelle terapie innovative per le patologie neuromuscolari, con particolare attenzione alle tecnologie emergenti come la terapia genica basata su vettori virali AAV, l'editing genomico CRISPR/Cas9 e gli approcci di RNA-targeting. La ricerca analizza i risultati di studi clinici recenti che dimostrano l'efficacia di queste strategie terapeutiche, evidenziando in particolare i successi ottenuti nel trattamento della distrofia muscolare di Duchenne e dell'atrofia muscolare spinale. Vengono inoltre discusse le sfide ancora da superare, come l'ottimizzazione della delivery dei vettori, la risposta immunitaria e la necessità di terapie personalizzate. I dati presentati suggeriscono che l'integrazione di questi approcci innovativi con le terapie convenzionali potrebbe portare a un significativo miglioramento della qualità di vita dei pazienti. La ricerca sottolinea l'importanza di continuare gli investimenti in questo campo promettente, evidenziando come la convergenza tra genomica, biotecnologia e medicina personalizzata stia aprendo nuove frontiere nel trattamento delle patologie neuromuscolari.

I PROGETTI DEL BANDO TELETHON-UILDM 2023 E 2024

STANDARDIZZAZIONE DI PROCEDURE OPERATIVE E RICERCA DI MISURE CLINICHE QUANTIFICABILI NELLA DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1, IN PREPARAZIONE ALLE SPERIMENTAZIONI CLINICHE FARMACOLOGICHE

Valeria Sansone
Centro Clinico NeMO, sede di Milano

Sono sempre di più le sperimentazioni farmacologiche nell'ambito della ricerca clinica per i pazienti con la distrofia miotonica. Il successo di questi farmaci dipende non solo dalla loro sicurezza ed efficacia, ma anche dalla possibilità di monitorarne al meglio l'effetto sul maggior numero di pazienti possibile. Per valutare l'effetto di un farmaco occorre conoscere il potenziale impatto su un certo organo o sintomo in assenza di intervento: questi dati di storia naturale, pur essendo molto importanti, sono ancora piuttosto carenti per la distrofia miotonica di tipo 1 (DM1), soprattutto riguardo gli effetti della malattia su comparti diversi dal muscolo scheletrico. Grazie a questo progetto si potranno raccogliere informazioni sull'impatto della DM1 nel tempo a carico di diversi organi: in questo modo, si potrà meglio comprendere l'effetto di un farmaco, per esempio sul muscolo o su un altro organo, avendo a disposizione dati di confronto senza trattamento. L'altro fattore limitante per le sperimentazioni farmacologiche future è la carenza di spazi e risorse nelle Unità di Ricerca Clinica ad oggi disponibili: sono quindi pochi i pazienti che riescono ad accedere alle sperimentazioni. Spesso i pazienti devono viaggiare per lunghi tragitti, dormire lontano da casa, aumentando quindi la fatica già presente, il carico di malattia per loro stessi e le loro famiglie. Questo studio permetterà anche di migliorare la rete della ricerca clinica farmacologica, così da offrire accesso alle sperimentazioni cliniche a un numero crescente di persone.

Progetto: GUP23002

Coordinatore: **Valeria Sansone** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Milano)*

Partners: **Laura Antonaci** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Roma);* **Michela Coccia** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Ancona);* **Massimiliano Filosto** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Brescia);* **Giuseppe Limongelli** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Napoli);* **Fabrizio Rao** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Arenzano);* **Riccardo Zuccarino** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Trento)*

LA SALUTE DELL'OSSO NEI PAZIENTI ADULTI CON DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE: INDAGINE SU OSTEOPOROSI, FRATTURE E IL LORO TRATTAMENTO

Marina Pedemonte
Istituto Giannina Gaslini - IRCCS, Genova

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia genetica muscolare legata al cromosoma X che conduce alla perdita della capacità di camminare nella prima adolescenza, all'insufficienza e alla cardiomiopatia dilatativa, con un impatto significativo su qualità e aspettativa di vita. Nell'ultimo decennio, grazie al miglioramento degli standard di cura e della gestione delle complicanze cardiorespiratorie, l'aspettativa di vita di questi pazienti è cresciuta, arrivando fino ai quarant'anni. In questo scenario, le complicanze ossee, come l'osteoporosi e le fratture da fragilità, hanno un impatto significativo sulla qualità della vita e persino sulla mortalità, con forti implicazioni sociali ed economiche. Pertanto, in questo progetto - che coinvolge diversi centri italiani appartenenti al DMD Network - proponiamo di definire lo stato di salute ossea dei pazienti con DMD in età adulta. Riteniamo che la generazione di dati trasversali sull'osteoporosi e sulle fratture da fragilità in questi pazienti aiuterà i clinici a definire programmi di prevenzione primaria e studi clinici mirati alla protezione dell'osso, con benefici sia in termini d di qualità di vita dei pazienti sia di riduzione dei costi sociali ed economici legati all'osteoporosi.

Progetto: GUP23005

Coordinatore: **Chiara Panicucci** *(Istituto Giannina Gaslini - Irccs, Genova)*

Partners: **Emilio Albamonte** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Milano);* **Roberta Battini** *(Fondazione Stella Maris – IRCCS, Calambrone);* **Luca Bello** *(Azienda Ospedale-Università Padova);* **Michela Catteruccia** *(Ospedale Pediatrico Bambino Gesù – IRCCS, Roma);* **Massimo Cordini** *(I.R.C.C.S. Eugenio Medea - Associazione La Nostra Famiglia - Sede di Conegliano);* **Eleonora Diella** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea – IRCCS, Bosisio Parini);* **Massimiliano Filosto** *(Università degli Studi di Brescia);* **Melania Giannotta** *(Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - IRCCS);* **Diego Lopergolo** *(Università di Siena);* **Lorenzo Maggi** *(Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta – IRCCS, Milano);* **Sonia Messina** *(Università di Messina);* **Vincenzo Nigro** *(Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli);* **Concetta Palermo** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma);* **Gabriele Siciliano** *(Università di Pisa)*

STORIA NATURALE E BIOMARCATORI NELLA DISTROFIA MUSCOLARE FACIO-SCAPOLO-OMERALE

Massimiliano Filosto
Centro Clinico NeMO, sede di Brescia

Il progetto mira a raccogliere informazioni sugli aspetti clinici di un ampio gruppo di pazienti con distrofia muscolare facio-scapolo-omerale (FSHD) grazie a uno strumento digitale già esistente, il Registro Italiano per l'FSHD. In particolare, tutti i centri italiani coinvolti nella cura di questi pazienti raccoglieranno informazioni sulle caratteristiche cliniche dei loro assistiti utilizzando uno strumento per la classificazione precedentemente sviluppato dal gruppo italiano per l'FSHD, la scheda Comprehensive Clinical Evaluation Form (CCEF). Inoltre, i pazienti saranno completamente caratterizzati dal punto divista genetico con un protocollo condiviso, costruito con lo scopo di valutare possibili fattori modificatori. Infine, verranno studiati marker infiammatori nel sangue periferico potenzialmente correlabili alla gravità della malattia, alle caratteristiche del decorso clinico e agli aspetti molecolari genetici ed epigenetici.

Progetto: GUP24010

Coordinatore: **Massimiliano Filosto** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Brescia)*

Partners: **Elena Carraro** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Milano);* **Michela Coccia** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Ancona);* **Eleonora Diella** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea – IRCCS, Bosisio Parini);* **Antonio Di Muzio** *(Asl 02 Lanciano Vasto Chieti);* **Yuri Matteo Falzone** *(Università Vita Salute San Raffaele; Milano);* **Matteo Garibaldi** *(Università di Roma la Sapienza);* **Emiliano Giardina** *(Fondazione Santa Lucia – IRCCS, Roma);* **Marina Grandis** *(Università di Genova);* **Lorenzo Maggi** *(Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta – IRCCS; Milano);* **Roberto Massa** *(Università di Roma Tor Vergata);* **Mauro Monforte** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma);* **Elena Pegoraro** *(Azienda Ospedale-Università Padova);* **Loris Poli** *(Spedali Civili di Brescia - ASST);* **Sabrina Ravaglia** *(Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino – IRCCS, Pavia);* **Giulia Ricci** *(Università di Pisa);* **Carmelo Rodolico** *(Università di Messina);* **Lucia Ruggiero** *(Università di Napoli Federico II);* **Liliana Vercelli** *(Università di Torino);* **Maria Lucia Valentino** *(Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - IRCCS)*

SVILUPPO DI MODELLI DI INTELLIGENZA ARTIFICIALE PREDITTIVI DI PROGRESSIONE CLINICA NELLA DISTROFIA MUSCOLARE FACIO-SCAPOLO-OMERALE: LO STUDIO DEAL-FSHD

Eleonora Torchia
Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma

La possibilità di prevedere la progressione della malattia nella distrofia muscolare facio-scapolo-omerale (FSHD) è al momento molto limitata. La presenza di lesioni iper-intense nelle immagini di risonanza magnetica muscolare acquisite con sequenze short-tau inversion recovery (STIR) è stata collegata a un rischio più elevato di aumento del contenuto di grasso a livello del singolo muscolo dopo 1 anno, sebbene con variabilità ampia e inspiegabile. Nel presente progetto utilizzeremo la radiomica, una metodica tecnologicamente innovativa applicata alle immagini mediche mirata alla scoperta di caratteristiche non altrimenti identificabili con la sola analisi visiva. Attraverso questa tecnica, puntiamo a caratterizzare in modo completo tutti i muscoli e le lesioni STIR-positive in una coorte longitudinale di pazienti con FSHD che si sono sottoposti alla risonanza magnetica muscolare. Questo approccio potrebbe consentire l'identificazione di nuovi biomarcatori utilizzabili per una migliore prognosi e potenzialmente sfruttabili come endpoint surrogati negli studi clinici. Integreremo inoltre queste nuove informazioni con dati clinici e genetici e applicheremo algoritmi di intelligenza artificiale per prevedere in quali muscoli ci sarà una maggiore probabilità di progressione della malattia, aprendo così nuove opportunità per personalizzare gli interventi medici e riabilitativi.

Progetto: GUP24001

Coordinatore: **Mauro Monforte** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma)*

Partner: **Luca Boldrini** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma)*

LA PROGRESSIONE RESPIRATORIA IN PAZIENTI ADULTI CON DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE – STORIA NATURALE, IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI E CREAZIONE DI UN ALGORITMO PREDITTIVO

Federica Trucco
Istituto Giannina Gaslini - IRCCS, Genova

Il prolungamento dell'aspettativa di vita nei pazienti con distrofia muscolare di Duchenne conseguente all'implementazione degli standard di cura ha fatto emergere nuove esigenze sanitarie complesse, quale per esempio la progressione verso l'insufficienza respiratoria cronica (IR). Oltre il 70% dei pazienti DMD necessita infatti di ventilazione non invasiva (NIV) entro i 22 anni.
L'insufficienza respiratoria è una delle principali cause di mortalità, ma la sua caratterizzazione e progressione restano ancora un campo inesplorato. La mancanza di dati solidi di storia naturale limita la disponibilità di trial clinici. Ad oggi non è ancora noto quanto e come la severità della progressione nelle funzioni motoria e respiratoria, così come mutazioni in specifici loci del gene DMD, contribuiscano allo sviluppo di insufficienza respiratoria.
Questo progetto mira a definire la progressione respiratoria nei pazienti DMD adulti al fine di comprenderne i principali meccanismi causali e identificare biomarcatori associati a una più o mento severa progressione. Tutte queste informazioni combinate permetteranno lo sviluppo di un nuovo algoritmo predittivo.
Gli obiettivi specifici del progetto sono: descrivere la progressione respiratoria nei pazienti DMD dall'infanzia all'età adulta; comprendere il contributo che specifiche variabili cliniche e genetiche hanno sullo sviluppo dell' insufficienza respiratoria al fine di validare nuovi strumenti di valutazione; stratificare la gravità del coinvolgimento respiratorio dei pazienti sulla base di variabili cliniche e genetiche; identificare biomarcatori genetici e biochimici di una più o meno severa progressione verso l'insufficienza respiratoria; progettare un modello di algoritmo per prevedere il rischio specifico di ciascun paziente.
Questo progetto durerà tre anni e coinvolgerà 13 centri italiani specializzati nella diagnosi e cura delle patologie neuromuscolari. Verranno inclusi pazienti DMD di età superiore a 18 anni, non coinvolti in studi interventistici. Per ogni paziente verrà registrata l'età e lo stadio di patologia in cui si è sviluppata insufficienza respiratoria con necessità di NIV. Questo dato sarà correlato con i dati clinici e genetici raccolti retrospettivamente e con le valutazioni della funzione motoria, respiratoria e con i risultati degli studi del sonno condotti in modo prospettico. Si studieranno geni modificatori e marcatori di infiammazione nel sangue e si valideranno nuovi strumenti diagnostici.
I risultati attesi forniranno nuovi approcci clinici e traslazionali per gli adulti con DMD, applicabili ad altre distrofinopatie, al fine di includere nuovi strumenti di valutazione dell'insufficienza respiratoria e di fornire dati di confronto per futuri trial clinici.

Progetto: GUP24005

Coordinatore: **Federica Trucco** (*Università di Genova)*

Partners: **Emilio Albamonte** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Milano);* **Guja Astrea** *(Fondazione Stella Maris – IRCCS, Calambrone);* **Luca Bello** *(Azienda Ospedale-Università Padova);* **Angela Berardinelli** *(Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino – IRCCS, Pavia);* **Silvia Bonanno** *(Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta – IRCCS, Milano);* **Daniela Leone** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma);* **Tiziana Mongini** *(Università di Torino);* **Riccardo Riboni** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea – IRCCS, Bosisio Parini);* **Giulia Ricci** *(Università di Pisa);* **Maria Sframeli** *(Azienda Ospedaliera Policlinico Universitario "G. Martino", Messina);* **Maria Lucia Valentino** *(Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - IRCCS);* **Alberto Zambon** *(Università Vita Salute San Raffaele, Milano)*

TRANSIZIONE ALL'ETÀ ADULTA NELLE PERSONE CON DISTROFIA MUSCOLARE: MECCANISMI DI COGNIZIONE SOCIALE, ADATTAMENTO PSICO-SOCIALE, SALUTE MENTALE E STRATEGIE DI ADATTAMENTO

Maria Grazia D'Angelo
Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea - IRCC, sede di Bosisio Parini

I progressi nella presa in carico e la cura dei pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD) hanno aumentato l'aspettativa di vita degli individui (Kieny 2013) così come la complessità dei loro bisogni fisici, emotivi e sociali (Pousada 2018, Magliano 2015). Gli adolescenti possono passare all'età adulta con disturbi dello sviluppo neurologico, disabilità intellettiva e meccanismi di cognizione sociale alterati. La risposta degli individui a potenziali fattori di stress può essere diversa e cambiare nel tempo, suggerendo variazioni intrapersonali e interpersonali nell'adattamento psicosociale e nelle strategie di coping (Magliano 2013, Aho 2015, Pater 2023).
Attraverso il lavoro collaborativo di 18 centri di assistenza terziaria per i disturbi neuromuscolari e 2 unità di ricerca, raccoglieremo dati da un ampio gruppo di soggetti e dei loro caregiver (>250). Il nostro obiettivo è: 1) delineare l'adattamento psicosociale, la salute mentale e le strategie di coping; 2) testare i meccanismi di cognizione sociale con test neuropsicologici standardizzati e, in un sottocampione, l'elaborazione sociale in contesti ecologici tramite paradigmi di realtà virtuale 3) indagare l'immagine corporea e la sua relazione con lo stato di salute e il benessere mentale 4) esplorare la correlazione tra condizioni mediche, cognizione sociale, adattamento psicosociale, salute mentale e strategie di coping.
I risultati potranno consentire di raggruppare gli individui in base ai diversi livelli di adattamento psicosociale, descrivere i fattori sottostanti e identificare le risorse personali, relazionali e ambientali che necessitano di essere sostenute o sviluppate.

Progetto: GUP24011

Coordinatore: **Maria Grazia D'Angelo** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea – IRCCS, Bosisio Parini)*

Partners: **Angela Berardinelli** *(Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino – IRCCS, Pavia);* **Roberta Biundo** *(Azienda Ospedale-Università Padova);* **Noemi Brolatti** *(Istituto Giannina Gaslini – IRCCS, Genova);* **Jacopo Casiraghi** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Milano);* **Michela Coccia** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Ancona);* **Massimo Cordini** *(I.R.C.C.S. Eugenio Medea - Associazione La Nostra Famiglia - Sede di Conegliano);* **Paola Cristofani** *(Fondazione Stella Maris – IRCCS, Calambrone);* **Antonella Delle Fave** *(Università degli Studi di Milano Statale);* **Lorenzo Maggi** *(Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta – IRCCS, Milano);* **Francesca Magri** *(Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milano);* **Eugenio Maria Mercuri** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma);* **Tiziana Mongini** *(Università di Torino);* **Stefano Previtali** *(Università Vita Salute San Raffaele, Milano);* **Giulia Ricci** *(Università di Pisa);* **Barbara Risi** *(Centro Clinico NeMO, Sede di Brescia);* **Maria Sframeli** *(Azienda Ospedaliera Policlinico Universitario "G. Martino", Messina);* **Antonio Trabacca** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea - IRCCS, Ospedale di Riabilitazione - Sede di Brindisi);* **Cosimo Urgesi** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea - IRCCS, Sede Pasian di Prato);* **Maria Lucia Valentino** *(Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - IRCCS)*

LA PAURA DI CADERE NELLE PERSONE CON DISTROFIA MUSCOLARE: INDAGINE DEL FENOMENO E APPROCCIO RIABILITATIVO MULTIDISCIPLINARE PER IL TRATTAMENTO

Valentina Varalta
Università di Verona

Questo studio clinico è focalizzato su un aspetto ancora poco studiato ma di grande impatto sui pazienti con distrofia muscolare: le cadute e la relativa paura di cadere. La paura di cadere è un fenomeno

noto nella popolazione che presenta un maggior rischio di caduta rispetto alla popolazione generale: adottando comportamenti per evitare di cadere, questi pazienti rischiano di andare incontro a una progressiva riduzione delle abilità funzionali e delle attività con inevitabili ripercussioni sulla qualità della vita. Questo mira a quantificare la prevalenza della paura di cadere in questa popolazione di pazienti e a identificare eventuali determinanti motori, psicologici e cognitivi che predispongono a questo comportamento. Inoltre, è stato sviluppato un protocollo di trattamento per intervenire sulla paura di cadere, sia con metodi indiretti come il miglioramento delle abilità funzionali mediante la sola riabilitazione motoria, sia con tecniche psico-terapeutiche dirette al trattamento della paura di cadere, tra cui la terapia cognitivo-comportamentale. Infine, per ottimizzare l'accessibilità del paziente allo studio, le valutazioni e i trattamenti sono stati ideati per poter essere eseguiti anche in ambiente domiciliare, concordemente con le possibilità motorie e logistiche del paziente. Mediante questo approccio innovativo, combinato e multidisciplinare che coinvolge personale medico, psicologi e fisioterapisti si vuole identificare e trattare la paura di cadere riducendo al minimo il suo impatto sulla funzione e la qualità della vita dei pazienti affetti da distrofia muscolare.

Progetto: GUP24007

Coordinatore: **Valentina Varalta** *(Università di Verona)*

Partners: **Domenico De Grandis** *(Fondazione Speranza Onlus, Verona);* **Nicola Smania** *(Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona)*

CARATTERIZZAZIONE DELLA STORIA NATURALE DEI PAZIENTI ITALIANI AFFETTI DA LAMA2-RD E IDENTIFICAZIONE DI NUOVI BIOMARCATORI DI MALATTIA

Alberto Zambon
Università Vita Salute San Raffaele, Milano

La distrofia muscolare da deficit di laminina (LAMA2-RD) è una malattia genetica causata da mutazioni nel gene LAMA2, che codifica per la componente alfa2 della proteina laminina-211. Le manifestazioni cliniche della LAMA2-RD variano da una grave distrofia muscolare congenita a una forma più lieve di distrofia muscolare tipo cingoli. Nonostante la sua diffusione, mancano studi approfonditi sulla storia naturale della malattia, in particolare in riferimento a pazienti adulti e al coinvolgimento specifico di organi come il cuore o il sistema nervoso periferico. Inoltre, la mancanza di biomarcatori per rilevare la progressione del danno muscolare o la risposta al trattamento rappresenta ancora un ostacolo significativo in previsione di futuri trials clinici. Il nostro studio mira a colmare queste lacune descrivendo la storia naturale della LAMA2-RD in un'ampia coorte di pazienti. Abbiamo diversi obiettivi: comprendere la prevalenza e la gravità del coinvolgimento cardiaco e correlare l'eventuale presenza di cardiomiopatia con età e fenotipo muscolare; esplorare l'importanza dei disturbi respiratori e nutrizionali, della neuropatia periferica e della compromissione cognitiva; perfezionare la classificazione della gravità della malattia per migliorare i criteri di inclusione nei trial clinici; comprendere come la malattia impatti sulla qualità della vita; raccogliere campioni biologici per ricerche future. Si tratterà di uno studio che coinvolgerà 10 centri specializzati e che combinerà la raccolta di dati retrospettivi e prospettici. I pazienti saranno sottoposti a regolari valutazioni. Una risonanza magnetica cardiaca sarà effettuata su una sottopopolazione di pazienti. Attraverso questo studio, miriamo a fornire una panoramica dettagliata della popolazione italiana affetta. Concentrandoci sui pazienti adulti e sul coinvolgimento specifico di organi come il cuore, speriamo di migliorare l'assistenza ai pazienti e la preparazione per i futuri trial clinici.

Progetto: GUP24002

Coordinatore: **Alberto Zambon** *(Università Vita Salute San Raffaele, Milano)*

Partners: **Adele D'Amico** *(Ospedale Pediatrico Bambino Gesù – IRCCS, Roma);* **Alice Decio** *(Associazione La Nostra Famiglia Eugenio Medea – IRCCS, Bosisio Parini);* **Daniela Leone** *(Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma);* **Sonia Messina** *(Università di Messina);* **Isabella Moroni** *(Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta – IRCCS, Milano);* **Chiara Panicucci** *(Istituto Giannina Gaslini – IRCCS, Genova);* **Antonella Pini** *(Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna - IRCCS);* **Federica Ricci** *(Università di Torino);* **Elena Pegoraro** *(Azienda Ospedale-Università Padova)*

MECCANISMI IMMUNOLOGICI E NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI NEL NERVO PERIFERICO

Chiara Briani
Azienda Ospedale - Università di Padova

Gli steroidi e le immunoglobuline (endovena o sottocute) rappresentano da molti anni il trattamento fondamentale delle neuropatie croniche immune-mediate.
Recentemente, sono state sviluppate nuove immunoterapie, come anticorpi monoclonali o farmaci mirati a smorzare selettivamente le risposte immunitarie aberranti.
Due studi in doppio cieco con rituximab, un anticorpo monoclonale anti-CD20 utilizzato principalmente nella neuropatia con anticorpi anti-glicoproteina associata alla mielina (MAG) e nelle paranodopatie autoimmuni, sono stati condotti nella poliradiculoneuropatia demielinizzante infiammatoria cronica (CIDP).
Gli anticorpi contro il recettore Fc neonatale sono stati studiati nella CIDP, con risultati negativi per rozanolixizumab mentre efgartigimod è stato approvato dalla FDA per il trattamento della CIDP, nonostante siano state sollevate alcune preoccupazioni per la pratica clinica quotidiana.
Nella neuropatia da anticorpi anti-MAG, gli inibitori della tirosina chinasi di Bruton (BTK), zanubrutinib e acalabrutinib, sono attualmente in fase di studio come singolo agente o in combinazione con rituximab.

MECCANISMI IMMUNOLOGICI E NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI NELLA MIASTENIA GRAVE

Lorenzo Maggi
Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta - IRCCS, Milano

La Miastenia Gravis (MG) è una rara patologia cronica immunomediata causata da autoanticorpi diretti verso componenti della giunzione neuromuscolare causandone la disfunzione e determinando i sintomi cardine della malattia, ovvero debolezza ed esauribilità muscolare.
La terapia tradizionale della MG prevede terapia sintomatica, terapia a rapida azione come plasmaferesi o immunoglobuline endovena, tuttavia di durata transitoria, timectomia e terapia cronica, quest'ultima principalmente basata sull'utilizzo di immunosoppressori ad ampio spettro. Tuttavia, una quota considerevole di pazienti, circa il 15-20%, mostra un compenso clinico non soddisfacente od effetti collaterali rilevanti con i trattamenti tradizionali. Pertanto, recentemente sono state introdotte terapie innovative, in particolare i farmaci inibitori della cascata del complemento e gli inibitori del recettore Fc neonatale. Tali terapie sono rivolte verso bersagli patologici più specifici e sono caratterizzate da rapida durata d'azione, meno frequenti effetti collaterali e maggiore efficacia rispetto ai tradizionali farmaci immunosoppressori. I trattamenti innovativi rappresentano un notevole passo avanti nel trattamento della MG, determinando un profondo cambiamento dello scenario terapeutico di tale malattia.

GLI STANDARD DI CURA: COME TRASLARE DALLA CLINICA ALLA RICERCA

Valeria Sansone
Centro Clinico NeMO, sede di Milano

Sono disponibili standard di cura per diverse patologie neuromuscolari, finalizzati a guidare la presa in carico dei pazienti attraverso l'utilizzo di scale standardizzate, di esami e di procedure per le quali esistono evidence-based data secondo tempistiche definite nel tempo.
Tuttavia, anche in Centri specializzati e di terzo livello non sempre è possibile implementare gli standard di cura proposti a tutti i livelli ed in tutti i Centri dove afferiscono i pazienti. Molti pazienti partecipano a studi osservazionali che spesso hanno lo scopo di esplorare domini riconosciuti come rilevanti per i pazienti ma per i quali mancano scale e procedure standardizzate. Questa ricerca clinica si discosta dalla pratica clinica, poiché coinvolge misure di natura "esplorativa" che necessitano ancora di "validazione". Inoltre, il tempo necessario per "esplorare" questi diversi domini con scale in fase di validazione o procedure innovative supera spesso quello normalmente allocato nella pratica clinica e le risorse disponibili per ottenere le misure "esplorative", sebbene importanti, non sono sempre sufficienti.
Vengono analizzate le criticità e presentata l'organizzazione di altri Centri a livello internazionale, insieme all'esperienza del Centro Clinico NeMO di Milano, come spunto per come potere traslare gli standard di cura dalla clinica alla ricerca. L'obiettivo è contribuire alla definizione della storia naturale di malattia nel contesto di una ricerca clinica di tipo osservazionale, fondamentale per interpretare in modo più accurato le eventuali modifiche delle traiettorie di andamento in relazione a eventuali interventi farmacologici o interventistici.

IL FOLLOW-UP CLINICO NELL'ERA DELLA TECNOLOGIA DIGITALE

Luigi Lavorgna
Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

Nell'era della tecnologia digitale, il follow-up clinico delle malattie neurologiche e neuromuscolari sta subendo una trasformazione significativa grazie all'introduzione di strumenti avanzati di monitoraggio remoto, intelligenza artificiale e telemedicina. Le tecnologie digitali stanno migliorando l'efficacia della gestione dei pazienti, garantendo un monitoraggio continuo dei parametri motori e funzionali, con una maggiore personalizzazione dei piani terapeutici. Attraverso l'analisi di dati in tempo reale, si delineano nuove prospettive nella diagnosi precoce delle ricadute, nell'adattamento dinamico delle terapie e nel miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

FONDAZIONE Telethon

VIII CONVEGNO DELLE ASSOCIAZIONI IN RETE DI FONDAZIONE TELETHON

LUNEDÌ 17 Marzo 2025

11.00 – 14.00 — *Registrazione dei partecipanti*

12.00 – 14:00 — **Incontri individuali tra Associazioni e Direzione Scientifica di Fondazione Telethon**
(previa prenotazione in fase di registrazione)

14.00 – 15.00 — **SESSIONE PLENARIA - Benvenuto e apertura dei lavori** *Sala Anfiteatro*

15.00 – 15.15* — **Introduzione VIII Convegno delle Associazioni in Rete** *Sala Tempio*
Alessandra Camerini, *Responsabile Relazioni con pazienti e Associazioni di Fondazione Telethon ETS*

15.15 – 16.00* — **Ricerca traslazionale: il percorso dal laboratorio al paziente** *Sala Tempio*
Alberto Auricchio, *Professore Ordinario di Genetica Medica all'Università Federico II di Napoli e Direttore dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM*
Modera: **Annamaria Zaccheddu**, *Content Management team di Fondazione Telethon ETS*

16:00- 16:45* — **La terapia genica di oggi e gli sviluppi di domani** *Sala Tempio*
Alessandro Aiuti, *Professore ordinario di Pediatria Università Vita-Salute San Raffaele, Primario UOC Immunoematologia Pediatrica all'IRCCS San Raffaele e Vice Direttore dell'Istituto TIGET*
Modera: **Valentina Murelli**, *Content Management team di Fondazione Telethon ETS*

16.45 – 17.30* — **Il senso di una ricerca fallita: punti di vista di un ricercatore e di un clinico** *Sala Tempio*
Nicola Brunetti-Pierri, *Professore ordinario di Genetica, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli studi di Napoli Federico II, e Group Leader dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM*
Elena Cattaneo, *Professore Ordinario di Farmacologia, Università degli Studi di Milano e Direttore del "Laboratorio di Biologia delle Cellule Staminali e Farmacologia delle Malattie Neurodegenerative"*
Modera: **Valentina Murelli**, *Content Management team di Fondazione Telethon ETS*

17.30 – 18.00 — *Coffee break* *Sala Della Piazza*

17.30 – 19:30 — **POSTER SESSION: Incontro con i Ricercatori** *Sala della Piazza*
e Incontri individuali tra Associazioni e Direzione Scientifica di Fondazione Telethon
(previa prenotazione in fase di registrazione)

19.30 – 23.00 — **Il Ritmo della Ricerca: Cena romagnola e Galà danzante** *Foyer*
Intrattenimento a cura della Raoul & Swing Orchestra

** collegamento streaming dal sito https://conventionfondazionetelethon.it e trasmissione in diretta su RadioAidel22*

MARTEDÌ 18 Marzo 2025

09:15 – 10:00* **Dalla ricerca di base in laboratorio all'industria** *Sala Tempio*
Michela Milani, *Ricercatrice dell'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica TIGET*
Leopoldo Staiano, *Ricercatore dell'Institute of Genetic and Biomedical Research-IRGB-CNR e Assistente Ricercatore dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM*
Anna Maria Teti, *Ricercatrice e Professore Universitario*
Modera: **Annamaria Zaccheddu**, *Content Management team di Fondazione Telethon ETS*

10:00 – 10:45* **Drug repurposing: quali sono gli ostacoli e come facilitare la transizione dalla scoperta alla pratica clinica?** *Sala Tempio*
Marcello Allegretti, *Direttore Scientifico Dompé Farmaceutici*
Simona Fecarotta, *Medico Specialista Interno in Pediatria presso il Dipartimento Materno-Infantile dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli*
Celeste Scotti, *Direttore Ricerca e Sviluppo di Fondazione Telethon ETS*
Modera: **Valentina Murelli**, *Content Management team di Fondazione Telethon ETS*

10.45 – 11.15 *Coffee break* *Sala della Piazza*

11:15- 12:00* **Logiche del finanziamento alla ricerca: cosa abbiamo imparato insieme in questi anni** *Sala Tempio*
Alessandra Camerini, *Responsabile Relazioni con pazienti e Associazioni di Fondazione Telethon ETS*
Ilaria Villa, *Direttore Generale di Fondazione Telethon ETS*

12.00 – 12.15* **Costruiamo un percorso insieme: i prossimi passi** *Sala Tempio*
Alessandra Camerini, *Responsabile Relazioni con pazienti e Associazioni di Fondazione Telethon ETS*

12.15 – 12.30 **Fotografia di gruppo** *davanti alla Sala Tempio*

12.30 – 14:00 **POSTER SESSION ASSOCIAZIONI IN RETE** *Foyer*

13.00 – 14.15 *Pranzo a buffet - Foyer*

** collegamento streaming dal sito https://conventionfondazionetelethon.it e trasmissione in diretta su RadioAidel22*

ABSTRACT

Relatore: **Alberto Auricchio**
Professore Ordinario di Genetica Medica all'Università Federico II di Napoli e Direttore dell'Istituto TIGEM Telethon di Genetica e Medicina

ABSTRACT

RICERCA TRASLAZIONALE: IL PERCORSO DAL LABORATORIO AL PAZIENTE

Nel 2024 è stato eseguito per la prima volta al mondo a Napoli un intervento di terapia genica reso possibile grazie a un'innovativa piattaforma sviluppata dal TIGEM di Pozzuoli, che consente di trasferire geni di grandi dimensioni. Attraverso lo sguardo del direttore dell'Istituto, che ha coordinato direttamente questo progetto nel corso degli anni, ripercorreremo il percorso che porta dalla ricerca condotta in laboratorio fino al paziente: un percorso complesso e ricco di attori diversi, non sempre lineare, in cui la Fondazione Telethon ha giocato un ruolo di importante mediatore.

Relatore: **Aiuti Alessandro**
Professore ordinario di Pediatria Università Vita-Salute San Raffaele, Primario UOC Immunoematologia Pediatrica all'IRCCS San Raffaele e Vicedirettore dell'Istituto TIGET

ABSTRACT

LA TERAPIA GENICA DI OGGI E GLI SVILUPPI DI DOMANI

Sono già due le terapie geniche per malattie genetiche rare sviluppate dall'Istituto TIGET San Raffaele - Telethon di Milano che sono diventate farmaci. Per una terza, la Fondazione Telethon ha di recente richiesto all'Agenzia Europea del Farmaco l'autorizzazione all'immissione in commercio. Inoltre, sono già in corso sperimentazioni cliniche per altre terapie, o ne partiranno a breve. Durante il suo intervento, il Prof. Aiuti, Vicedirettore dell'istituto, parlerà di questi successi e delle sfide ancora aperte, sia in termini di accessibilità e sostenibilità, sia per quanto riguarda i nuovi sviluppi del settore, come l'editing genetico e quello epigenetico.

Relatori: **Nicola Brunetti-Pierri**
Professore ordinario di Genetica, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli studi di Napoli Federico II, e Group Leader dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM
Elena Cattaneo
Professore Ordinario di Farmacologia, Università degli Studi di Milano e Direttore del "Laboratorio di Biologia delle Cellule Staminali e Farmacologia delle Malattie Neurodegenerative"

ABSTRACT

IL SENSO DI UNA RICERCA FALLITA: PUNTI DI VISTA DI UN RICERCATORE E DI UN CLINICO

La possibilità di fallire, ovvero di non ottenere il risultato sperato, è intrinseca al processo scientifico, sia nella ricerca di base sia in quella clinica. La ricerca di laboratorio, per definizione, esplora territori nuovi e sconosciuti, caratterizzati da un elevato grado di incertezza. Allo stesso modo, l'elevata complessità delle sperimentazioni cliniche rende inevitabile il rischio di fallimento. Tuttavia, per quanto frustranti i fallimenti nella ricerca non devono essere considerati esclusivamente in modo negativo. Partendo dalle loro esperienze, il Prof. Brunetti-Pierri e la Prof.ssa Cattaneo illustreranno come i risultati mancati siano fondamentali per rivelare nuove direzioni di ricerca, stimolare l'innovazione, suggerire modifiche ai protocolli sperimentali: in breve, per far avanzare il progresso scientifico, dal laboratorio alla clinica.

Relatori: **Michela Milani**
Ricercatrice dell'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica TIGET
Leopoldo Staiano
Ricercatore dell'Institute of Genetic and Biomedical Research-IRGBCNR e Assistente Ricercatore dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM
Anna Maria Teti
Ricercatrice e Professore Universitario

ABSTRACT

DALLA RICERCA DI BASE IN LABORATORIO ALL'INDUSTRIA

Il mondo dell'industria è un attore fondamentale nello sviluppo di nuove terapie e il campo delle malattie rare non fa eccezione. Partendo dall'esperienza di tre ricercatori della Fondazione Telethon si esploreranno i possibili fattori abilitanti, gli ostacoli e le opportunità che possono trasformare dei progetti nati nell'ambito della ricerca di base a potenziali approcci terapeutici dalle ricadute allargate, grazie alla collaborazione con companies e biotech.

Relatori: **Marcello Allegretti**
Direttore Scientifico Dompé Farmaceutici
Fecarotta Simona
Medico Specialista Interno in Pediatria presso il Dipartimento Materno-Infantile dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli
Celeste Scotti
Direttore Ricerca e Sviluppo di Fondazione Telethon ETS

ABSTRACT

DRUG REPURPOSING: QUALI SONO GLI OSTACOLI E COME FACILITARE LA TRANSIZIONE DALLA SCOPERTA ALLA PRATICA CLINICA?

Il drug repurposing, o riposizionamento di farmaci, costituisce una strategia promettente per accelerare lo sviluppo di nuove terapie utilizzando farmaci già approvati o studiati per altre indicazioni. Tuttavia, questo approccio non è privo di ostacoli, come l'individuazione dei farmaci più promettenti, la loro riformulazione, le complessità legate ai diritti di proprietà intellettuale, le barriere regolatorie, gli incentivi finanziari limitati. Durante l'intervento, i relatori discuteranno delle difficoltà dell'approccio ma anche delle strategie e delle innovazioni tecnologiche utili per superarle e rispondere nel modo più rapido ed efficace possibile alle necessità dei pazienti.

Relatori: **Alessandra Camerini**
Responsabile Relazioni con pazienti e Associazioni di Fondazione Telethon ETS
Ilaria Villa
Direttore Generale di Fondazione Telethon ETS

ABSTRACT

LOGICHE DEL FINANZIAMENTO ALLA RICERCA: COSA ABBIAMO IMPARATO INSIEME IN QUESTI ANNI

Da 35 anni Fondazione Telethon conduce e finanzia ricerca scientifica sulle malattie genetiche rare. In questo intervento condivideremo le scelte strategiche e le esperienze che hanno reso efficace il lavoro di Fondazione Telethon nel corso degli anni, i criteri utilizzati per selezionare i progetti, con un'attenzione particolare alla qualità della ricerca e alla sua capacità di arrivare concretamente al "letto del paziente", evitando di interrompersi prima di produrre risultati concreti. Rifletteremo insieme sulle logiche del finanziamento alla ricerca e di quanto sia chiave il ruolo dei pazienti e delle associazioni di pazienti nell'indirizzare e stimolare la ricerca scientifica. Infine, si analizzeranno le sfide future, con particolare attenzione all'evoluzione del panorama scientifico e all'importanza di un'azione coordinata tra fondazioni, associazioni di pazienti, ricercatori, aziende farmaceutiche… al fine di ottenere risultati concreti, per massimizzare l'impatto delle risorse disponibili e indirizzarle verso i reali bisogni.

BIOGRAFIE RELATORI

Aiuti Alessandro
Professore ordinario di Pediatria Università Vita-Salute San Raffaele, Primario UOC Immunoematologia Pediatrica all'IRCCS San Raffaele e Vicedirettore dell'Istituto TIGET

Nato a Roma nel 1966, Alessandro Aiuti si è laureato in Medicina e Chirurgia all'Università La Sapienza di Roma. Dal 1994 al 1996 ha lavorato come post-doctoral fellow al Centre for Blood Research dell'Harvard Medical School di Boston, negli Usa, svolgendo ricerche sulle cellule staminali ematopoietiche. Nel 1996 ha conseguito il dottorato di ricerca in Biologia umana all'Università La Sapienza di Roma, mentre nel 1998 si è specializzato in Ematologia all'Università degli Studi di Milano. Dal 1997 al 2000 Alessandro Aiuti è stato ricercatore della Fondazione Telethon presso l'SR-Tiget e poi medico ricercatore all'Ospedale San Raffaele. Attualmente Alessandro Aiuti è vicedirettore ricerca clinica del SR-Tiget ed è responsabile di un'unità di ricerca dedicata allo studio delle malattie ereditarie del sistema immunitario. Ricopre inoltre la carica di Direttore dell'U.O. di Immunoematologia Pediatrica dell'IRCCS Ospedale San Raffaele, di Professore ordinario di Pediatria presso l'Università Vita-Salute San Raffaele di Milano ed è Direttore della Scuola di Specializzazione in Pediatria della stessa Università. Alessandro Aiuti ha svolto attività di ricerca e clinica nel campo dell'ematologia e dell'immunologia pediatrica, studiando la biologia delle cellule staminali ematopoietiche ed il loro impiego terapeutico. Le sue ricerche attuali si focalizzano sulla terapia genica per alcune malattie genetiche del sistema immunitario, del sangue e del sistema nervoso. Il suo studio è stato il primo al mondo a ottenere la cura dei bambini affetti da una rara malattia, l'ADA-SCID, con cellule staminali ematopoietiche geneticamente corrette. Le sue ricerche più recenti nel campo della terapia genica con vettori lentivirali e cellule staminali ematopoietiche hanno portato all'applicazione con successo della terapia per un'altra immunodeficienza primitiva, la sindrome di Wiskott-Aldrich. Il suo gruppo di ricerca si occupa inoltre di studiare le basi molecolari delle immunodeficienze per comprenderne meglio le malattie e migliorarne gli approcci terapeutici. Alessandro Aiuti ha pubblicato più di 200 articoli su riviste scientifiche internazionali. È membro del Consiglio direttivo del gruppo di lavoro Italiano sulle Immunodeficienze (IPINET), dell'European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), dell'Inborn Errors Working Party (IEWP) Studies Committee dell' European Society for Bone and Marrow Transplantation (EBMT), dell'International Committee e del Global Outreach Committee dell'American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT). È Inoltre Co-Chair dello Stem Cell and Gene Therapy Working Party of European Reference Network (ERN) on Rare Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases Network (RITA). Dal luglio 2019 è membro (in rappresentanza dei clinici) del Committee for Advanced Therapies (CAT) dell'Agenzia Europea del Farmaco (EMA). Per l'importante contributo allo sviluppo della terapia genica per malattie genetiche rare gli è stato conferito nel 2020 il Premio Else Kröner Fresenius per la ricerca biomedica, del valore di 2,5 milioni di euro.

Allegretti Marcello
Direttore Scientifico Dompé Farmaceutici

Marcello Allegretti ha conseguito la laurea in Chimica nel 1992 presso la Facoltà di Chimica dell'Università La Sapienza a Roma dove ha conseguito la specializzazione post-laurea. E' entrato a far parte di Dompé s.p.a prima come ricercatore di Chimica Farmaceutica poi come direttore del Dipartimento di Chimica. A seguire, nel 2005 è stato nominato Direttore della Ricerca di Dompé pha.r.ma s.p.a e dal 2009 ricopre il ruolo di Chief Scientific Officer presso Dompé farmaceutici S.p.A. a L'Aquila. Le sue responsabilità includono la gestione dei programmi di ricerca e sviluppo, la supervisione dei programmi di sviluppo preclinico e clinico e delle attività regolatorie. Marcello e il suo gruppo di Ricerca e Sviluppo sono stati coinvolti con successo nella scoperta di nuove entità chimiche.
I principali risultati scientifici di Marcello riguardano la ricerca e lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici sia molecole di sintesi chimica che farmaci biotecnologici.
Nel corso della sua carriera ha avuto modo di guidare trial clinici internazionali in diverse aree terapeutiche portando alla registrazione un nuovo farmaco biotecnologico diretto al trattamento di una rara patologia oftalmica.
Marcello ha pubblicato numerosi articoli scientifici e ha presentato i suoi lavori a congressi internazionali nel campo della ricerca farmacologica.
Nell'ambito del programma quadro Horizon 2020 finanziato dalla Comunità Europea, Dompé ha avuto modo di coordinare il partenariato di diversi progetti finalizzati all'identificazione di risposte rapide ad emergenze sanitarie emergenti, con un focus specifico sul "riposizionamento" di farmaci già commerciali o in fase avanzata di sviluppo. In questo contesto la piattaforma Exscalate sviluppata dai ricercatori Dompé, si è dimostrata uno strumento molto potente di accelerazione del processo razionale di selezione di molecole con alto potenziale per il trattamento di patologie ancora orfane di cura.

Auricchio Alberto
Professore Ordinario di Genetica Medica all'Università Federico II di Napoli e Direttore dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM

Nato a Napoli nel 1969, Alberto Auricchio si è laureato in Medicina e chirurgia all'Università Federico II di Napoli e si è successivamente specializzato in Pediatria presso l'Università di Milano. Dopo un periodo di ricerca a Philadelphia (Usa), presso l'Istituto di terapia genica umana dell'Università della Pennsylvania, è rientrato in Italia all'Istituto Telethon di genetica e medicina (Tigem) di Napoli, di cui è diventato direttore nel 2024. Il suo gruppo di ricerca è impegnato nello sviluppo di strategie di terapia genica per malattie genetiche dell'occhio, come per esempio l'amaurosi congenita di Leber e la sindrome di Stargardt, e del metabolismo, come la mucopolisaccaridosi di tipo 6. Alberto Auricchio ricopre inoltre la carica di professore ordinario di Genetica medica presso il dipartimento di Scienze biomediche avanzate dell'Università Federico II di Napoli.
Nel 2024 è diventato presidente della Società europea di terapia genica e cellulare (ESGCT) ed è tra i fondatori della Società italiana di terapia genica e cellulare (SITGEC).

Brunetti-Pierri Nicola
Professore ordinario di Genetica, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli studi di Napoli Federico II, e Group Leader dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM

Nato a Napoli nel 1973, Nicola Brunetti-Pierri si è laureato in Medicina e chirurgia presso l'Università Federico II di Napoli, dove si è anche specializzato in Pediatria. Dopo un lungo periodo negli Stati Uniti presso il Baylor College of Medicine di Houston, USA dove ha svolto attività clinica e di ricerca è rientrato in Italia presso l'Istituto Telethon di genetica e medicina (Tigem) di Napoli, dove

guida un gruppo di ricerca dedicato allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per i disordini congeniti del metabolismo (difetti del ciclo dell'urea, sindrome di Crigler-Najjar, iperossalurie primarie, malattie lisosomiali) usando la terapia genica e farmaci a base di piccole molecole. Il gruppo di ricerca è inoltre interessato allo studio della malattia epatica dovuta al deficit di alfa-1-antitripsina. Nell'ambito del Programma per le malattie senza diagnosi, Nicola Brunetti-Pierri è il referente clinico per l'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli. Ricopre inoltre la carica di professore di Pediatria presso il dipartimento di Scienze mediche traslazionali dell'Università Federico II di Napoli.

Camerini Alessandra
Responsabile Relazioni con pazienti e Associazioni di Fondazione Telethon ETS

Da dicembre 2018 coordina il Team delle relazioni con i pazienti e le Associazioni di pazienti e i Genetisti del servizio Info_Rare.
Bergamasca di origine e milanese di adozione, Alessandra si è laureata in Ingegneria Elettrica all'Università di Pavia e ha lavorato per 20 anni in ambito profit, in multinazionali e in banche di investimento internazionali, ricoprendo ruoli di dirigenza. È stata scout per oltre 15 anni e ha svolto numerose attività di volontariato (in ospedali, campi profughi, centri di accoglienza).
Sposata con Andrea, è mamma di due bimbi: Riccardo, di 11 anni, e Lorenzo, di 9 anni.
Nel 2016 si è avvicinata al mondo delle malattie rare, supportando la gestione di un'associazione di pazienti e occupandosi di vari progetti.
Con la consapevolezza della mission di Fondazione Telethon e il mantra "le persone al centro", sta implementando progetti per le Associazioni di pazienti che mirano alla messa a fattor comune dei percorsi e dei traguardi raggiunti e alla costruzione di competenze solide e concrete.

Cattaneo Elena
Professore Ordinario di Farmacologia, Università degli Studi di Milano e Direttore del "Laboratorio di Biologia delle Cellule Staminali e Farmacologia delle Malattie Neurodegenerative"

Nata a Milano nel 1962, Elena Cattaneo si è laureata in Farmacia all'Università di Milano, dove ha ottenuto anche il dottorato in Biotecnologie applicate alla farmacologia e in Biotecnologie cellulari e molecolari applicate al settore biomedico. Ha svolto il suo post-doc negli Usa, presso il laboratorio di Neurobiologia molecolare del Massachusetts Institute of Technology di Cambridge. Attualmente Elena Cattaneo è professore ordinario all'Università di Milano e dirige il Laboratorio di Biologia delle Cellule Staminali e Farmacologia delle Malattie Neurodegenerative del Dipartimento di Bioscienze; è inoltre cofondatore e direttore del centro di ricerche sulle cellule staminali UniStem. Da oltre trent'anni il suo laboratorio studia la corea di Huntington, con l'obiettivo di contribuire alla comprensione dei meccanismi patogenici e allo sviluppo di strategie farmacologiche, geniche e cellulari in grado di interferire con la malattia. Dal 2013 è Senatore a vita della Repubblica italiana, nominata dal Presidente della Repubblica, On. Giorgio Napolitano.

Fecarotta Simona
Medico Specialista Interno in Pediatria presso il Dipartimento Materno-Infantile dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli

Medico pediatra con consolidata esperienza in ricerca clinica nel campo delle malattie metaboliche ereditarie. L'attività di ricerca è finalizzata all'ottimizzazione dei percorsi diagnostici e terapeutici, con particolare attenzione all'implementazione di nuove strategie terapeutiche. Attualmente lavora presso il Dipartimento Materno-Infantile dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II di Napoli. Collabora con gruppi di ricerca nazionali e internazionali, partecipando a numerosi studi clinici e trial sperimentali.

Milani Michela
Ricercatrice dell'Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica TIGET

Con un dottorato di ricerca in medicina molecolare presso l'Università Vita-Salute San Raffaele di Milano, Michela ha contribuito al progresso della terapia genica per l'emofilia ed è attualmente impegnata come Project Leader nella comprensione della biologia delle cellule staminali epatiche presso l'Istituto San Raffaele Telethon per la terapia genica. Ha sviluppato nuovi vettori lentivirali su misura per l'uso in vivo per ottenere un targeting efficace degli epatociti o delle cellule endoteliali sinusoidali del fegato per il trattamento dell'emofilia su modello animale. Recentemente ha ampliato i suoi interessi per la terapia genica mediata da vettori lentivirali in vivo mostrando un trasferimento genico efficace e stabile nelle cellule staminali emopoietiche e progenitrici, sempre utilizzando un modello animale.

Murelli Valentina
Content Management team di Fondazione Telethon ETS

Biologa molecolare di formazione, è stata per molto tempo giornalista scientifica freelance (e ogni tanto si diverte ancora a firmare qualche pezzo…). Da alcuni anni, però, ha scelto di lavorare al servizio della missione di Fondazione Telethon, occupandosi in particolare della comunicazione di contenuti scientifici.

Scotti Celeste
Direttore Ricerca e Sviluppo di Fondazione Telethon ETS

Medico ricercatore che lavora da quasi 20 anni all'interfaccia tra clinica, ricerca di base e sviluppo di nuove terapie. Dopo 8 anni di esperienza in un'azienda farmaceutica, è tornato in Italia nel 2023 per ricoprire il ruolo di Direttore Ricerca e Sviluppo in Fondazione Telethon, dove supervisiona il finanziamento alla ricerca extramurale e lo sviluppo di nuove terapie nate dalla ricerca degli Istituti Telethon.
Precedentemente, dopo la Specializzazione in Ortopedia e Traumatologia, ha lavorato come ortopedico presso l'istituto Ortopedico Galeazzi di Milano. Si è laureato in Medicina presso l'Università Vita-Salute San Raffaele e ha ottenuto un dottorato di ricerca in Bioingegneria presso l'Università di Basilea.

Staiano Leopoldo
Ricercatore dell'Institute of Genetic and Biomedical Research-IRGBCNR e Assistente Ricercatore dell'Istituto Telethon di Genetica e Medicina TIGEM

Leopoldo Staiano ha conseguito la laurea in Biologia Molecolare nel 2008 presso l'Università di Napoli "Federico II" e successivamente il dottorato in Sistemi Modello nella Ricerca Biomedica e Veterinaria presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn. Durante il dottorato ha studiato l'evoluzione della ghiandola tiroidea.

Nel 2012 ha orientato la sua ricerca verso le malattie genetiche rare, unendosi al laboratorio della prof. De Matteis al TIGEM. Per otto anni ha studiato la biologia cellulare della sindrome di Lowe, dimostrando il ruolo della disfunzione endolisosomiale e dell'autofagia nella patologia del tubulo prossimale renale. Ha inoltre approfondito il traffico intracellulare e il metabolismo dei fosfoinositidi.
Dal 2020 è ricercatore CNR presso l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) e group leader presso il TIGEM. Il suo gruppo di ricerca si concentra sui meccanismi molecolari di rare malattie renali, tra cui la sindrome di Lowe, la malattia di Fabry e la sclerosi tuberosa. Per questi studi utilizza organoidi renali, una tecnologia innovativa che consente di analizzare i processi fisiopatologici e sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Teti Anna Maria
Ricercatrice e Professore Universitario

Nata nel 1954 a Taranto, Anna Maria Teti si è laureata in Scienze biologiche all'Università di Bari. Dopo un'esperienza negli Stati Uniti, è rientrata in Italia. Anna Maria Teti è stata professore ordinario di Istologia all'Università dell'Aquila, dove ha coordinato anche un gruppo di ricerca presso il dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche. Attualmente è associata con incarico di collaborazione senior all'Istituto di Biochimica e Biologia Cellulare-CNR di Monterotondo (Roma). Si occupa della terapia sperimentale dell'osteopetrosi, una grave malattia dello scheletro dovuta all'inattività degli osteoclasti, le cellule ossee che normalmente sostituiscono il tessuto vecchio con osso nuovo e garantiscono le normali funzioni dello scheletro. Oltre a studiare la patogenesi ed i meccanismi cellulari e molecolari dell'osteopetrosi, sviluppa studi inerenti la terapia della sua forma autosomica dominante.

Villa Ilaria
Direttore Generale di Fondazione Telethon ETS

Ilaria è l'amministratore delegato di Fondazione Telethon.
Ha iniziato la sua carriera nel 2000 nel Market Access di Schering-Plough, per poi passare a ruoli di leadership in Allergan, Wyeth, Roche, UCB e Zambon contribuendo a numerosi lanci di blockbuster e prodotti innovativi in diverse aree terapeutiche (immunologia, oncologia, neurologia, apparato respiratorio e neuroinfiammazione). Il suo percorso professionale è guidato dalla passione per la trasformazione, la creazione di valore e l'impatto per i pazienti, l'organizzazione e la società. Ilaria si è laureata in Economia all'Università di Siena. Nel 2019 ha frequentato il Senior Executive Program presso la Stanford University (CA).
È italiana, vive a Milano con il marito e i suoi due figli.

Zaccheddu Annamaria
Content Management team di Fondazione Telethon ETS

Nasce a Milano nel 1979 e si laurea nel 2003 in Biotecnologie mediche all'Università degli studi di Milano con una tesi sperimentale sull'immunoterapia del melanoma, svolta presso l'Istituto dei tumori. Nel corso degli studi universitari – e in particolar modo durante la sua esperienza in un laboratorio di ricerca – capisce che la sua vera passione non era tanto quella di "praticare" la scienza, ma di raccontarla. Così decide di frequentare il Master in comunicazione della scienza della Scuola superiore di studi avanzati (Sissa) di Trieste, che consegue nel 2005. A partire dal 2004 lavora nel campo della comunicazione scientifica: prima come addetta stampa dell'Immaginario scientifico, il Science Centre di Trieste, poi come redattore scientifico nell'agenzia Zadigroma, dove si occupa di progetti di comunicazione istituzionale commissionati da ministero della Salute e Istituto superiore di sanità nell'ambito della prevenzione sanitaria.
Dal 2008 entra a far parte della squadra Telethon: per la Fondazione si è sempre occupata di comunicazione istituzionale, in particolare dei contenuti scientifici di tutti i canali di comunicazione e di formazione interna.
Insieme al vicedirettore dell'SR-TIGET Alessandro Aiuti, è co-autrice del libro "La cura inaspettata: l'HIV da peste del secolo a farmaco di precisione (Mondadori, 2023).

FONDAZIONE Telethon

SCIENTIFIC CONVENTION

SCIENTIFIC CONVENTION

MONDAY, 17th March 2025 - AFTERNOON

10 am – 2 p.m — *Registration and poster setting up*

2 – 3 p.m. — **Welcome and opening by Fondazione Telethon** *Anfiteatro*
Ilaria Villa - *General Manager, Fondazione Telethon ETS*
Celeste Scotti - *R&D Director, Fondazione Telethon ETS*

3 – 4.35 p.m. — **Session 1 - From genome to genes and their expression** *Anfiteatro*
Chairs: **Andrea Ditadi, Anna Maria Cariboni**

PLENARY TALKS

Sestrin2 drives ER-phagy in response to protein misfolding
Chiara De Leonibus - *Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)*

Regulation of gene expression at the level of translation: unexpected checkpoints and future perspectives
Stefano Biffo – *University of Milan & INGM (Milan)*

Brain organoids modelling of hormonal impact on neurodevelopment to unravel the molecular basis of Congenital Adrenal Hyperplasia neuropsychiatric symptoms
Nicolò Caporale - *University of Milan, Human Technopole (Milan)*

FLASH PRESENTATIONS

Anna Maria Gambetta, *University of Padua* - Genome-wide screening in pluripotent cells identifies novel suppressors of mutant huntingtin toxicity

Carlo Giaccari, *CNR - IGB (Naples)* - Exploring the role of the maternal-effect Padi6 gene in early mouse embryogenesis

Luca Frosio, *San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (Milan)* - Mitotic kinase Aurora B control interferon responses in macrophages via histone phosphorylation

Leandro Soria, *Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)* - Impaired nuclear glycogen metabolism affects liver homeostasis in Argininosuccinic aciduria

Martina Zobel, *University of Milan* - DNA as driver of its own instability within the Huntington's disease locus

Samuele Crotti, *University of Modena and Reggio Emilia* - Boosting HSPB3 to prevent neuromuscular degeneration in peripheral neuropathies

NEGEDIA – sponsored flash talk
Bridging Advanced Sequencing Technology and Clinical Diagnostics Generation of Medicine
Beatrice Salvatori, Scientist and Project Manager Negedia

4.35 – 5.20 p.m. — **KEYNOTE LECTURE** *Anfiteatro*
Chair: **Leopoldo Staiano**

Applications of human brain organogenesis
Alysson R. Muotri - *UC San Diego, CA*

5.30 – 7.30 pm — *Coffee break & Poster Session 1 Sala della Piazza*
Scientists and Patient Association Representatives

7.30 pm — **Il Ritmo della Ricerca - cena romagnola e galà** *Foyer Domus*
Entertainment by the Raoul & Swing Orchestra

TUESDAY, 18th March 2025 - MORNING

8.30 – 9 am — *Registration and poster setting up*

9 – 10.30 am — **Session 2 - Editing strategies for rare diseases** *Anfiteatro*
Chairs: **Anna Cereseto, Angelo Lombardo**

PLENARY TALKS

Towards one-and-done gene therapies for defect of hepatic metabolism in pediatric patients
Alessio Cantore - *San Raffaele - Telethon Institute for Gene Therapy (Milan)*

Towards customized allele-specific CRISPR/Cas gene editing for the treatment of ocular surface disorder in EEC syndrome
Laura De Rosa - *University of Modena and Reggio Emilia*

Mutation-independent genome editing approaches for treatment of Stargardt disease
Ivana Trapani - *Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)*

SIAL Srl – sponsored flash talk
Genome of Europe: building an unbiased genome reference across Europe for improving precision medicine
Graziano Pesole, *Università degli Studi di Bari "A. Moro"*

FLASH PRESENTATIONS

Fanny Jaudon, University of Trieste - New genome editing strategies for episodic ataxia and absence epilepsy: Optimizing splice isoforms for enhanced calcium channel function

Federico Midena, San Raffaele - Telethon Institute for Gene Therapy (Milan) - Tridimensional scaffolds enable efficient and safe genetic engineering of hematopoietic stem and progenitor cells across multiple gene therapy platforms

Agnese Padula, Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli) - Copper-mediated DNA damage influences AAV integration profiles in gene therapy and genome editing for Wilson disease

Martino Cappelluti, San Raffaele - Telethon Institute for Gene Therapy (Milan) - Allele-selective silencing of the mutant Huntingtin gene by epigenetic editing for the treatment of Huntington's Disease

Martina Orefice, University of Pisa - Modeling Pitt-Hopkins syndrome and new pathogenetic variants of TCF4 by gene editing: a step forward toward precision medicine

10.30 – 11.15 am — *Coffee Break Sala della Piazza*

11.15 a.m. – 12 pm — **KEYNOTE LECTURE** *Anfiteatro*
Chair: **Anna Cereseto**

Genome Editing by Homology Directed Repair (HDR) to Create Stem Cell Based Drugs
Matthew Porteus - *Stanford University (CA)*

12 p.m. – 1 p.m. — **From project to product: how can a scientist trigger pharma interaction?** *Anfiteatro*
Round Table - Chair: **Valentina Vavassori**

Alberto Auricchio, *Tigem Scientific Director*
Emiliano Biasini, *Associate Professor at Department of Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO) University of Trento*
Samuele Ferrari, *Project Leader at SR-Tiget*
Irene Manfredi, *ADV IP Srl (former IP Manager at Fondazione Telethon ETS)*

1 – 2.20 p.m. — *Lunch buffet Foyer Domus*
Enjoy lunch and see you at 2.30 p.m. in *Anfiteatro*…sharp!

SCIENTIFIC CONVENTION

Tuesday, 18th March 2025 – AFTERNOON

2.30 – 3.30 p.m.

Session 3 - Strategies and challenges in biomedical research *Anfiteatro*
Safety and Efficacy in Gene Therapy: A Balancing Act
Eugenio Montini - *San Raffaele - Telethon Institute for Gene Therapy (Milan)*

ROUND TABLE
Celeste Scotti, *R&D Director, Fondazione Telethon ETS*
Alberto Auricchio, *Tigem Scientific Director*
Luigi Naldini, *SR-Tiget Scientific Director*

3.30 – 5.30 p.m.

Session 4 - Mitochondrial biology *Anfiteatro*
Chairs: Giorgio Casari, Luca Rampoldi

PLENARY TALKS
A mitochondrial therapy for muscular dystrophies
Paolo Bernardi, *University of Padua*

Posterior Column Ataxia and Retinitis Pigmentosa: new pathogenetic insights from the study of mitochondria-as sociated membranes
Deborah Chiabrando, *University of Turin*

Dysregulation of lipid droplet dynamics induces mitochondrial stress and promotes fibrosis, driving the progression of chronic kidney disease in Lowe syndrome
Leopoldo Staiano, *Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)*

EUROCLONE – sponsored flash talk
Innovative solutions for protein detection in Spatial Biology and in in Single Cell Analysis
Maxime Jacquet, *Field Application Scientists EMEA, Cell Signaling Technology*

FLASH PRESENTATIONS

Michael Donadon, *University of Padua* - Exploiting redox-active molecules against mitochondrial diseases linked to complex III and complex I dysfunction
Iva Cantando, *University of Rome "La Sapienza"* - Mitochondrial dysfunctions in 22q11 Deletion Syndrome: a novel target for therapeutic intervention
Lucia Iannotta, *CNR - Neuroscience Institute (Milan)* - Uncovering VPS13D's function to understand SCAR4 pathogenesis
Silvia Sighinolfi San Raffaele - *Telethon Institute for Gene Therapy (Milan)* - Intracellular Iron Overload rewires HSC metabolism by impairing mitochondrial fitness in in β-thalassemia
Erica Tagliatti, *Humanitas University (Milan)* - Microglial NHD Trem2 gene controls neuronal metabolism and synapses during development

5.30 – 7.30 p.m.

Coffee break & Poster Session 2 Sala della Piazza

SCIENTIFIC CONVENTION

WEDNESDAY, 19th March 2025 – MORNING

9 – 10.30 a.m.

Session 5 - RNA technologies for therapy development *Anfiteatro*
Chairs: **Marco Sandri, Laura Cancedda**

PLENARY TALKS
A new RNA-based therapy for the Fragile X Syndrome
Claudia Bagni, *University of Rome "Tor Vergata"*

mRNA-replacement therapy for Glycogen Storage Disease type 1b
Lucia De Stefano, *Telethon Institute of Genetic and Medicine (Pozzuoli)*

Developing a strategy to target AR coactivators in preclinical models of SBMA
Manuela Basso, *University of Trento*

PRODOTTI GIANNI – sponsored flash talk
New Generation Drug Delivery Systems: intracellular uptake and trafficking studies
Barbara Canonico, *Professor at University of Urbino Carlo Bo*

FLASH PRESENTATIONS

Alessia Oppezzo, *IFOM ETS (Milan)* - Selective control of DNA damage response at telomeres as an innovative therapeutic approach for Dyskeratosis Congenita
Roberta Benfante, National Research Council (Milan) - The natural antisense lncRNA PHOX2B-AS1 in the pathogenesis and as potential drug target in Congenital Central Hypoventilation Syndrome (CCHS)
Roberto Oleari, *University of Milan* - Combining spatial and gene transcriptomics to reveal NKTR as nuclear splicing protein implicated in head development and in a novel spliceosomopathy
Dalila Capasso, *Telethon Institute of Genetic and Medicine (Pozzuoli)* - Gaining insight into the role of noncoding RNAs in Inherited Retinal Disease by RNA-seq-based approaches

10.30 – 11.30 a.m. *Coffee break Sala della Piazza with take-away*

11.30 – 12.45 p.m. **Session 6 - Innovative therapeutic approaches** *Anfiteatro*
Chairs: **Maria Pennuto, Emiliano Biasini**

PLENARY TALKS
A membrane-targeted photoswitch restores physiological ON/OFF responses to light in the degenerate retina
Fabio Benfenati, *Italian Institute of Technology (Genova)*
A Pipeline for drug discovery in Lowe Syndrome
Antonella De Matteis, *Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)*
Classification and rescue of HCN1 mutations in EIEE patients
Anna Moroni, *University of Milan*

FLASH PRESENTATIONS

Francesco Gentile, *Università Vita-Salute San Raffaele (Milan)* - Genetic and pharmacologic modula tion of the ATF6 UPR-related pathway affect disease pathogenesis in mice models of CMT1B
Angela Della Sala, *University of Torino* - Rescue of Mutant CFTR Chloride Channels by a Mimetic Pepti de Targeting the A-Kinase Anchoring Function of PI3Kγ
Sandro Montefusco, *Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)* - Combining phenotypic high-content imaging with the repurposing of drugs to tackle lysosomal storage disorders
Enrica Federti, *University of Verona* - Resolvin D1 protects against sickle cell related inflammatory cardiomyopathy in humanized mice
Nicole Innocenti, *University of Trento* **-** Targeting the undruggable: chemical exploration of a prion protein degrader compound

12.45 – 13.25 p.m. **Late Breaking News** *Anfiteatro*

13.25 – 13.30 p.m. *Closing Anfiteatro*

APPLICATIONS OF HUMAN BRAIN ORGANOGENESIS

Alysson R. Muotri
Director, Stem Cell Program, Professor of Pediatrics and Cellular & Molecular Medicine, UC San Diego

Structural and transcriptional changes during early brain maturation follow fixed developmental programs defined by genetics. However, whether this is true for functional network activity remains unknown, primarily due to experimental inaccessibility of the initial stages of the living human brain. We developed cortical organoids that spontaneously display periodic and regular oscillatory network events that are dependent on glutamatergic and GABAergic signaling. These nested oscillations exhibit cross-frequency coupling, proposed to coordinate neuronal computation and communication. As evidence of potential network maturation, oscillatory activity subsequently transitioned to more spatiotemporally irregular patterns, capturing features observed in preterm human electroencephalography (EEG). These results show that the development of structured network activity in the human neocortex may follow stable genetic programming, even in the absence of external or subcortical inputs. Our approach provides novel opportunities for investigating and manipulating the role of network activity in the developing human cortex. Applications for neurodevelopmental disorders and brain evolution will be discussed.

GENOME EDITING BY HOMOLOGY DIRECTED REPAIR (HDR) TO CREATE STEM CELL BASED DRUGS

Matthew Porteus

Sutardja Chuk Professor of Definitive and Curative Medicine
Department of Pediatrics
Institute of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine
Stanford University

The precision of genome editing has the promise to positively impact on a wide variety of both genetic and non-genetic diseases. When genome editing is combined with the use of stem cells, a novel cell based drug with potential lifetime durability and broad biodistribution can be created. While there are now multiple different genome editing technologies, for the modification of cells outside the body, homology directed repair using the homologous recombination machinery utilizes natural cellular mechanisms and provides the greatest versatility both in terms of types of changes and types of cell types that it can applied to. This versatility does not come at a cost of decreased efficiency as high efficiencies can also be regularly achieved. In this talk, I will discuss our progress of using HDR in stem cells to address the genetic diseases of sickle cell disease, cystic fibrosis and Huntington's disease and to address the HIV global pandemic. These diseases demonstrate how HDR can be applied to a variety of different stem cell types including hematopoietic stem cells, basal cells (the stem cells of the respiratory epithelium) and induced pluripotent stem cells.

SESSION 1 - From genome to genes and their expression

SESTRIN2 DRIVES ER-PHAGY IN RESPONSE TO PROTEIN MISFOLDING

C. De Leonibus[1,2,8],M. Maddaluno[1,4,8],R. Ferriero[1],R. Besio[3], L. Cinque[1,4], P.J. Lim[5], A. Palma[1], R. De Cegli[1], S. Gagliotta[1], S. Montefusco[1], M. Iavazzo[1,4], M. Rohrbach[5], C. Giunta[5], E. Polishchuk[1], D.L. Medina[1,6], D. Di Bernardo[1,7], A. Forlino[3], P. Piccolo[1] and C. Settembre[1,4]

[1]*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli, Italy*
[2]*Department of Health Sciences, University of Basilicata, Potenza, Italy*
[3]*Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*
[4]*Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Naples, Italy*
[5]*Division of Metabolism and Children's Research Center, University Hospital of Zurich, Zurich, Switzerland*
[6]*Department of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples, Italy*
[7]*Department of Chemical, Materials and Industrial Production Engineering, Federico II University, Naples, Italy*
[8]*These authors contributed equally*

Protein biogenesis within the endoplasmic reticulum (ER) is crucial for organismal function. Errors during protein folding necessitate the removal of faulty products. ER-associated protein degradation and ER-phagy target misfolded proteins for proteasomal and lysosomal degradation. The mechanisms initiating ER-phagy in response to ER proteostasis defects are not well understood. By studying mouse primary cells and patient samples as a model of ER storage disorders (ERSDs), we show that accumulation of faulty products within the ER triggers a response involving SESTRIN2, a nutrient sensor controlling mTORC1 signaling. SESTRIN2 induction by XBP1 inhibits mTORC1's phosphorylation of TFEB/TFE3, allowing these transcription factors to enter the nucleus and upregulate the ER-phagy receptor FAM134B along with lysosomal genes. This response promotes ER-phagy of misfolded proteins via FAM134B-Calnexin complex. Pharmacological induction of FAM134B improves clearance of misfolded proteins in ERSDs. Our study identifies the interplay between nutrient signaling and ER quality control, suggesting therapeutic strategies for ERSDs.

REGULATION OF GENE EXPRESSION AT THE LEVEL OF TRANSLATION: UNEXPECTED CHECKPOINTS AND FUTURE PERSPECTIVES

Stefano Biffo[1,2], Giacomo D'Andrea[1,2], Ivan Ferrari[1,2] , Annarita Miluzio[2], Alessandra Scagliola[1,2]

[1]*Università di Milano*
[2]*Istituto Nazione Genetica Molecolare (Milano)*

Shwachman-Diamond syndrome (SDS) is a monogenic disease linked to mutations in the SBDS gene. Deficiency of SBDS activity causes the impairment of ribosomal maturation which in turn leads to pleiotropic effects on multiple tissues. Surprisingly, experimental models have demonstrated that point mutations in the EIF6 gene, itself essential for ribosomal biology, rescue the phenotype caused by the loss of SBDS. Molecular studies have shown that the eIF6 protein is a fundamental regulator of the rate of protein synthesis, and a checkpoint for the correct assembly of ribosomes and the initiation of translation. In addition, these studies unveil the fact that the annotated genome is not sufficient for the prediction of gene expression. Leveraging on the expression and activity of eIF6 may therefore have a therapeutic value in SDS, as well as in other conditions in which ribosomal activity is either impaired or abnormally upregulated. The challenge ahead is to render feasible safe strategies for ribosomal manipulation.

BRAIN ORGANOIDS MODELLING OF HORMONAL IMPACT ON NEURODEVELOPMENT TO UNRAVEL THE MOLECULAR BASIS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA NEUROPSYCHIATRIC SYMPTOMS

Autori:
N. Caporale[1,2], E. Villa[2], G. Testa[1,2]

[1]*Università di Milano*
[2]*Human Technopole (Milano)*

Testo dell'abstract:
Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is a genetic disorder caused by the deficiency of the enzyme that synthesize cortisol in the adrenal cortex. This has cascading effects, leading to multiple hormonal imbalances that impact since early developmental stages on neurodevelopment. Despite CAH was first described more than 150 years ago, patients still suffer disease- and treatment related adverse outcomes, such as neuropsychiatric morbidity. We are elucidating CAH molecular pathogenesis by experimentally manipulating hormonal signaling pathways in vitro. We carried out a massive profiling of cortical brain organoids at the level of bulk (400 samples), multiplexed single cell transcriptomics (about 500.000 cells), immunofluorescence stainings, and steroidomics, upon exposure to hormonal agonists and antagonists of 7 different pathways. This represents a multi-modal atlas of hormonal signaling in human neurodevelopment and allowed us to identify the cell type- and developmental trajectory-specific effects of hormonal pathways' perturbations. We also found the key observation that the transcription factor SP5 (target of the WNT/β-catenin pathway and associated to cognitive traits by several GWAS) was significantly altered by hormonal imbalances that are relevant for CAH. We are thus analyzing the gene regulatory networks of SP5 as key molecular players for the neuropsychiatric events in CAH and engineering an inducible cell line to modulate the expression of SP5 and test its ability to revert the molecular and cellular phenotypes induced by hormonal exposure. Finally, we will prioritize drugs, through repurposing strategies, that interact with SP5 and its targets, for pre-clinical validation. Bridging the knowledge gap in the pathogenesis of CAH, we are contributing to advancing our basic knowledge on the role of hormones on brain development and will propose new therapeutic and preventive approaches for improving patients' quality of life.

SESSION 2 - Editing strategies for rare diseases

TOWARDS ONE-AND-DONE GENE THERAPIES FOR DEFECTS OF HEPATIC METABOLISM IN PEDIATRIC PATIENTS

A. Cantore[1,2]

[1]*San Raffaele – Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget),* IRCCS *San Raffaele Scientific Institute*
[2]*Vita-Salute San Raffaele University*

In vivo gene engineering of hepatocytes may represent a definitive cure for monogenic metabolic diseases. Integration of the therapeutic transgene, e.g., by site-specific editing, into the target cell genome is essential for long-term expression after a single dose early in life. Maintenance of the genetic modification upon hepatocytes proliferation in liver growth and turnover requires targeting the cells underlying these processes. Little is known about liver growth and how different hepatocyte subsets contribute to it. Unexpectedly, we found that most hepatocytes are quiescent during liver growth, and 15-20% of them are clonogenic and generate most of the adult tissue. Homologous recombination (HR)-based targeted gene editing of these clonogenic hepatocytes in newborn mice resulted in an expansion of the gene-edited area at the end of liver growth, supporting that the proportion of the genetically modified liver increases when the gene engineering is enriched in the clonogenic hepatocyte subset. We exploited this favorable outcome to develop therapeutic genome editing for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2). PFIC-2 is a monogenic metabolic disease caused by the deficiency of liver bile salt export pump (Abcb11), leading to end-stage liver disease in childhood. We aim at integrating a corrective cDNA into the first intron of the Abcb11 gene to correct most disease-causing mutations while maintaining physiological gene regulation. We tested different donor DNA configurations delivered by adeno-associated viral vectors (AAV) to newborn Cas9 transgenic mice. We observed up to 12% targeted integration and 14% positive liver area, that would be therapeutic in PFIC-2. The combination of AAV-donor DNA and Cas9 mRNA/gRNA delivery by lipid nanoparticles also allowed HR-based gene editing. Overall, our studies will unravel mechanisms of liver dynamics and inform the development of in vivo liver-based genome editing for inherited metabolic diseases.

TOWARDS CUSTOMIZED ALLELE-SPECIFIC CRISPR/CAS GENE EDITING FOR THE TREATMENT OF OCULAR SURFACE DISORDER IN EEC SYNDROME

L. De Rosa[1], A. Fabrizi[1] , A. Conci[1], S. Zacchino[1], G. Marini[1] , C. Cattaneo[1], S. Rosignoli[1, 2], A. Paiardini[2] , M. De Luca[1]

[1]Università di Modena e Reggio Emilia- Centro di Medicina Rigenerativa “S. Ferrari”
[2]Università di Roma - La Sapienza

Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Cleft Lip (EEC) syndrome is a rare, dominantly inherited genetic disorder caused by specific TP63 missense mutations in the DNA Binding Domain (DBD). Patients with EEC often exhibit skeletal abnormalities such as polysyndactyly and cleft lip palate, and some mutations can result in the depletion of limbal stem cells, leading to progressive blindness. While surgical interventions can address skeletal deformities, there remains a critical unmet need for effective treatments targeting corneal blindness, a condition that severely diminishes the quality of life for those affected. We propose an innovative allele-specific gene editing approach to correct the R280C (C>T) TP63 mutation, which is associated to both EEC and related ocular defects. By leveraging the proximity of an -NGG PAM sequence near the C>T mutation, we have designed a guide RNA (gRNA) for SpCas9 to precisely target the mutant allele. The ribonucleoprotein (RNP) complex was then electroporated into primary keratinocytes derived from EEC patients, as well as into healthy human keratinocytes for comparison. Since the only distinguishing feature between the two alleles is the R280C mutation, we considered the genomic context of healthy keratinocytes to represent a stringent test for potential off target effects of SpCas9. Our analysis revealed minimal off-target editing in normal keratinocytes, while achieving high efficiency knockout of the mutant allele in EEC-derived keratinocytes. This promising result underscores the ability of our SpCas9+gRNA complex to selectively and efficiently edit the mutated allele. Furthermore, given the role of p63 as a key factor regulating stem cell proliferation and differentiation in keratinocytes, we functionally validated that the editing occurred on the mutated allele in EEC primary epidermal stem cells. To ensure the safety and specificity of our approach, potential off-target sites were examined using different approaches, which confirmed the absence of unintended editing events. Collectively, these findings demonstrate the feasibility of using CRISPR/Cas9 technology to specifically knock out the R280C TP63 mutation, thereby restoring p63 activity in epithelial stem cells, hence offering a potential therapeutic route for addressing the debilitating effects of EEC syndrome.

MUTATION-INDEPENDENT GENOME EDITING APPROACHES FOR TREATMENT OF STARGARDT DISEASE

F. Fioretto[1,2], E. Pugni[1], E. Tenderini[1], M. Sansonetti[1], A. Casciello[1], M. Cascone[1], F. Razzano[1], N. Mazzaro[1], M. Lupo[1], E. Marrocco[1], X. Bujanda Cundin[1], G. Gambardella[1], **I. Trapani**[1,2]

[1]*Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)*
[2]*Department of Advanced Biomedical Sciences, Federico II University (Naples, 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 1) sequence-specificity, that limits its applicability to diseases with high allelic heterogeneity; 2) 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 (AAV) vector-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. Accordingly, we have developed multiple candidate sets of AAV-Abca4 vectors for targeting either the murine or the human ABCA4 gene. We side-by-side compared the different approaches in vitro, in both murine and human cell lines, and found that they effectively mediate template integration at the endogenous locus, resulting in ABCA4 expression. Subretinal delivery of the AAV-based genome editing approaches in the retina of Abca4-/- mice results in targeted DNA template integration and reconstitution of Abca4

expression in transduced photoreceptors at levels that were found to ameliorate the STGD1 phenotype in Abca4-/- mice. Further evaluation of the efficacy of our strategies in human iPSC-derived 3D retinal organoids is ongoing.

SESSION 4 - Mitochondrial biology

A MITOCHONDRIAL THERAPY FOR MUSCULAR DYSTROPHIES

P. Bernardi[1]

[1]*Università di Padova*

Deregulation of Ca2+ homeostasis in skeletal muscle – whatever its cause – determines mitochondrial dysfunction due to Ca2+ overload and oxidative stress. In muscular dystrophies this abnormal condition may be initially compensated, but over time the adaptive mechanisms are overwhelmed, leading to overt mitochondrial dysfunction due to permeability transition pore (PTP) opening, which precipitates ATP depletion and muscle fiber death. The central hypothesis that I have tested in over thirty years of steady funding from Fondazione Telethon is that blocking the pathogenic opening of the PTP with proper inhibitors prevents mitochondrial dysfunction and favorably affects muscular dystrophy in models of disease in vivo. Very promising results have been obtained after inhibition of cyclophilin (CyP) D with non-immunosuppressive derivatives of cyclosporin A like Alisporvir. CyPD facilitates PTP opening by interacting with subunit OSCP of a key component of the PTP, the mitochondrial ATP synthase. Alisporivir is about to be used in a clinical safety assessment organized with the support of Fondazione Telethon in patients with collagen VI muscular dystrophies. Despite these promising advances, direct PTP inhibitors are needed for four major reasons. First, CyPD is not a core component of the PTP and its inhibition does not completely block pore opening. Second, sensitivity to CyPD inhibitors depends on its expression, which is affected by pathophysiological conditions. Third, interaction with OSCP, hence PTP activation, requires CyPD acetylation that largely depends on the activity of mitochondrial Sirtuin 3. Finally, CyPD inhibitors affect all cellular cyclophilin isoforms, which might lead to undesirable side effects. I will report our progress on highly effective PTP inhibitors identified by high-throughput screening and then optimized by medicinal chemistry yielding a novel class of triazole compounds able to inhibit the PTP with nanomolar potency independent of CyPD expression.

POSTERIOR COLUMN ATAXIA AND RETINITIS PIGMENTOSA: NEW PATHOGENETIC INSIGHTS FROM THE STUDY OF MITOCHONDRIA-ASSOCIATED MEMBRANES

Francesca Bertino[1], Diletta Isabella Zanin Venturini1, Raluca Elena Abalai1, Massimo Bonora2, Paolo P Pinton2, Fiorella Altruda1, Chiara Riganti3, Emanuela Tolosano1 and **Deborah Chiabrando**[1]

[1] Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Turin, Italy
[2]Department of Medical Sciences, Section of Experimental Medicine, Laboratory for Technologies of Advanced Therapies, University of Ferrara, Ferrara, Italy
[3]Department of Oncology, University of Torino, Turin, Italy

PCARP is a childhood-onset, autosomal-recessive, neurodegenerative syndrome with the clinical features of sensory ataxia, pain-insensitivity, and retinitis pigmentosa. More severe manifestations of the disease include congenital hydrocephalus, microcephaly, or epilepsy. The molecular mechanisms responsible for the disease are still elusive and the treatment of patients is mainly symptomatic. PCARP is caused by mutations in the Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor 1 (FLVCR1) gene, encoding a ubiquitously expressed choline/ethanolamine importer. In addition to its role as a transporter, we demonstrated that FLVCR1 interacts with IP3R3-VDAC-GRP75 complex, located on mitochondrial-associated membranes (MAMs) and controlling mitochondrial Ca2+ influx from the ER. This work aims to study the role of MAMs in the pathogenesis of PCARP taking advantage of cellular and animal models of the disease. The analysis of patient-derived fibroblasts showed that distinct pathogenetic FLVCR1 variants impaired the structure and function of MAMs, resulting in bioenergetic failure. Specifically, patients' fibroblasts showed a reduction in the number of mitochondria-ER contact sites, ER to mitochondria Ca2+ fluxes, TCA cycle flux and OXPHOS. Similar impairments in mitochondrial calcium handling and bioenergetics were observed in Flvcr1-knockout neural progenitor cells (NPCs). Interestingly, the overexpression of the mitochondrial calcium uniporter MCU fully restored mitochondrial respiration in both patient-derived fibroblasts and Flvcr1-knockout NPCs, as well as the proliferative defect of Flvcr1-knockout NPCs. Ongoing investigations are focused on sensory neurons differentiated from patient-derived iPSCs and animal models of the disease. Overall, these data point to defective mitochondrial Ca2+ handling and metabolic activity as a key pathogenetic mechanisms driving PCARP and suggest that patients may benefit from therapeutic strategies boosting mitochondrial energetic metabolism.

DYSREGULATION OF LIPID DROPLET DYNAMICS INDUCES MITOCHONDRIAL STRESS AND PROMOTES FIBROSIS, DRIVING THE PROGRESSION OF CHRONIC KIDNEY DISEASE IN LOWE SYNDROME

Francesca Cervellini[1,2], M. Testa[1,3], S. Gagliotta[1,2], L. Caserta[1,2], J. Salzano[1,6], I. Sambri[1,2], L. Cassina[4], E. Polishchuk[1], L. Ferrante[1], S. Montefusco[1], R. De Cegli[1], A. Boletta[2], M.A. De Matteis[1,5], **L. Staiano**[1,6]

1Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli, Naples, Italy;
2Genomic and Experimental Medicine, Scuola superiore meridionale, Naples, Italy;
3European School of Molecular Medicine, Milan, Italy;
4IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy;
5Molecular Medicine and Medical Biotechnologies department, University Federico II, Naples, Italy;
6Institute for Genetic and Biomedical Research, National Research Council (IRGB-CNR), Milan, Italy

Lipid metabolism is essential for energy homeostasis, membranes composition and intracellular signalling. Neutral lipids are stored in the core of Lipid Droplets (LD). In physiological conditions, triglycerides stored in LD are metabolized into fatty acids (FA) by cytosolic lipases and transferred to peroxisomes and mitochondria for beta-oxidation and energy production. Lipids stored in LD are also protected from peroxidation, thus preventing lipotoxicity. Here we show aberrant accumulation of PI4,5P2 in LD membranes in cells lacking the PI4,5P2 5-phosphatase OCRL, which is mutated in Lowe syndrome, a rare genetic disease mainly affecting kidney function. This influences LD dynamics, reduces their consumption and

results in altered trafficking of FA to mitochondria causing impaired mitochondrial function. We also demonstrate that the PI4,5P2 pool on LD is produced in situ by two pathways: i) phosphorylation of PI5P by the PI5P4Kα and ii) local increase of PI4P by the activity of lipid transfer proteins. Excessive PI4,5P2 impact on LD protein composition reducing the level of both ATGL, the main lipase involved in FA metabolism, and of CGI-58, the ATGL co-activator. In parallel, G0S2, a potent endogenous inhibitor of ATGL is increased on PI4,5P2-rich LDs. These phenotypes are hallmarks of chronic kidney disease (CKD) that Lowe patients experience early in their lives. To correlate these pathways with the progression of kidney disease towards CKD in Lowe syndrome we developed kidney organoids from Lowe patients-derived iPSCs, we mimicked aging in vitro and observed, in Lowe organoids, LD accumulation and increased fibrosis, clear signs of CKD. In summary, we described a novel pool of PI4,5P2 on LD regulated by OCRL, that negatively impacts on LD dynamics, FA metabolism and mitochondrial functions. We finally envisage that we can rescue these dysfunctional phenotypes and ameliorate kidney function in Lowe patients by restoring physiological levels of PI4,5P2 on LD.

SESSION 5 - RNA technologies for therapy development

A NEW RNA-BASED THERAPY FOR THE FRAGILE X SYNDROME

C. Bagni[1,2]

[1]Università di Roma "Tor Vergata"
[2]University of Lausanne

The Fragile X Syndrome (FXS) is the most common form of monogenic intellectual disability and autism, caused by the absence of the Fragile X Messenger Ribonucleoprotein (FMRP). Currently, no cure is available for FXS. Recently, mRNA therapeutics have emerged as a novel approach with promising applications in drug development, offering potential treatments for a broad range of diseases, including genetic disorders. Here we used mRNA-based therapy as a new category of compounds for FXS by delivering FMR1 mRNA in both mouse and human cellular models. Using a multidisciplinary approach, we demonstrated that the restoration of FMRP synthesis successfully rescued the key hallmarks of FXS, from molecular to cellular and behavioural abnormalities that include, and not only, upregulated protein synthesis, dendritic spine number and morphology and neuronal spontaneous activity. Finally, intracranial injection of the FMR1 mRNA into the striatum mitigated the synaptic plasticity defects associated with FXS by enhancing the molecular regulation of actin dynamics, known to be affected in the absence of FMRP. Together, these results show a strong potential for the development of an innovative therapeutic intervention for FXS, based on the reintroduction of the FMR1 mRNA in brain cells, with an immediate translational outcome.

MRNA-REPLACEMENT THERAPY FOR GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 1B

Lucia De Stefano[1], Alfonso M. D'Alessio[1,2], Iolanda Boffa[1,3], Edoardo Nusco[1], Paolo G V Martini[4*], Patrick Finn[4], Uma Rajarajacholan[4], Nicola Brunetti-Pierri[1,2,5]

[1]Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)
[2]Scuola Superiore Meridionale (SSM, School of Advanced Studies), Genomics and Experimental Medicine
Program, University of Naples Federico II, Naples, Italy;
[3]Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, Naples, Italy;
[4]Rare Diseases, Moderna, Inc, Cambridge, MA, USA;
[5]Department of Translational Medicine, Federico II University of Naples, Naples, Italy.
[*]Former employee of Moderna.

Glycogen storage disease type 1b (GSD1b) is an inherited metabolic disorder due to deficiency of glucose-6-phosphate transporter (G6PT). GSD1b presents in the first months of life with hypoglycemia, growth retardation, osteoporosis and long-term risk of renal failure and liver cancer. In contrast to Glycogen storage disease type 1a, GSD1b patients also show neutropenia associated with recurrent infections and inflammatory bowel disease. Current treatments for GSD1b include management of hypoglycemia by diet and therapy with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) or the sodium– glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for correction of the neutropenia. However, available treatments are unsatisfactory, and the disease morbidity remains high. Therefore, the development of more effective therapies is highly needed. Therapy with mRNA encapsulated into lipid nanoparticles (LNPs) is emerging as an attractive platform for in vivo gene replacement therapy in several inherited metabolic liver diseases. To investigate the efficacy of mRNA replacement therapy in GSD1b, we generated G6pt-/- mice that were found to have increased perinatal mortality and abundant liver glycogen storage. Intravenous (IV) injections of mRNA encoding G6PT encapsulated into lipid nanoparticles (LNP-G6PT mRNA) performed shortly after birth significantly increased survival of newborn G6pt-/- mice compared to standard IV glucose injections. Surviving adult G6pt-/- mice developed hypoglycemia during fasting that significantly improved after IV injections of LNP-G6PT mRNA. In conclusion, our study provides for the first proof of efficacy of LNP-G6PT mRNA in a preclinical mouse model of GSD1b and this study might pave the way towards the development of a clinical trial for GSD1b patients.

DEVELOPING A STRATEGY TO TARGET AR COACTIVATORS IN PRECLINICAL MODELS OF SBMA

R. Borrella[1], F. Rosada[1], R. Andreotti[2,3], L. Jauze[4,5], L. Nicoletti[6,7], G.P. Stola[6,7], G. Ronzitti[4], Barbara Stella[8], Valeria Chiono[6,7], Maria Pennuto[2,3], **Manuela Basso**[1]

[1]Department of Cellular, Computational and Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy
[2]Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Padova, Italy
[3]Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padova, Italy
[4]Genethon, Evry, France
[5]Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Genethon, Integrare research unit UMR_S951, Evry, France
[6]Department of Mechanical and Aerospace Engineering, Politecnico di Torino, Turin, Turin, Italy
[7]Interuniversity Centre for the Promotion of the 3Rs Principles in Teaching and Research (Centro 3R), Pisa, Italy
[8]Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino, Torino, Italy

Spinobulbar muscular atrophy (SBMA) is caused by CAG expansions in the androgen receptor gene. Androgen binding to polyQ-expanded androgen receptor triggers SBMA through a combination of toxic gain-of-function and loss-of-function mechanisms.

Leveraging cell lines, mice, and patient-derived specimens, we show that androgen receptor co-regulators lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and protein arginine methyltransferase 6(PRMT6) are overexpressed in an androgen-dependent manner, specifically in the skeletal muscle of SBMA patients and mice. LSD1 and PRMT6 cooperatively and synergistically transactivate the androgen receptor, and their effect is enhanced by expanded polyQ. Pharmacological and genetic silencing of LSD1 and PRMT6 attenuates polyQ-expanded androgen receptor transactivation in SBMA cells and suppresses toxicity in SBMA flies, and a preclinical approach based on miRNA-mediated silencing of LSD1 and PRMT6 attenuates disease manifestations in SBMA mice. These observations suggest that targeting overexpressed co-regulators can attenuate androgen receptor toxic gain-of-function without exacerbating loss-of-function, highlighting a potential therapeutic strategy for patients with SBMA. To ameliorate the preclinical strategy, we are testing the effects of muscle-specific adeno-associated viruses (AAVs), and nanoparticle (NP)-mediated delivery of Lsd1 and Prmt6-targeting artificial miRNAs to evaluate the best pre-clinical strategy to employ in future therapeutic developments.

SESSION 6 - Innovative therapeutic approaches

A MEMBRANE-TARGETED PHOTOSWITCH RESTORES PHYSIOLOGICAL ON/OFF RESPONSES TO LIGHT IN THE DEGENERATE RETINA

F. Benfenati[1,2,3], S. Di Marco[1,2,3]

[1]*Center for Synaptic Neuroscience and Technology, Istituto Italiano di Tecnologia (Genova)*
[2]*IRCCS Ospedale Policlinico San Martino (Genova)*
[3]*Department of Experimental Medicine, University of Genova (Genova)*

The lack of effective therapies for visual restoration in Retinitis pigmentosa has pushed to pioneer therapeutical strategies to replace dead photoreceptors, including optogenetics and retinal prostheses. However, the resulting visual restoration is poor mainly because of the massive light-evoked activation of retinal neurons, irrespective of the physiological segregation of visual information in the ON and OFF pathways responsible for contrast sensitivity and spatial resolution. Here, we show that a recently characterized membrane-targeted photoswitch, Ziapin2, which intercalates within the neuronal membrane and bidirectionally modulates its capacitance and excitability, is capable of reinstating, in degenerate retinas, the complexity of the physiological responses to light stimuli that are implemented by a healthy retina. We tested the ex vivo effects of Ziapin2 on blind retinal explants from rd10 mice and RCS rats, two distinct genetic models of photoreceptor degeneration, by recording light-evoked responses from retinal ganglion cells (RGCs) with patch-clamp and high-density multielectrode arrays. Thanks to its dual effect on intrinsic excitability, Ziapin2 reinstated brisk and sluggish ON, OFF, and ON-OFF responses in RGCs evoked by full-field or patterned stimuli, accompanied by the reactivation of excitatory and inhibitory conductances impinging on RGCs. Pharmacological dissection of retinal processing revealed that the light-dependent effects of Ziapin2 occurred at the bipolar cell level, followed by reactivation of light computation in the entire retinal network. When tested in vivo, a single intravitreal injection of Ziapin2 restored light-driven behavior and optomotor reflexes in fully blind 6-month-old rd10 mice, activating distinct RGC populations similar to sighted animals. The results indicate that Ziapin2 is a promising molecule for reinstating physiological visual responses at late stages of retinal degeneration.

A PIPELINE FOR DRUG DISCOVERY IN LOWE SYNDROME

Leopoldo Staiano[1,2], **Antonella De Matteis**[1,3]

[1]*Telethon Institute of Genetics and Medicine (Pozzuoli)*
[2]*Institute of Genetic and Biomedical Research-IRGB, CNR*
[3]*University of Naples, Federico II (Naples)*

Lowe syndrome (LS) is an X linked disease that is characterized by congenital cataracts, central hypotonia, intellectual disability, and renal Fanconi syndrome. The disease is caused by mutations in OCRL, which encodes an inositol polyphosphate 5 phosphatase (OCRL) that acts on phosphoinositides (PIs) — quantitatively minor constituents of cell membranes that are nonetheless pivotal regulators of intracellular trafficking. I will discuss how our studies on OCRL not only have led to important discoveries about the basic mechanisms operating along the endolysosome membrane trafficking pathway but have also set the basis for a drug discovery program. This program, started with a high content screening approach on cell models of LS, has led to the identification of a small molecule that is able to correct the main phenotypes in LS patient proximal tubule cells, and more importantly, in LS animal models and in LS patient kidney organoids is going to be tested in a clinical trial on LS patients.

CLASSIFICATION AND RESCUE OF HCN1 MUTATIONS IN EIEE PATIENTS

R. Castelli[1], A. Sharifzadeh[1], A. Saponaro[1], A. Porro[1], G. Thiel[2], C. Marini[4], C. Depienne[3], B. Santoro[5], and **A. Moroni**[1]

[1]*Università degli Studi di Milano*
[2]*Ospedali Riuniti Ancona, Ancona*
[3]*TU-Darmstadt, Darmstadt, Germany*
[4]*University Hospital Essen, Essen, Germany*
[5]*Columbia University, NYC, USA*

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) is a severe brain disorder with poor prognosis and no adequate therapies characterized by recurrent intractable seizures in newborn and infants. EIEE-causing mutations are found in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel 1 (HCN1), a voltage gated channel widely expressed in the central nervous system (CNS). HCN1 mutations faithfully reproduce in mice the epileptic phenotype of the patients, further prompting the development of antiepileptic drugs that specifically target HCN1 channels. To this end, we combined our expertise in channel biophysics and structural biology to classify a continuously increasing number of HCN1 mutations into four functional classes assigning their phenotypes in terms of altered molecular mechanisms. This precise knowledge of HCN1 dysfunctions and their systematic classification led to the identification of a proper pharmacological treatment for three of the four classes. The identified treatments include peptide tools, nanobodies and small molecules, developed during the project, that are able to correct mutation-induced defects restoring proper channel function. Our work lays the ground for a precision medicine approach for HCN1 epilepsy and provides robust indications and innovative tools to clinicians for the treatment of individual patients.

1

Genetic developmental defect during embryogenesis

14q12 microdeletion syndrome

22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)

IMPAIRED MITOCHONDRIAL BIOGENESIS IN THE DEVELOPING ASTROCYTES CONTRIBUTES TO THE PATHOPHYSIOLOGY OF 22Q11 DELETION SYNDROME

I. Cantando[1], Bezzi Paola[2]

[1]Rome, University of lausanne
[2]Rome, Università Di Roma La Sapienza

Project: GGP20037; Bezzi Paola

The 22q11 deletion syndrome (22q11DS), caused by a 1.5-3 Mb microdeletion on chromosome 22, is characterized by neuropsychiatric symptoms such as psychosis and cognitive deficits. Six deleted genes (Prodh, Slc25a1, Mrpl40, Zdhhc8, T10, Txnrd2) encode mitochondrial proteins, and mitochondrial dysfunctions have been reported in both mice models and patients (Carrera et al., 2012; Fernandez et al., 2019). While 22q11DS has mainly been studied from a neuronal perspective, emerging evidence suggests that astrocytes also play a crucial role in postnatal cortical maturation (Allen and Eroglu, 2017). Notably, PRODH, one of the deleted genes, is enriched in astrocytes (Zhang et al., 2016; Cahoy et al., 2008). In this study, we show that mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation (oxPhos) genes (PGC1α, PGC1β, Esrra, Cox5b, Cox41l, Atp5a1, Cycs) are downregulated in the prefrontal cortex (PFC) of a mouse model of 22q11DS (LgDel: Meechan et al., 2009). Functional assays revealed decreased ATP levels and oxygen consumption (OCR) in LgDel mice, particularly in mixed neuronal cultures containing >40% astrocytes. Interestingly, pure astrocyte cultures also exhibited metabolic deficits, suggesting that astrocytes in LgDel mice have mitochondrial dysfunction. PRODH, highly expressed in PFC astrocytes, regulates PGC1α levels and metabolic properties. Restoring normal PRODH and PGC1α levels in astrocytes rescued cortical development and synapse formation in LgDel mice. These findings highlight astrocytes' pivotal role in cortical development defects in 22q11DS and suggest that modulating astrocytic PGC1α could prevent disease progression.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome da microdelezione 14q12; Monosomia 14q12;

Sindrome da microdelezione 22q11.2; sindrome di DiGeorge; Monosomia q11.2; Sindrome velo-cardio-facciale

MITOCONDRI DIFETTOSI NEGLI ASTROCITI IN VIA DI SVILUPPO CONTRIBUISCONO ALLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DA DELEZIONE DEL CROMOSOMA 22Q11.

La sindrome da delezione del cromosoma 22q11 (22q11DS), causata da una microdelezione di 1,5-3 Mb sul cromosoma 22, è caratterizzata da sintomi neuropsichiatrici come psicosi e deficit cognitivi. Sei dei geni eliminati (Prodh, Slc25a1, Mrpl40, Zdhhc8, T10, Txnrd2) codificano proteine mitocondriali, e sono stati riportati difetti mitocondriali sia nei modelli murini che nei pazienti (Carrera et al., 2012; Fernandez et al., 2019). Sebbene la 22q11DS sia stata principalmente studiata da una prospettiva neuronale, crescenti evidenze suggeriscono che anche gli astrociti giochino un ruolo cruciale nella maturazione corticale postnatale (Allen and Eroglu, 2017). In particolare, PRODH, uno dei geni eliminati, è abbondantemente espresso negli astrociti (Zhang et al., 2016; Cahoy et al., 2008). In questo studio, dimostriamo che i geni coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nella fosforilazione ossidativa (oxPhos) (PGC1α, PGC1β, Esrra, Cox5b, Cox41l, Atp5a1, Cycs) sono sotto-regolati nella corteccia prefrontale (PFC) di un modello murino di 22q11DS (LgDel: Meechan et al., 2009). Gli esperimenti funzionali hanno rivelato livelli ridotti di ATP e di consumo di ossigeno (OCR) nei topi LgDel, in particolare nelle colture miste di neuroni contenenti >40% di astrociti. Curiosamente, anche le colture pure di astrociti hanno mostrato deficit metabolici, suggerendo che gli astrociti nei topi LgDel presentano disfunzioni mitocondriali. PRODH, altamente espresso negli astrociti della PFC, regola i livelli di PGC1α e le proprietà metaboliche degli astrociti. Il ripristino dei livelli normali di PRODH e PGC1α negli astrociti ha ripristinato lo sviluppo corticale e la formazione delle sinapsi nei topi LgDel. Questi risultati evidenziano il ruolo fondamentale degli astrociti nei difetti dello sviluppo corticale nella 22q11DS e suggeriscono che la modulazione di PGC1α astroctico potrebbe prevenire la progressione della malattia.

2

Genetic developmental defect during embryogenesis

22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)

MECHANISMS OF CARDIOPHARYNGEAL DIFFERENTIATION: PATHOGENESIS AND RESCUE OF THE DIGEORGE SYNDROME PHENOTYPE.

Baldini Antonio[1], O. Lanzetta[2], M. Bilio[2], R. Ferrentino[2], I. Aurigemma[3],E. Illingworth[3], C. Angelini[2]

[1]Naples, Università Di Napoli Federico II
[2]Naples, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[3]Fisciano, Università Di Salerno

Project: GMR22T1012; Baldini Antonio

The Tbx1 gene is essential for the development and morphogenesis of the cardiopharyngeal mesoderm (CPM), which includes multipotent cell progenitors of the second heart field and branchiomeric muscles. Reduced dosage of Tbx1 affects CPM development and it is the basis of the DiGeorge syndrome-like phenotype in mice. We found that in mouse models, this phenotype can be ameliorated by LSD1 inhibitors, p53 suppression, Vitamin B12, and Minoxidil. None of these treatments resulted in a complete rescue, highlighting the need for more extensive mechanistic studies and the identification of more responsive drug targets. We are using novel, bio-computational and machine learning approaches to investigate developmental functions of TBX1. In a differentiation model of CPM, we performed single-nucleus RNA-seq and ATAC-seq at two stages of differentiation. We identified cell type-specific gene modules, rather than individual genes, involved in CPM differentiation and measured the quantitative effect of Tbx1 loss of function on aggregate expression of modules

and their chromatin accessibility. RNA velocity-based analysis was used to infer the directionality of cell state transitions. We found that TBX1 regulates chromatin accessibility and gene expression of modules in early differentiating cells, including an evolutionarily conserved module crucial for the development of the trunk and pharynx. Analysis of regulatory regions identified using machine-learning, suggested that TBX1 regulates the module via SIX transcription factors. Unexpectedly, we observed that a subset of mesodermal cells lacking TBX1 activates an epithelial profile and extra cellular matrix genes. Thus, loss of TBX1 restricts access to critical CPM developmental genes and changes cell fate trajectories within the CPM. These results likely explain the partial efficacy of Minoxidil, which targets the ECM, but also highlight the need to intervene upstream to increase the effectiveness of the treatment.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome da microdelezione 22q11.2; sindrome di DiGeorge; Monosomia q11.2; Sindrome velo-cardio-facciale

MECCANISMI DI DIFFERENZIAMENTO CARDIOFARINGEO: PATOGENESI E RECUPERO DEL FENOTIPO DELLA SINDROME DI DIGEORGE

Il gene Tbx1 è essenziale per lo sviluppo del mesoderma cardiofaringeo (CPM), costituito da progenitori multipotenti cardiaci e branchiomerici. Ridotto dosaggio di Tbx1 compromette il CPM e causa anomalie di sviluppo nella sindrome di DiGeorge. Nel topo, abbiamo dimostrato che queste anomalie sono attenuate da inibitori di LSD1, soppressione di p53, vitamina B12, o Minoxidil. Questi trattamenti hanno efficacia parziale, evidenziando la necessità di identificare nuovi bersagli molecolari. In questo progetto, usiamo nuovi approcci bio-computazionali di apprendimento-macchina per indagare le funzioni di Tbx1. In un modello di differenziamento del CPM, abbiamo ottenuto dati di espressione genica e accessibilità cromatinica a livello di singola cellula. Abbiamo identificato moduli genici, invece di geni singoli, specifici per tipo cellulare nel differenziamento del CPM e misurato l'effetto quantitativo della perdita di Tbx1 sull'espressione genica aggregata e accessibilità cromatinica. Abbiamo inoltre indagato l'effetto di TBX1 sulla traiettoria differenziativa. Abbiamo scoperto che TBX1 regola l'accessibilità cromatinica e l'espressione genica di moduli attivi nel differenziamento precoce, incluso un modulo evolutivamente conservato cruciale per lo sviluppo del tronco e della faringe. L'analisi di enhancers identificati tramite apprendimento-macchina, ha suggerito che TBX1 regola il modulo attraverso i fattori di trascrizione SIX. Inaspettatamente, abbiamo osservato che un sottoinsieme di cellule mesodermiche, in assenza di TBX1 assume un profilo parzialmente epiteliale e attiva geni della matrice extracellulare (ECM). Pertanto, la perdita di TBX1 limita l'accesso a geni cruciali per lo sviluppo del CPM e provoca una parziale deriva differenziativa nel CPM. Questi risultati spiegano il miglioramento prodotto dal Minoxidil, che agisce su alterazioni dell'ECM, ma evidenziano anche la necessità di intervenire a monte per incrementare l'efficacia del trattamento.

3

Genetic developmental defect during embryogenesis

22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)

MITOCHONDRIAL DYSFUNCTIONS IN 22Q11 DELETION SYNDROME: A NOVEL TARGET FOR THERAPEUTIC INTERVENTION

Cantando Iva[1], T. Zehnder[1], A. Laugeray[1], E.C. De Oliveira Figueiredo[1], T.L. Lewis[2], D. Rossi[3], K. Richetin[1], N. Deglon[1], J. Gogos[5], C. Bagni[1], M. Mameli[1],F. Polleux[4], P. Bezzi[5]

[1]Lausanne, Department of Fundamental Neurosciences (DNF), UNIL, Lausanne, Switzerland
[2]USA, Aging & Metabolism Program, Oklahoma Medical Research Foundation, USA
[3]Pavia, Maugeri Foundation, UNIPV, Italy
[4] New York, Dept of Neuroscience, Mortimer B. Zuckerman MBB inst
[5] Roma, Università Di Roma La Sapienza

Project: GGP20037; Bezzi Paola

22q11 deletion syndrome (22q11DS) is a severe neuropsychiatric disorder resulting from a hemizygous 1.5-3 Mb microdeletion on chromosome 22, which profoundly impacts cortical neuron development in the prefrontal cortex (PFC), leading to psychosis and cognitive deficits (Karayiorgou et al., Nature Rev Neurosci., 2010). This deletion includes genes crucial for mitochondrial (mito) function. Studies in both mouse models and patients with 22q11DS have identified mito dysfunctions (Fernandez et al., Neuron, 2019), though their direct role in neurodevelopmental abnormalities remains unclear. To explore this, we performed single-cell RNA-seq on the PFC of 22q11DS mouse models at postnatal day 14 (P14) (LgDel: Meechan et al., PNAS, 2009). We identified 490 differentially expressed genes (DEGs), with 207 upregulated, many involved in mito function, neuronal excitability, and maturation, similar to findings in patient-derived organoids (Kan et al., Nature Med., 2021) and prior mouse studies (Sun et al., Transl Psy., 2021). Notably, a subset of upregulated genes was linked to apoptosis, with BAX being the most prominent. Despite this, immunohistochemical analysis at P14 showed no apoptotic cell death, suggesting that mito dysfunction and BAX upregulation might trigger incomplete mito outer membrane permeabilization (MOMP) and sub-lethal caspase activation (Victorelli et al., Nature, 2023). Further investigation confirmed sub-lethal apoptosis in the developing PFC of LgDel mice. To counteract this, we designed a TAT-peptide incorporating the BH4 domain of Bcl-XL and administered it chronically to LgDel mice. This treatment significantly rescued both cellular dysfunction and cognitive impairments, highlighting a novel therapeutic approach targeting sub-lethal mito apoptosis. This research provides new insights into mito dysfunction in 22q11DS and suggests potential therapeutic avenues.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome da microdelezione 22q11.2; sindrome di DiGeorge; Monosomia q11.2; Sindrome velo-cardio-facciale

DISFUNZIONI MITOCONDRIALI NELLA SINDROME DA DELEZIONE 22Q11: UN NUOVO TARGET PER LE STRATEGIE TERAPEUTICHE

La Sindrome da Delezione 22q11 è un grave disturbo neuropsichiatrico causato da una microdelezione emizigote di 1.5-3 Mb sul cromosoma 22, che ha un impatto profondo sullo sviluppo dei neuroni corticali nella corteccia prefrontale (PFC), portando a psicosi e deficit cognitivi. Questa delezione include geni cruciali per la funzione mitocondriale (mito). Studi condotti sia su modelli murini che su pazienti con 22q11DS hanno identificato disfunzioni mitocondriali, sebbene il loro ruolo diretto nelle anomalie dello sviluppo neuronale rimanga poco chiaro. Per esplorare questo aspetto, abbiamo effettuato ScRNA-seq sulla PFC di modelli murini 22q11DS al giorno postnatale 14 (P14). Abbiamo identificato 490 geni con espressione differenziale, di cui 207 sovraregolati, molti dei quali coinvolti nella funzione mitocondriale, nell'eccitabilità neuronale e nella maturazione, in modo simile a quanto osservato negli organoidi derivati da pazienti e in precedenti studi su modelli

murini. In particolare, un sottogruppo di geni sovraregolati era associato all'apoptosi, con BAX come elemento più prominente. Tuttavia, l'analisi immunoistochimica a P14 non ha evidenziato morte cellulare apoptotica, suggerendo che la disfunzione mitocondriale e la sovraregolazione di BAX potrebbero innescare una permeabilizzazione incompleta della membrana mitocondriale esterna (MOMP) e un'attivazione caspasica sub-letale. Ulteriori analisi hanno confermato la presenza di apoptosi sub-letale nella PFC in via di sviluppo dei topi LgDel. Per contrastare questo fenomeno, abbiamo progettato un TAT-peptide contenente il dominio BH4 di Bcl-XL, somministrandolo cronicamente ai topi LgDel. Questo trattamento ha significativamente migliorato sia la disfunzione cellulare che i deficit cognitivi, evidenziando un nuovo approccio terapeutico mirato all'apoptosi mitocondriale sub-letale. Questa ricerca fornisce nuove intuizioni sulle disfunzioni mitocondriali nella 22q11DS e suggerisce possibili strategie terapeutiche

4

Genetic developmental defect during embryogenesis

22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)

OXYTOCIN SEALS THE BRAIN BARRIERS AMELIORATING THE IMMUNE-BEHAVIORAL TRAJECTORIES IN 22Q11.2 DELETION SYNDROME

Papaleo Francesco[1]

[1]*Genova, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)*

Project: GMR23T1196; Papaleo Francesco

The nexus of genetic susceptibility and immunological alterations in neurodevelopmental disorders remains limited. Here, we investigated the 22q11.2 hemideletion, a prominent genetic factor in psychiatric disorders, focusing on its interplay with immunity. Using 22q11.2 hemideleted mice (LgDel/+), we pinpointed adolescence as pivotal for behavioral and cortical anomalies, tied to Treg deficiency, microglial inflammatory activation, and cerebral myeloid cell infiltration. Oxytocin (OXT) perinatal supplementation prevented the development of sensorimotor gating and social deficits and attenuated both peripheral and brain inflammatory phenotypes in LgDel/+ mice. This was related to a long-lasting effect of OXT in upregulating the expression of tight junction molecules Claudin-5 and Claudin-1, reducing the permeability of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers. Our findings illuminate intricate genetic-immune interplay in aberrant behavioral development, clarifying OXT's therapeutic potential.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome da microdelezione 22q11.2; sindrome di DiGeorge; Monosomia q11.2; Sindrome velo-cardio-facciale

L'OSSITOCINA CHIUDE LE BARRIERE CEREBRALI MIGLIORANDO LE TRAIETTORIE DI SVILUPPO NELLA SINDROME DA DELEZIONE 22Q11.2

Il nesso tra suscettibilità genetica e alterazioni immunologiche nei disturbi dello sviluppo neurologico rimane limitato. In questo studio abbiamo studiato l'emidelezione 22q11.2, un importante fattore genetico nei disturbi psichiatrici, concentrandoci sulla sua interazione con il sistema immunitario. Utilizzando topi emideleti 22q11.2 (LgDel/+), abbiamo individuato l'adolescenza come fase cruciale per le anomalie comportamentali e corticali, legate alla carenza di cellule Treg, all'attivazione infiammatoria della microglia e all'infiltrazione delle cellule mieloidi nel cervello. L'integrazione perinatale di ossitocina (OXT) ha prevenuto lo sviluppo di deficit sensomotori e sociali e ha attenuato i fenotipi infiammatori periferici e cerebrali nei topi LgDel/+. Ciò è stato correlato all'effetto duraturo dell'OXT nel regolare positivamente l'espressione delle molecole Claudin-5 e Claudin-1, riducendo la permeabilità delle barriere emato-encefalica e del liquido emato-cerebrospinale. I nostri risultati mettono in luce l'intricata interazione genetico-immunitaria nello sviluppo comportamentale nella sindrome 22q11.2, chiarendo il potenziale terapeutico dell'OXT.

5

Genetic developmental defect during embryogenesis

Beckwith-Wiedemann syndrome

EXPLORING THE ROLE OF THE MATERNAL-EFFECT PADI6 GENE IN EARLY MOUSE EMBRYOGENESIS

Giaccari Carlo[1], **A. Pagano**[1], **F. Cecere**[2], **A. Riccio**[1]

[1]*Naples, Università Degli Studi Della Campania Luigi Vanvitelli*
[2] *Naples, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche*

Project: GMR23T1062; Riccio Andrea

PADI6 belongs to the multi-protein sub-cortical maternal complex (SCMC) that is present specifically in mammalian oocytes and early embryos. Maternal inactivation of SCMC genes generally results in early embryo lethality. In humans, variants in a subset of SCMC genes have been found in the healthy mothers of children affected by genomic imprinting disorders and characterized by multi-locus imprinting disturbances (MLID). However, how the SCMC controls the DNA methylation required to regulate imprinting remains poorly defined. To address this issue, we generated a mouse line carrying a Padi6 missense variant that had been identified in the mother of two sisters affected by Beckwith-Wiedemann syndrome and MLID. We found that if homozygous in female mice this variant resulted in interruption of embryo development at the 2-cell stage. Singlecell DNA methylation and RNA analyses demonstrated failure of post-zygotic demethylation and zygotic genome activation (ZGA) in 2-cell embryos from homozygous females. Immunofluorescence analysis showed abnormal localization of DNMT1 and UHRF1 in mutant oocytes and zygotes, indicating a possible cause for the failure of epigenetic reprogramming. Rare blastocysts derived from mutant females and surviving the 2-cell stage were successfully implanted in utero, but failed to develop further. RNA-seq analysis of the maternal mutant embryos demonstrated deregulation of genes involved in differentiation of extra-embryonic cell types. Taken together, this study demonstrates that the maternal PADI6 gene controls several critical events in early mouse embryogenesis including ZGA and differentiation of extraembryonic cell lineages.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Beckwith-Wiedemann;Sindrome di Wiedemann-Beckwith; BWS

ANALISI DEL RUOLO DEL GENE A EFFETTO MATERNO PADI6 NELL'EMBRIOGENESI PRECOCE MURINA

PADI6 fa parte del complesso multiproteico denominato complesso subcorticale materno (SCMC) che è presente esclusivamente negli ovociti e negli embrioni preimpianti dei mammiferi. L'inattivazione materna dei geni di questo complesso generalmente è associata a letalità dell'embrione. Negli umani, sono state individuate varianti di alcuni geni codificanti per il SCMC in madri sane con prole affetta da disordini dell'imprinting genomico e difetti di metilazione in loci multipli (MLID). Rimane tuttora ignoto come il SCMC possa regolare la metilazione del DNA e l'imprinting genomico. Per far luce su questo meccanismo, abbiamo generato una linea murina portatrice di una variante missenso identificata in una madre di due sorelle affetta dalla sindrome di Beckwith-Wiedemann e MLID. Le femmine portatrici della variante in omozigosi mostrano infertilità dovuta all'interruzione dello sviluppo embrionale nella fase a 2 cellule. Le analisi a singola cellula della metilazione del DNA e dell'espressione genica, in embrioni a 2 cellule ottenuti da madri omozigoti, ha mostrato la mancata demetilazione post-zigotica e un'alterazione nell'attivazione del genoma zigotico (ZGA). Tramite immunofluorescenza è stata individuata un'anormale localizzazione di DNMT1 e UHRF1 negli ovociti ed embrioni mutanti, che potrebbe essere una delle causa di queste alterazioni epigenetiche. Un ristretto numero di embrioni è stato in grado di superato la fase a 2 cellule, raggiungendo lo stadio di blastocisti. Questi embrioni, nonostante siano state in grado di impiantarsi in utero, non riescono a proseguire nello sviluppo embrionale. Le analisi di espressione genica di questi embrioni mutanti ha mostrato la deregolazione di geni coinvolti nel differenziamento dei tipi cellulari extra-embrionali. Nel complesso, questo studio dimostra che il gene PADI6 materno controlla diversi eventi dell'embriogenesi preimpianto murina, tra cui la ZGA e il differenziamento dei tessuti extraembrionali.

6

Genetic developmental defect during embryogenesis

Catel-Manzke syndrome

GENERATION OF A TGDS KNOCK-OUT ZEBRAFISH MODEL TO STUDY THE DEVELOPMENTAL DEFECTS IN CATEL-MANZKE SYNDROME

G. Casucci[1], D. Bellitto[1], E. Asgari[1], M.R. Coppola[1], M. Bozzo[1], V. Bazzurro[1], S. Candiani[1], M. Tonetti[1]

[1] Genova, Università Di Genova

Project: GMR22T1065; Tonetti Michela

Catel-Manzke syndrome (CMS) is a rare recessive disorder characterized by skeletal and heart malformations due to mutations in the TGDS gene. TGDS is annotated as dTDP-glucose 4,6 dehydratase, because of its homology with the bacterial enzymes of the dTDP-L-rhamnose biosynthesis; however, this pathway was never reported in vertebrates. CMS clinical presentation led to the proposal that TGDS might have a role in glycosaminoglycan formation, but biochemical evidence is lacking and TGDS function remains unknown. Since TGDS is very well conserved during evolution, to address the developmental defects caused by its deficiency, we have developed an F0 zebrafish knock-out model using CRISPR/Cas9. Three sgRNAs targeting different tgds exons were used to form RNP complexes with Cas9. The 3 RNPs mix was injected into the zygotes to obtain F0 biallelic knockouts. Abnormal phenotypes were observed from 24- 48 hpf: they ranged from aberrant head and axial development to less severe skeletal, eye and otic vesicle defects and pericardial edema with venous congestion. These localizations are consistent with the tgds transcript expression determined by ISH. These findings indicate that tgds gene as a role in the early morphogenetic events. No significant phenotypes were seen in the larvae injected with the negative control RNP, thus excluding that the morphological alterations are due to the injection or non-specific Cas9 activity. Genotyping demonstrated that injecting more sgRNA together leads to the formation of large genome deletions between the targeted exons, consistent with previous reports. Mosaicism was observed, as anticipated. Our results suggest that transgenic zebrafish can be a valuable model for delineating tgds function in vertebrates and analyzing the molecular events underlying CMS pathogenesis. We are currently developing a stable line, which will allow more precise morphological, biochemical, and molecular analyses of the phenotypes of the knock-out animals.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Catel-Manzke; Sequenza di Pierre Robin - iperfalangia - clinodattilia; Sindrome palatodigitale, tipo Catel-Manzke; Sindrome digitale con micrognatia;

GENERAZIONE DI UN MODELLO KNOCK-OUT PER IL GENE TGDS IN ZEBRAFISH PER LO STUDIO DEI DIFETTI DI SVILUPPO DELLA SINDROME DI CATEL-MANZKE

La Sindrome di Catel-Manzel (CMS) è una malattia genetica recessiva molto rara caratterizzata da difetti nello sviluppo scheletrico e dalla presenza di malformazioni cardiache. Il gene coinvolto è TGDS; tuttavia la funzione di TGDS nell'uomo è ancora sconosciuta. Dal momento che le manifestazioni cliniche della malattia nei pazienti si manifestano già durante lo sviluppo embrionale, parte del nostro progetto è dedicato allo sviluppo di un modello knock-out del gene TGDS in zebrafish (pesce zebra). Lo zebrafish è un piccolo pesce della famiglia dei Ciprinidi, ampiamente utilizzato negli acquari. Nell'ambito della ricerca rappresenta un modello molto versatile per studiare le alterazioni nell'embriogenesi, dal momento che lo sviluppo è abbastanza simile tra zebrafish e mammiferi. Lo sviluppo esterno e l'aspetto trasparente delle larve, facilmente visibili al microscopio, e il grande numero di animali che si possono ottenere da ogni accoppiamento rendono questo modello più semplice rispetto all'utilizzo del topo. Inoltre TGDS è molto ben conservato durante l'evoluzione e gli amminoacidi mutati nei pazienti sono anche presenti nella proteina dello zebrafish. Per inattivare il gene abbiamo utilizzato la tecnologia CRISPR/Cas9. I dati preliminari ottenuti nella prima parte dello studio hanno dimostrato che l'inattivazione del gene TGDS porta a fenotipi di varia gravità negli embrioni, con evidenti alterazioni morfologiche, e suggeriscono quindi che zebrafish possa essere un buon modello per comprendere il ruolo funzionale di TGDS e per lo studio della patogenesi della CMS. Studi sono in corso per generare una linea di zebrafish knock-out stabile in modo da poter effettuare analisi più precise a livello fenotipico, biochimico e molecolare.

7

Genetic developmental defect during embryogenesis

Joubert syndrome

A FUNCTIONAL IN VITRO ASSAY TO ASSESS THE PATHOGENICITY OF MISSENSE VARIANTS IN PATIENTS WITH JOUBERT SYNDROME.

Mazzotta Concetta[1],
M. Dapelo[1], V. Serpieri[1], M.G. Spatafora[1], M. Peviani[1]
F. Hoffmann[2],F. D'Abrusco[3], E.M. Valente[3]

[1]Pavia, Università Di Pavia
[2] Pavia, University of Tubingen
[3] Pavia, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino - IRCCS

Project: GGP20070; Valente Enza Maria

Joubert Syndrome (JS) is a mostly recessively inherited ciliopathy characterized by a mid-hindbrain malformation, the “molar tooth sign”. Over 40 causative genes, all encoding primary cilium proteins, are identified, with 5 major genes-CPLANE1, CC2D2A, AHI1, CEP290, TMEM67-accounting for half of JS cases. To date, up to 10-30% of patients lack a definite genetic diagnosis. A significant subset of these cases involves missense variants classified as “variants of unknown significance” (VUS) by ACMG criteria. This project aims to develop an in vitro functional assay to quantitatively assess the pathogenicity of missense variants in JS genes, starting from CC2D2A. CC2D2A expression was knocked-down (KD) in IMCD-3 cells via shRNA lentiviral transduction, followed by two-weeks antibiotic selection. A plasmid expressing either wild-type (wt) CC2D2A or engineered to insert 5 patient-specific variants (2 pathogenic and 3 VUS), was transfected into CC2D2A-KD cells using Lipofectamine. Ciliogenesis and ciliary length were measured after 24h starvation by immunofluorescence with ciliary markers γ-tubulin and acetylated-tubulin, using ImageJ plug-ins. Upon starvation, compared to control cells, CC2D2A-KD cells showed a significantly reduced ciliogenesis (mean±SD: 72±1,9% vs 51±0,4%, p<0,01), and shorter primary cilia (3,4±0,3µm vs 2,1±0,2µm, p<0,01). Transfection of KD cells with wt CC2D2A resulted in a complete rescue both of the percentage of ciliated cells and ciliary length, while constructs carrying pathogenic or VUS variants variably failed to fully restore the phenotype. Bioinformatic studies, including in silico predictions and protein modeling, are underway to develop a predictive algorithm which can best align with functional results. These preliminary results pave the way for the development of simple in vitro assays to assess the functional impact of missense variants in patients with JS, allowing VUS reclassification and improvement of the diagnostic yield.

Difetti genetici dello sviluppo durante l’embriogenesi

Sindrome di Joubert; SJ; JS; Disturbo cerebelloparenchimale IV; CPD IV

UN MODELLO FUNZIONALE IN VITRO PER VALUTARE LA PATOGENICITÀ DELLE VARIANTI MISSENSO NEI PAZIENTI CON SINDROME DI JOUBERT.

La Sindrome di Joubert (JS) è una ciliopatia principalmente a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da una distinta malformazione del mesencefalo-metencefalo. Sono noti oltre 40 geni causativi, tutti codificanti proteine del cilio primario; 5 geni principali-CPLANE1, CC2D2A, AHI1, CEP290, TMEM67-rappresentano circa la metà dei casi di JS. Ad oggi, il 10-30% dei pazienti non riceve una diagnosi genetica certa, e molti di questi casi riguardano varianti missenso classificate come “varianti di significato incerto” (VUS) secondo i criteri ACMG. Questo progetto mira a sviluppare un modello funzionale in vitro per valutare la patogenicità delle varianti missenso nei geni associati a JS, partendo da CC2D2A. L’espressione di CC2D2A è stata silenziata (KD) in cellule IMCD-3 tramite trasduzione lentivirale con shRNA. Un plasmide esprimente CC2D2A wild-type (wt) o modificato per inserire 5 varianti specifiche (2 patogeniche e 3 VUS) è stato trasfettato nelle cellule KD. La ciliogenesi e la lunghezza del cilio primario sono state misurate dopo 24 ore di starvation mediante immunofluorescenza con marker ciliari γ-tubulina e tubulina acetilata e analizzate con ImageJ. Rispetto al controllo, le cellule KD mostrano una ciliogenesi significativamente ridotta (media±DS: 72±1,9% vs 51±0,4%, p<0,01) e cilia più corte (3,4±0,3µm vs 2,1±0,2µm, p<0,01). La trasfezione con CC2D2A wt ha completamente ripristinato sia la percentuale di cellule ciliate sia la lunghezza delle cilia, mentre i costrutti con varianti patogeniche o VUS non hanno ripristinato, in maniera variabile, il fenotipo. Studi bioinformatici, incluse predizioni in silico e modeling proteico, sono in corso per sviluppare un algoritmo predittivo in grado di correlare con i risultati funzionali. Questi dati preliminari supportano lo sviluppo di modelli in vitro utili a valutare l’impatto funzionale delle varianti missenso nei pazienti con JS, consentendo la classificazione delle VUS e migliorando la resa diagnostica

8

Genetic developmental defect during embryogenesis

Joubert syndrome

THE LIPID-BINDING CHAPERONE PDE6?, MUTATED IN JOUBERT SYNDROME-22, CONTROLS SPATIALLY-RESTRICTED PROTEIN DEGRADATION.

Citterio Giulia[1], A. Lauriola[1], D. Guardavaccaro[1]

[1]Verona, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona

Project: GMR22T1088; Guardavaccaro Daniele

The Joubert syndrome (JBTS) is a rare neurodevelopmental disorder characterized by hypoplasia of the cerebellar vermis, skeleton defects, renal abnormalities, and retinal dystrophy. Mutations of approximately 30 genes have been found responsible for JS. It has been recently shown that homozygous mutation in the PDE6δ gene, which encodes for a lipid-binding chaperone implicated in RAS-mediated oncogenesis, causes a JS subtype known as Joubert syndrome-22 (JBTS22). The overall objective of this project is to study the pathophysiological mechanism underlying JBTS22. We found that PDE6δ interacts with prenylated FBXL2, the substrate receptor subunit of the SCF-FBXL2 ubiquitin ligase, controlling FBXL2 delivery to specific membrane compartments and FBXL2-mediated substrate ubiquitylation and degradation. Interestingly, the prenyl-binding capacity of PDE6δ is inhibited by the deletion of exon 3, the mutation occurring in JBTS22 patients. Indeed, expression of PDE6δ, but not its exon 3-deleted variant PDE6δ(Δexon 3), extracts FBXL2 from the plasma membrane and vesicles, rendering it cytosolic. This result was further validated using deltarasin, a drug that targets the hydrophobic pocket of PDE6δ and inhibits its interaction with FBXL2. In addition, we show that disrupting the PDE6δ-FBXL2 equilibrium affects the degradation of the ER-resident calcium channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3). Indeed, expression of PDE6δ, but not of PDE6δ(Δexon 3), regulates IP3R3-mediated calcium flux and cell survival in response to oxidative stress. Finally, to study the effect of PDE6δ JS mutation in vivo, we have generated a zebrafish model expressing the PDE6δ truncation mutant corresponding to the PDE6δ(Δexon 3) mutant found in JBTS22 patients. The characterization of this model organism is ongoing.

Difetti genetici dello sviluppo durante l’embriogenesi

Sindrome di Joubert; SJ; JS; Disturbo cerebelloparenchimale IV; CPD IV

LA PROTEINA CHAPERONE PDE6Δ, MUTATA NELLA SINDROME DI

JOUBERT 22, CONTROLLA LA DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE IN SPECIFICHE AREE CELLULARI.

La sindrome di Joubert (JBTS) è un raro disturbo dello sviluppo neurologico caratterizzato da ipoplasia del verme cerebellare, difetti scheletrici, anomalie renali e distrofia della retina. Sono state individuate mutazioni in circa 30 geni associati alla JBTS. Il progetto si focalizza sul sottotipo noto come sindrome di Joubert 22 (JBTS22), causata da una mutazione omozigote nel gene PDE6δ, che codifica per una proteina chaperone implicata nell'oncogenesi mediata da RAS. L'obiettivo generale è studiare il meccanismo fisiopatologico alla base della JBTS22. Abbiamo scoperto che PDE6δ interagisce con FBXL2 prenilato, la subunità recettore del substrato del complesso ubiquitina-ligasi SCF-FBXL2, e controlla il trasporto di FBXL2 verso specifici compartimenti di membrana, regolando così l'ubiquitinazione e la degradazione dei substrati di FBXL2. È interessante notare che la delezione dell'esone 3, mutazione riscontrata nei pazienti con JBTS22, impedisce a PDE6δ di legare efficacemente i gruppi prenilici. Infatti, l'espressione di PDE6δ, ma non della sua variante PDE6δ(Δexon3), estrae FBXL2 dalla membrana plasmatica e dalle vescicole, rendendola citosolica. Questo risultato è stato ulteriormente validato utilizzando deltarasin, un farmaco che colpisce la tasca idrofobica di PDE6δ e inibisce l'interazione con FBXL2. Inoltre, abbiamo dimostrato che la perturbazione dell'equilibrio PDE6δ-FBXL2 influenza la degradazione del canale del calcio residente nel reticolo endoplasmatico, il recettore 1,4,5-trisfosfato di inositolo tipo 3 (IP3R3). Difatti, l'espressione di PDE6δ, ma non di PDE6δ(Δexon3), regola il flusso di calcio mediato da IP3R3 e la sopravvivenza cellulare in risposta allo stress ossidativo. Infine, per studiare l'effetto della mutazione in PDE6δ associata alla JBTS in vivo, abbiamo generato un modello di zebrafish che esprime il mutante PDE6δ(Δexon3) trovato nei pazienti JBTS22. Attualmente è in corso la caratterizzazione di questo organismo modello.

9

Genetic developmental defect during embryogenesis

Joubert syndrome

(Autosomal recessive nonsyndromic deafness, Intellectual developmental disorder with autistic features and language delay (with or without seizures), Night blindness (congenital stationary), Meckel syndrome, Deafness (autosomal recessive), Restrictive card)

TDARKRAG: LLMS IN THE SERVICE OF RARE DISEASE COMMUNICATION

Di Bella Daniele[1],P. Roversi[2]

[1]Brescia, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GJC22077; Roversi Pietro, Trerotola Marco

In the context of the project "Broad-spectrum rescue-of-secretion of Tdark glycoprotein mutants" (Telethon grant GJC22077), software was developed for the creation, management and updating of Wikipedia pages, each dedicated to one of the 10 Homo sapiens Tdark proteins involved in the study. The application TDarkRAG, written in Python, harnesses the potential of Large Language Models (LLMs) in scientific communication. It leverages Retrieval-Augmented Generation (RAG) and GPT-4o-mini to retrieve, employ, and cite the sources in the users' Zotero library for the generation of scientific content. To evaluate the effectiveness of the application, 15 Wikipedia pages, each related to a well-characterized protein, were selected; the sources cited on those pages were extracted and used to generate new text, which was then compared with the original content through analysis conducted by both GPT-4o-mini and GPT-4o. Currently, the application is being expanded to support models developed by other companies, such as Anthropic and DeepSeek, with the goal of comparing their performances with that of GPT-4o-mini. Human experts will conduct an independent qualitative evaluation of the generated texts in order to integrate human judgment into the validation process.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Joubert; SJ; JS; Disturbo cerebelloparenchimale IV; CPD IV

(Sordità autosomica recessiva non sindromica, Disturbo dello sviluppo intellettivo con caratteristiche autistiche e ritardo del linguaggio (con o senza crisi epilettiche), Cecità notturna (stazionaria congenita), Sindrome di Meckel, Sordità (autosomica rec)

TDARKRAG: LLMS AL SERVIZIO DELLA COMUNICAZIONE DELLE MALATTIE RARE

Nel contesto del progetto "Recupero ad ampio spettro della secrezione di glicoproteine Tdark mutanti" (bando Telethon GJC22077), è stato sviluppato un software per la creazione, la gestione e l'aggiornamento di pagine Wikipedia, ciascuna dedicata a una delle 10 proteine Tdark di Homo sapiens coinvolte nello studio. L'applicazione TDarkRAG, scritta in Python, sfrutta il potenziale dei Large Language Models (LLM) nella comunicazione scientifica, impiegando la Retrieval-Augmented Generation (RAG) e GPT-4o-mini per recuperare, utilizzare, e citare le fonti presenti nella libreria Zotero degli utenti per la generazione di contenuti scientifici. Per valutare l'efficacia dell'applicazione, sono state selezionate 15 pagine di Wikipedia, ciascuna relativa a una proteina ben caratterizzata; le fonti citate in queste pagine sono state estratte e utilizzate per generare nuovo testo, che è stato poi confrontato con il contenuto originale attraverso analisi condotte sia da GPT-4o-mini che da GPT-4o. Attualmente, l'applicazione è in fase di espansione per supportare i modelli sviluppati da altre aziende, come Anthropic e DeepSeek, con l'obiettivo di confrontare le loro prestazioni con quelle di GPT-4o-mini. Esperti umani condurranno una valutazione qualitativa indipendente dei testi generati, al fine di integrare il giudizio umano nel processo di validazione.

10

Genetic developmental defect during embryogenesis

Kabuki syndrome

UNRAVELLING THE MOLECULAR MECHANISM OF KABUKI SYNDROME: A FRESH LOOK FOR A THERAPEUTIC INNOVATION

Santomaso Lucia[1],G. Vitali[1], A. Zippo[1]

[1]Trento, Università Di Trento

Project: GGP20010; Zippo Alessio

Kabuki syndrome (KS, OMIM#147920) is a rare genetic disorder characterized by multiple tissue dysfunctions such as craniofacial abnormalities, developmental delay, intellectual disabilities, and heart defects. The incidence of KS is estimated at 1:32000 newborns,

and no effective therapies are currently available for the disease, making this condition an unmet medical need (Bögershausen, N. & Wollnik, B., 2013). In the majority of cases, KS arises from de novo mutations in the gene encoding for the methyltransferase MLL4 (KMT2D), a chromatin factor involved in the balancing between active and repressive gene expression states. It has been shown that MLL4 loss-of-function (LoF) can dysregulate the proper chromatin compartmentalization, resulting in nuclear mechanical stress and impaired lineage commitment (Fasciani et al., 2020). Moreover, our previous investigation reveals that the inhibition of the mechanosensor ATR has been shown to rescue MLL4-dependent mechanical stress and proper lineage commitment toward chondrocytes (Fasciani et al., 2020). Thanks to a multidisciplinary approach, we aim to investigate the contribution of MLL4 to KS from the molecular level to the complexity of a model organism. By combining orthogonal in vitro approaches, we are dissecting the nature and the dynamics of MLL4 role in the context of the nuclear environment and mechano-response of the cell. In parallel, we are investigating the developmental biases that affect the mechano-driven differentiation of patient-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs). Moreover, taking advantage of a mouse model with MLL4 haploinsufficiency, we aim to investigate the effects of pharmacological intervention in rescuing KS-associated phenotype. This comprehensive investigation will provide a deeper insight into the molecular basis of Kabuki syndrome and will be crucial to develop more precise, targeted and effective therapies.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome Kabuki; KS; Sindrome "Kabuki make-up"; Sindrome di Niikawa-Kuroki;

DISSEZIONANDO IL MECCANISMO MOLECOLARE ALLA BASE DELLA SINDROME DI KABUKI: UNO SGUARDO INNOVATIVO VERSO UN NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO

La sindrome di Kabuki (KS, OMIM#147920) è una malattia genetica rara caratterizzata da malformazioni multisistemiche come anomalie craniofacciali, disabilità intellettive e ritardo nello sviluppo. L'incidenza stimata della KS è di 1:32000 nuovi nati, e ad oggi non sono disponibili terapie efficaci per il trattamento di questa malattia (Bögershausen, N. & Wollnik, B., 2013). Nella maggior parte dei casi, la KS si verifica a causa di mutazioni de novo nel gene che codifica per la metiltransferasi MLL4 (KMT2D), un fattore della cromatina che consente di mantenere l'equilibrio tra attivazione e repressione trascrizionale all'interno della cellula. È stato dimostrato che la perdita di funzione (aploinsufficienza) di MLL4 può alterare la struttura della cromatina all'interno del nucleo, aumentando lo stress meccanico e alterando il corretto differenziamento cellulare. Inoltre i risultati di una nostra precedente ricerca indicano che l'inibizione del meccano-sensore ATR è in grado di alleviare lo stress meccanico causato dall'aploinsufficienza di MLL4 e di ripristinare il corretto differenziamento cellulare (Fasciani et al., 2020). Lo scopo della nostra ricerca è investigare, grazie ad un approccio multisciplinare, il contributo di MLL4 nella KS a partire dal livello molecolare fino alla complessità dell'organismo modello. Combinando diversi approcci in vitro, stiamo studiando la natura molecolare del ruolo di MLL4 nel contesto del nucleo cellulare e della risposta agli stimoli meccanici. In parallelo, stiamo analizzando i difetti dello sviluppo durante il differenziamento di cellule staminali pluripotenti derivate da pazienti di KS. Inoltre, grazie all'ausilio di un modello murino con aploinsufficienza di MLL4, stiamo investigando l'effetto di interventi farmacologici per alleviare il fenotipo associato alla KS. Questa analisi a tutto tondo fornirà una visione più completa sulle basi molecolari della KS e sarà cruciale nello sviluppo di terapie più precise ed efficaci.

11

Genetic developmental defect during embryogenesis

Microphthalmia-anophthalmia-coloboma

DISSECTING THE ROLE OF SOX2 IN NEURONS OF THE VISUAL THALAMUS: INSIGHTS INTO DEVELOPMENTAL VISUAL DISORDERS

I. Fontana[1], S. Placida[1], G. Rovelli[1], M. Rizzuto[1], D. Volgarino[1], A. Gambacurta[1], G. Pavesi[2], S. Nicolis[1], S. Mercurio[1]

[1]Milan, Università Di Milano Bicocca
[2] Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GMR23T1022; Mercurio Sara

Neurodevelopmental visual disorders (NDVD) are debilitating and largely incurable conditions, often due to disruption of the gene regulatory network (GRN) required for the differentiation of a specific cell type or components of the visual system. All components of the visual system need to be connected at the right time and place for the system to function correctly. In mice and humans, the eyes send retinal ganglion cell axons, through the optic nerve, to the thalamic dorsolateral geniculate nucleus (dLGN) that project to the primary visual cortex (V1) that processes visual information. Heterozygous mutations in the transcription factor SOX2 lead to a rare NDVD, Syndromic microphthalmia-3 (MCOPS3), characterized by anophthalmia or microphthalmia, intellectual disability and brain abnormalities. SOX2 is expressed in the main components of the visual system: the eye, the dLGN and the cortex. It is required in retinal progenitor cells and recently, we showed, by Sox2 thalamic conditional knock-out (cKO) in mice, that it is expressed in differentiated dLGN neurons and required for visual system circuit formation, pointing to a key role of Sox2 in dLGN neurons. We have identified genes differentially expressed (DEG) in dLGN neurons lacking SOX2, in mouse, by bulk RNAseq and have identified where on dLGN chromatin SOX2 binds, using the CUT&RUN technique. DEGs in Sox2 thalamic cKO mice compared to controls, and directly bound by SOX2, are significantly enriched in functions related to neural development including synapse formation and axon guidance. We are currently studying the role of SOX2 targets in visual system development and are searching for the cell types that are affected by SOX2 loss in the visual thalamus by spatial transcriptomics analyses. Defining the GRN downstream of SOX2 in thalamic neurons will help us in elucidating how SOX2 regulates circuit formation in the visual system and therefore better understand the basis of MCOPS3.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Microftalmia, anoftalmia, coloboma; MAC; Microftalmia colobomatosa; Microftalmia con cisti colobomatosa;

STUDIO DEL RUOLO DI SOX2 NEI NEURONI DEL TALAMO VISIVO: VERSO LA COMPRENSIONE DELLE MALATTIE DEL SISTEMA VISIVO

I disturbi del neurosviluppo visivo (NDVD) sono condizioni debilitanti e in gran parte incurabili, spesso dovuti alla disfunzione della rete di regolazione genica necessaria per la differenziazione di tipi cellulari specifici del sistema visivo. Tutte le componenti devono essere connesse nel momento e luogo giusto affinché il sistema visivo funzioni correttamente. Nel topo e nell'uomo le cellule della retina, attraverso il nervo ottico, giungono al nucleo genicolato dorsolaterale del talamo (dLGN) e proiettano alla corteccia visiva primaria, che elabora le informazioni visive. Mutazioni eterozigoti del fattore di trascrizione SOX2 causano un

raro NDVD, la microftalmia sindromica-3 (MCOPS3), caratterizzata da occhi piccoli o assenti, disabilità intellettiva e anomalie cerebrali. SOX2 è espresso nelle principali componenti del sistema visivo: l'occhio, il dLGN e la corteccia. È necessario nelle cellule progenitrici retiniche e recentemente abbiamo dimostrato, mediante studi nel topo, che è necessario per la formazione del circuito visivo. Abbiamo identificato geni differenzialmente espressi nei neuroni del dLGN privi di SOX2, nel topo, ed anche quali di questi sono direttamente regolati da SOX2. I geni regolati da SOX2 nel talamo sono significativamente arricchiti in funzioni legate allo sviluppo neuronale e la formazione di sinapsi. Stiamo attualmente studiando il ruolo di SOX2, e dei geni da esso regolati, nello sviluppo del sistema visivo e cercando di identificare i tipi cellulari piu' colpiti dalla perdita di SOX2 nel talamo visivo. Identificare la rete di geni regolati da SOX2 nei neuroni talamici ci aiuterà a chiarire come SOX2 regola la formazione del circuito visivo e, quindi, a comprendere meglio le basi della MCOPS3.

12

Genetic developmental defect during embryogenesis

Multiple congenital anomalies/dysmorphic syndrome-intellectual disability

12 CONNECTING CRANIOFACIAL MALFORMATIONS WITH NEURAL CREST SPLICING DEFECTS BY DEFINING THE ROLE OF NUCLEAR CYCLOPHILIN NKTR

Cariboni Anna Maria[1]

[1]*Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale*

Project: GMR22T1054; Cariboni Anna Maria

By analysing the genome of patients with a syndrome mainly characterised by global developmental delay and craniofacial malformations, we identified mutations in the Natural Killer cell Triggering Receptor (NKTR) gene. Very little is known about the role of NKTR during cellular and developmental processes. Yet the presence of a domain involved in the splicing of messenger RNA and the existence of overlapping syndromes due to defective splicing in neural crest cells (NCCs) suggest that NKTR might be a novel gene implicated in this class of genetic disorders. NCCs are unique group of cells that originate at the neural tube border and participate to the development of several organs including face structures. Our preliminary observations reveal that: NKTR Pre-submission associates with the spliceosome (i.e. the nuclear region where RNA splicing processes occur), when overexpressed in cells; NKTR expression is regulated by the transcription factor SOX9 during craniofacial development in mouse and zebrafish embryos; NKTR inactivation in zebrafish induces defects in face cartilage formation. Based on these premises, we wish to perform deeper analyses aimed at assessing the biological role of NKTR during splicing processes and craniofacial development. Further, we will apply tailored experimental models such as induced Pluripotent Stem Cell-derived NCCs to model the mutation identified and shed light into the pathogenesis of this novel genetic syndrome.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome genetica da anomalie/dismorfismi congeniti multipli e disabilità intellettiva; Sindrome genetica da anomalie congenite multiple e disabilità intellettiva con o senza dismorfismi;

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.

13

Genetic developmental defect during embryogenesis

Phelan-McDermid Syndrome (Monosomy 22q13)

DECODING THE NEURAL MECHANISMS LINKING EMOTION AND SOCIAL BEHAVIOR IN AUTISM SPECTRUM DISORDER

Giglio Camilla[1], **F. Cicciarelli**[1], **A. Renna**[1], **L. Milano**[1], **B. Sacchetti**[1]

[1]*Torino, Università Di Torino*

Project: GMR23T1156; Sacchetti Benedetto

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by core behavioral abnormalities, including social deficits, verbal impairments, and intellectual disabilities. Individuals with ASD also exhibit difficulties in emotion recognition and an altered ability to attribute affective meaning to sensory stimuli. In particular, assigning emotional significance to socially relevant cues is challenging for autistic individuals. The research aims to investigate the neural mechanisms underlying these altered emotional-associative processes and their relationship with social deficits in ASD. As a first step, we are exploring whether and how the neuronal circuits responsible for assigning emotional incentive value to sensory stimuli contribute to social behaviors in Wild-Type (WT) mice. Specifically, the focus is on olfactory stimuli involved in both social interactions and positive experiences, with an emphasis on the role of the Posterior Piriform Cortex (PPC). To this end, a viral approach enabling inducible activity-dependent tagging of neurons will be employed to assess whether there is an overlap between the neuronal networks engaged in appetitive experiences and those involved in social behavior. Additionally, chemogenetic silencing will help determine whether

those common neurons are necessary for social interactions. The underlying hypothesis is that specific neurons in the PPC, activated during appetitive memory formation, are not only engaged but also functionally required for social behavior, and that disruption of these shared neural networks may underlie the deficits observed in ASD mouse models.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Phelan Mc Dermid; Monosomia 22q13; delezione 22q13

DECODIFICA DEI MECCANISMI NEURALI CHE LEGANO EMOZIONE E COMPORTAMENTO SOCIALE NELL'AUTISMO

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) è un disordine del neurosviluppo caratterizzato da anomalie comportamentali, tra cui deficit nell'interazione sociale, nella comunicazione e nella cognizione. I soggetti con ASD presentano inoltre difficoltà nel riconoscimento delle emozioni e una capacità alterata di attribuire un significato affettivo agli stimoli sensoriali. In particolare, riscontrano una marcata difficoltà nell'assegnare un valore emotivo alle situazioni socialmente rilevanti. Questo studio mira a indagare i meccanismi neurali alla base di questi processi alterati di associazione emotiva e la loro relazione con i deficit sociali nell'ASD. Nella fase iniziale della ricerca, analizziamo il ruolo dei circuiti neurali coinvolti nell'attribuzione di un valore emotivo positivo agli stimoli sensoriali e il loro contributo al comportamento sociale nei topi wild-type (WT). L'attenzione è focalizzata sugli stimoli olfattivi, fondamentali sia nelle interazioni sociali che nelle esperienze positive, con particolare interesse per il ruolo della corteccia piriforme posteriore (PPC). A tal fine, utilizzeremo un approccio virale in grado di taggare in modo attività-dipendente i neuroni, così da identificare i network neurali implicati nell'esperienza appetitiva e nell'interazione sociale. Inoltre, l'impiego di una tecnica di silenziamento chemogenetico consentirà di determinare se questi neuroni siano non solo coinvolti, ma anche essenziali per l'interazione sociale. L'ipotesi alla base dello studio è che esistano specifici neuroni nella PPC che si attivano durante la formazione della memoria appetitiva e che siano funzionalmente necessari per l'interazione sociale. La compromissione di questi network potrebbe costituire il substrato dei deficit sociali osservati nei modelli murini di autismo.

14

Genetic developmental defect during embryogenesis

Phelan-McDermid Syndrome (Monosomy 22q13)

SHANK3 MODULATES RPL3 EXPRESSION AND PROTEIN SYNTHESIS VIA MGLU5: IMPLICATIONS FOR PHELAN MCDERMID SYNDROME

Verpelli Chiara[1], S. Beretta[1], F. Giona[1], C. Sala[1], T.M. Boeckers[2]

[1]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]ULM, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GMR23T1018; Verpelli Chiara

Mutations or deletions in the SHANK3 gene have been identified in up to 1% of autism spectrum disorder cases and are considered the primary cause of neuropsychiatric symptoms in Phelan McDermid syndrome (PMS). While synaptic dysfunctions have been extensively documented in the absence of Shank3, other mechanisms through which Shank3 may regulate neuronal functions remain unclear. Our data suggest that the ribosomal protein Rpl3 and overall protein synthesis are downregulated in the cortex and striatum of Shank3 knockout (KO) mice and in neurons differentiated from human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) derived from a PMS patient. Moreover, restoring Rpl3 expression in the striatum of Shank3 KO mice is sufficient to rescue protein synthesis and mitigate excessive grooming, suggesting that the behavioral alterations observed in Shank3 KO mice might be, at least in part, caused by Rpl3 downregulation and consequent impaired protein synthesis. Furthermore, we demonstrated that chronic inhibition of mGlu5 is sufficient to reduce Rpl3 expression, which in turn impairs global protein synthesis. Consequently, chronic treatment with VU0409551, a potent and selective mGlu5 positive allosteric modulator, rescues Rpl3 expression and the resulting reduction in protein synthesis, leading to long-lasting improvements in behavioral deficits in Shank3 KO mice Altogether, we propose a new role for Shank3 in modulating Rpl3 protein expression, ribosomal function, and protein synthesis by downregulating mGlu5 receptor activity.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Phelan Mc Dermid; Monosomia 22q13; delezione 22q13

SHANK3 MODULA L'ESPRESSIONE DI RPL3 E LA SINTESI PROTEICA: IMPLICAZIONI PER LA SINDROME DI PHELAN MCDERMID

La perdita di una copia del gene SHANK3 è la causa della sindrome di Phelan-McDermid (PMS), un raro disturbo dello sviluppo neurologico. Le basi biologiche della PMS non sono ancora chiare e, al momento, non esistono trattamenti approvati specifici per la sintomatologia di questi pazienti. La sintesi proteica è essenziale per le funzioni neuronali e alterazioni della sintesi proteica sono state riscontrate in diversi disturbi del neurosviluppo. I nostri dati preliminari ottenuti studiando topi e neuroni umani derivati da cellule staminali di pazienti affette da PMS suggeriscono che l'assenza di Shank3 determini una riduzione della sintesi proteica nei neuroni e che questo potrebbe essere la causa di alcune anomalie comportamentali manifestate dalle pazienti affette da PMS. In questo progetto ci proponiamo di chiarire a livello molecolare come Shank3 influenzi la sintesi proteica. I risultati del nostro studio permetteranno di identificare nuovi possibili bersagli molecolari per sviluppare nuovi trattamenti per i pazienti affetti da PMS

15

Genetic developmental defect during embryogenesis

Pitt-Hopkins syndrome

MODELING PITT-HOPKINS SYNDROME AND NEW PATHOGENETIC VARIANTS OF TCF4 BY GENE EDITING: A STEP FORWARD TOWARD PRECISION MEDICINE (HOPEFOR)

Remondino Francesca[1], M. Orefice[1], Pisa, Università Di Pisa, B. Cimbalo[1], S. Marchetta[1], C. Soldo[1] , E. Monti[1], A. Vitobello[2] C. Gabellini[1], M. Ori[1]

[1]Pisa, Università Di Pisa
[2]Dijon, Centre Hospitalier Universitaire

Project: GMR22T1071; Ori Michela

TCF4 loss-of-function variants cause Pitt-Hopkins Syndrome (PTHS), characterized by intellectual disability, distinctive facial features, intermittent hyperventilation followed by apnea and gut constipation. Through exome sequencing, we identified de novo TCF4 missense variants in three individuals not displaying the typical hallmarks of PTHS. Preliminary analysis on patient's fibroblasts suggested that these variants can induce a TCF4 Gain-of-Function, prompting the hypothesis of a novel molecular pathogenetic mechanism associated with the new mutations. We exploited Zebrafish as model system to overexpress the human TCF4, both wild-type and novel variants forms, during embryogenesis. By evaluating the phenotype of overexpressing embryos, we showed that the novel variants induced a specific phenotype in vivo during embryogenesis. We performed RNAseq analysis on these embryos which revealed a specific set of genes that are differentially expressed in the novel variants overexpressing embryos. We also approach the generation of mutant line in zebrafish replicating the novel variants point mutations, using two CRISPR/Cas9 editing approaches (HDR and base editing), to phenocopy the patient-specific condition. In parallel we generated a tcf4 knockout zebrafish line, representing the first PTHS model in zebrafish. The characterization of heterozygous embryos revealed phenotypic impairments that could resemble the Pitt-Hopkins features. In tcf4+/- embryos we are focusing on the development of central and peripherical nervous system analyzing specific brain regions that could be related to the socio-cognitive deficits of PTHS patients and the development of enteric neurons possibly associated to the PTHS patients gut constipation. We hope that this project will represent a pipeline for the generation of models reproducing the uniqueness of each patient, in the perspective of precision medicine fundamental for rare genetic disorders.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Pitt-Hopkins; PTHS; encefalopaia epilettica severa con disfunzione autonomica; ritardo mentale sindromico con iperventilazione intermittente

CARATTERIZZAZIONE DELLA SINDROME DI PITT-HOPKINS E DI NUOVE VARIANTI PATOLOGICHE DEL GENE TCF4 ATTRAVERSO APPROCCI DI GENE EDITING: UN PASSO AVANTI VERSO LA MEDICINA PERSONALIZZATA (HOPEFOR)

La sindrome di Pitt-Hopkins (PTHS) è una malattia rara causata da varianti che causano la perdita di funzione del gene TCF4. Essa è caratterizzata da disabilità intellettiva, specifiche caratteristiche facciali, problemi respiratori e costipazione. Abbiamo identificato tre varianti missenso de novo di TCF4 in tre individui che non presentano segni clinici tipici della PTHS. Le analisi preliminari sui fibroblasti dei pazienti suggeriscono che queste varianti possono indurre un guadagno di funzione di TCF4, supportando l'ipotesi di un nuovo meccanismo molecolare associato a queste nuove mutazioni. Abbiamo scelto zebrafish come modello per sovraesprimere il gene umano di TCF4, sia wild-type che nelle sue nuove varianti, durante lo sviluppo embrionale. Si è dimostrato che le nuove varianti inducono uno specifico fenotipo in vivo durante l'embriogenesi. Analizzando gli embrioni attraverso un'analisi di RNAseq, è emerso un set di geni differenzialmente espressi negli embrioni che overesprimono le nuove varianti. Con l'intento di ottenere degli avatar in vivo, vorremmo generare delle linee mutanti in zebrafish usando due approcci diversi della tecnologia CRISPR/Cas9 (HDR e base editing). Parallelamente, abbiamo generato una linea di zebrafish knockout per tcf4 che rappresenta il primo modello zebrafish di PTHS. La caratterizzazione degli embrioni tcf4+/- ha infatti rivelato un fenotipo che riproduce alcuni aspetti della PTHS. In particolare, ci siamo focalizzati sullo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico per indagare i deficit socio-cognitivi tipici dei pazienti PTHS e lo sviluppo dei neuroni enterici, la cui alterazione potrebbe essere associata alla costipazione osservata nei pazienti. Con la speranza di applicare sempre di più la medicina personalizzata alle malattie genetiche rare, auspichiamo che questo progetto possa portare alla generazione di nuovi modelli che riproducano l'unicità del singolo paziente.

16

Genetic developmental defect during embryogenesis

Sturge-Weber syndrome

OPHTHALMIC IMAGING IN STURGE-WEBER SYNDROME: NON INVASIVE EARLY DIAGNOSIS OF CHOROIDAL HEMANGIOMA

M. Malvasi[1], **S. Abdolrahimzadeh**[1], **M. Di Pippo**[1], **D. Rullo**[1]

[1]*Roma, Università Di Roma La Sapienza*

Project: GSA22N002; Abdolrahimzadeh Solmaz

Diffuse choroidal hemangioma occurs in approximately 53% of individuals affected by Sturge- Weber syndrome (SWS), and its presence serves as a crucial diagnostic marker in the assessment of the disease. Traditionally, diagnosis relies on fundoscopy, a technique with suboptimal sensitivity and specificity, or on more invasive or less accessible imaging modalities such as indocyanine green angiography (ICG) or ocular ultrasonography. The advent of new, non-invasive imaging technologies, such as spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) and near-infrared reflectance (NIR) imaging, presents a promising and rapid alternative for the identification of choroidal hemangiomas in patients with SWS. These methods are capable of producing high-resolution images of the retina and choroid in a non-invasive manner, allowing for detailed and repeatable analyses. The aim of this study was to compare the diagnostic efficacy of these imaging techniques with respect to traditional fundoscopy, assessing their sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy. Preliminary results suggested that SD-OCT could serve as a rapid, non- invasive tool for detecting choroidal hemangiomas, with the potential to significantly improve patient management and follow-up. This innovative approach may also represent a considerable advancement in the management and treatment of complications related to choroidal hemangiomas.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Sturge-Weber; Sindrome di Sturge-Weber-Krabbe; Angiomatosi di Sturge-Weber-Krabbe; SWS;angiomatosi encefalocele; angiomatosi encefalotrigeminale

IMAGING OFTALMOLOGICA NELLA SINDROME DI STURGE-WEBER: DIAGNOSI PRECOCE E NON INVASIVA DEGLI EMANGIOMI COROIDEALI

L'emangioma coroideale diffuso si manifesta in circa il 53% degli individui affetti dalla sindrome di Sturge-Weber (SWS) e la sua presenza rappresenta un marker diagnostico cruciale nella valutazione della malattia. Tradizionalmente, la diagnosi si basa sull'esame del fondo oculare, una tecnica con sensibilità e specificità subottimale, oppure su metodiche di imaging più invasive o meno accessibili, come l'angiografia con verde di indocianina (ICG) o l'ecografia oculare. L'avvento di nuove tecnologie di imaging non invasive, come la spectral-domain optical coherence tomography

(SD-OCT) e la near-infrared reflectance (NIR), offre un'alternativa promettente e rapida per l'identificazione degli emangiomi coroideali nei pazienti con SWS. Questi metodi sono in grado di produrre immagini ad alta risoluzione della retina e della coroide in modo non invasivo, permettendo analisi dettagliate e ripetibili. L'obiettivo di questo studio è stato confrontare l'efficacia diagnostica di queste tecniche di imaging rispetto all'esame del fondo oculare tradizionale, valutandone la sensibilità, la specificità e accuratezza diagnostica. I risultati preliminari hanno suggerito che il SD-OCT potrebbe costituire un esame strumentale rapido e non invasivo per rilevare gli emangiomi coroideali, con il potenziale di migliorare significativamente la gestione e il follow-up dei pazienti. Questo approccio innovativo potrebbe inoltre rappresentare un importante progresso nella gestione e nel trattamento delle complicanze associate agli emangiomi coroideali.

17

Genetic developmental defect during embryogenesis

Wolfram syndrome

WOLFRAMIN INACTIVATION LEADS TO BIOENERGETIC LOSS AND UPR-DEPENDENT ER STRESS THAT PRECEDE RETINAL GANGLION CELL DEGENERATION

Vanni Niccolò Natanaele[1],
S.G. Giannelli[1], **F. Morosi**[2], **M. Rossi**[2], **N. Mitro**[2], **M. Luoni**[2]
V. Broccoli[2]

[1]*Milano, Università Vita Salute San Raffaele*
[2] *Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche*

Project: GMR23T2175; Broccoli Vania

Progressive optic atrophy leads to relentless blindness in Wolfram syndrome (WS) patients by inducing degeneration of retinal ganglion cells (RGCs). We have demonstrated that RGC degeneration is preceded by dysfunctions in the surrounding glial cells, which compromise the correct transfer of bioenergetic molecules, such as lactate and pyruvate, fundamental for the function and survival of RGCs. This chronic hypometabolic state is particularly detrimental for RGC axons, which require very high levels of energy supplies given their long and myelinated axons. Metabolomics performed in WS mouse astrocytes and oligodendrocytes showed higher levels of metabolites involved in glycolysis and TCA cycle with respect to control cells, but also pronounced decrease in total ATP content. WS glial cells exhibit a strong activation of the canonical UPR pathways and aberrant ER stress both in basal and stimulated conditions, accompanied with decreased levels of nascent protein synthesis. These results imply a pronounced dysregulation of the PERK-eIF2α-ATF4 pathway in WS pathophysiology. To determine the primary function of Wolframin, the protein mutated in WS, we performed co-IP assays coupled with proteomics, identifying candidate interactors known to be involved in protein synthesis, folding, proteasome-dependent protein degradation and other related processes. These results indicate that Wolframin may have a role in coordinating protein quality with ER-dependent protein degradation. Moreover, single-cell RGC morphology was evaluated before and during disease manifestation in WS mice. Changes in RGC dendrite morphology are already detectable starting from 8 months old in the mutant retinas, preceding frank cell death, but after axonal abnormalities that arise already at 6 months. These results provide evidence that RGC axonal degeneration precedes cell bodies and dendritic degeneration, confirming the essential axonopathic nature of WS.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Wolfram; WS; Diabete mellito - diabete insipido - atrofia ottica - sordità; Sindrome DIDMOAD

DIFETTI DI BIOENERGETICA CELLULARE ED AUMENTATO STRESS DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO SONO LE CAUSE DELLA DEGENERAZIONE NEURONALE RETINICA NELLA SINDROME DI WOLFRAM

L'atrofia ottica progressiva può portare a cecità nei pazienti con sindrome di Wolfram (WS) a causa della degenerazione delle cellule ganglionari della retina (RGC). Abbiamo dimostrato che la degenerazione delle RGC è preceduta da disfunzioni nelle cellule gliali circostanti, che compromettono il corretto trasferimento di molecole bioenergetiche, come lattato e piruvato, fondamentali per la funzione e la sopravvivenza delle RGC. Questo stato ipometabolico cronico è particolarmente dannoso per gli assoni delle RGC dati i loro assoni lunghi e mielinizzati. La metabolomica eseguita negli astrociti e negli oligodendrociti dei topi malati ha mostrato una pronunciata diminuzione del contenuto totale di ATP. Le cellule gliali malate mostrano un forte stress a livello del reticolo endoplasmatico, accompagnato da livelli ridotti di sintesi di nuove proteine. Questi risultati implicano una pronunciata disregolazione dell'asse molecolare PERK-eIF2α-ATF4 nella fisiopatologia della WS. Per determinare la funzione primaria della Wolframina, la proteina mutata nella WS, abbiamo eseguito saggi di co-IP/proteomica, identificando nuovi interattori noti per essere coinvolti nella sintesi proteica, nel folding delle proteine e nella degradazione proteica dipendente dal proteasoma. Questi risultati indicano che Wolframina potrebbe avere un ruolo nel coordinare il bilancio tra sintesi e degradazione di specifiche proteine bersaglio. Inoltre, la morfologia delle RGC è stata valutata prima e durante la manifestazione della malattia nei topi WS. I cambiamenti nella morfologia dei dendriti delle RGC sono già rilevabili nelle retine mutanti a partire dagli 8 mesi di età, precedendo la morte cellulare, ma dopo anomalie assonali che si manifestano già a 6 mesi. Questi risultati indicano che una perdita bioenergetica ed aumentato stress del reticolo endoplasmatico precedono e sono probabilmente le cause della degenerazione delle RGC responsabile dei difetti visivi nella WS.

18

Genetic developmental defect during embryogenesis

Wolfram syndrome

WOLFRAM SYNDROME IS ASSOCIATED WITH AN IMBALANCE OF THE IMMUNE SYSTEM AND SYSTEMIC INFLAMMATION

Pallotta Maria Teresa[1], **"E. Panfili**[1]**, M. Gargaro**[1]**, C. Orabona**[1]

[1]*Perugia, Università Di Perugia*

Project: GMR24T1115; Pallotta Maria Teresa

"Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal-recessive disorder of the endoplasmic reticulum (ER) clinically characterized by insulin-dependent diabetes mellitus, optic nerve atrophy, and progressive neurodegeneration. More than 90% of patients with WS have mutations in the gene encoding wolframin (WFS1). Several lines of evidence suggest that the WFS1 protein is involved

in the maintenance of ER homeostasis. Moreover, it has been shown that the presence of genetic variants causes uncontrolled calcium ion release from ER and activation of the unfolded protein response (UPR) signaling pathway. However, the exact molecular mechanisms through which WFS1 alterations lead to the clinical manifestations of WS are not completely elucidated yet. Based on the existence of a bidirectional cross-talk between UPR signaling and inflammation, this study aims to investigate the possible impact of WFS1 mutations on the immune system. We recently described the case of a WS patient bearing two novel WFS1 mutations which were predicted to generate a truncated and inactive form of the protein. We found that WFS1 mutations in the proband were associated with a chronic inflammatory state with a dominance of T helper 17 (Th17)-type cells over regulatory T (Treg) lymphocytes and high levels of proinflammatory cytokines produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro and detectable in the serum. Prompted by these results, we expanded the cohort of WS patients to investigate whether different mutations of the WFS1 gene can impact the immune system."

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Wolfram; WS; Diabete mellito - diabete insipido - atrofia ottica - sordità; Sindrome DIDMOAD

LA SINDROME DI WOLFRAM È ASSOCIATA A UNO SQUILIBRIO DEL SISTEMA IMMUNITARIO E AD INFIAMMAZIONE SISTEMICA

La sindrome di Wolfram (WS) è un raro disturbo autosomico recessivo del reticolo endoplasmatico (ER) clinicamente caratterizzato da diabete mellito insulino-dipendente, atrofia del nervo ottico e neurodegenerazione progressiva. Oltre il 90% dei pazienti con WS presenta mutazioni nel gene che codifica la wolframina (WFS1). Diverse studi suggeriscono che la proteina WFS1 è coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi dell'ER. Inoltre, è stato dimostrato che la presenza di varianti genetiche provoca un rilascio incontrollato di ioni calcio dall'ER e l'attivazione della via di trasduzione del segnale della risposta alle proteine non ripiegata (UPR). Tuttavia, gli esatti meccanismi molecolari attraverso i quali le alterazioni di WFS1 portano alle manifestazioni cliniche della WS non sono ancora stati completamente chiariti. Sulla base dell'esistenza di un rapporto bidirezionale tra la via dell'UPR e l'infiammazione, questo studio mira a indagare il possibile impatto delle mutazioni di WFS1 sul sistema immunitario. Abbiamo recentemente descritto il caso di una paziente WS portatrice di due nuove mutazioni WFS1 che generano una forma troncata e inattiva della proteina. Abbiamo scoperto che le mutazioni WFS1 nella paziente erano associate ad uno stato infiammatorio cronico caratterizzato da un incremento significativo di cellule di tipo T helper 17 (Th17) rispetto ai linfociti T regolatori (Treg) e da alti livelli di citochine proinfiammatorie prodotte dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) in vitro e rilevabili nel siero. Alla luce di questi risultati, abbiamo ampliato la coorte di pazienti con WS per indagare se diverse mutazioni del gene WFS1 possano avere un impatto sul sistema immunitario.

19

Genetic developmental defect during embryogenesis

Wolfram syndrome

INFLAMMATION-DRIVEN NONSENSE-MEDIATED DECAY INHIBITION IMPAIRS ? CELL SURVIVAL IN WOLFRAM SYNDROME 1

Chimienti Raniero[1], G. Siracusano[1], S. Torchio[1], M. Matarazzo[1], R. Bonfanti[1], L. Piemonti[1], G. Casari[1], G. Frontino[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GMR24T1147; Chimienti Raniero

Wolfram Syndrome 1 (WS1) is a rare genetic disorder caused by mutations in the WFS1 gene affecting the endoplasmic reticulum (ER)-associated protein Wolframin. These mutations lead to a broad spectrum of clinical manifestations including childhood-onset diabetes mellitus, optic nerve atrophy, hearing loss, urological and gonadal dysfunctions and progressive neurodegeneration. Understanding genotype–phenotype correlations is crucial for predicting disease outcomes and developing targeted therapies. We investigated iPSC-derived β cells from a WS1 patient carrying compound heterozygous WFS1 mutations: c.316-1G>A, affecting the splice site upstream of exon 4, and c.757A>T, introducing a premature termination codon in exon 7. The c.316-1G>A mutation caused alternative splicing, producing both nonsense-mediated decay (NMD)-regulated transcripts and open reading frame (ORF)-conserving mRNAs, leading to truncated yet partially functional Wolframin proteins. These proteins retained the C-terminal domain, essential for ER stress response, but β cells showed defects in insulin processing, calcium homeostasis and autophagy. Notably, Wolframin impairment triggered a systemic pro-inflammatory status in this patient, exacerbating ER stress, inhibiting NMD, and driving the accumulation of defective WFS1 transcripts, which promoted β cell apoptosis. Additional immune profiling of WS1 patients with nonsense and/or frameshift mutations revealed a WFS1 mutation–dependent pro-inflammatory profile, characterized by elevated cytokine production and alterations in several immune cell subsets. These immune changes underscore the link between WFS1 mutations and chronic inflammation, which compromise β cell function and survival. Indeed, inflammation-dependent NMD inhibition further increases the accumulation of mutated transcripts, highlighting a novel pathogenic mechanism and a potential target for therapeutic intervention.

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Sindrome di Wolfram; WS; Diabete mellito - diabete insipido - atrofia ottica - sordità; Sindrome DIDMOAD

L'INIBIZIONE DELL'NMD MEDIATA DALL'INFIAMMAZIONE COMPROMETTE LA SOPRAVVIVENZA DELLE CELLULE ? NELLA SINDROME DI WOLFRAM DI TIPO 1

La Sindrome di Wolfram di tipo 1 (WS1) è un raro disturbo genetico causato da mutazioni nel gene WFS1 che codifica per la Wolframina, proteina associata al reticolo endoplasmatico (RE). Tali mutazioni provocano un ampio spettro di sintomi, tra cui diabete mellito a esordio infantile, atrofia ottica, perdita dell'udito, disfunzioni urologiche e gonadiche, e neurodegenerazione progressiva. Comprendere le correlazioni genotipo-fenotipo è cruciale per prevedere l'evoluzione della malattia e sviluppare terapie mirate. Abbiamo esaminato cellule β derivate da iPSC di un paziente WS1 con due mutazioni eterozigoti composte in WFS1: c.316-1G>A, che modifica il sito di splicing prima dell'esone 4, e c.757A>T, che introduce un codone di stop prematuro nell'esone 7. La variante c.316-1G>A determina splicing alternativo, generando sia trascritti soggetti a decadimento mediato da nonsense (NMD), sia isoforme tronche ma parzialmente funzionali di Wolframina. Queste ultime conservano il dominio C-terminale, essenziale per la risposta allo stress del RE, ma sono causa di difetti nel processamento dell'insulina, nell'omeostasi del calcio e nell'autofagia. Inoltre, queste mutazioni nel gene WFS1 determinano uno stato

pro-infiammatorio sistemico, che esacerba lo stress a carico del RE ed inibisce l'NMD, determinando l'accumulo di trascritti difettosi, promotori dell'apoptosi β-cellulare. Ulteriori analisi eseguite su pazienti WS1 con mutazioni nonsense o frameshift hanno confermato il profilo pro-infiammatorio, caratterizzato da elevata produzione di citochine e alterazioni in diverse sottopopolazioni del sistema immunitario. Questi dati evidenziano il legame tra mutazioni di WFS1 e infiammazione cronica, che compromette la funzione e la sopravvivenza delle β-cellule. Infine, l'inibizione dell'NMD indotta dall'infiammazione accentua l'accumulo di trascritti mutati, delineando un nuovo meccanismo patogenetico e un possibile bersaglio terapeutico.

20

Inborn errors of metabolism

Disorder of urea cycle metabolism and ammonia detoxification

IMPAIRED NUCLEAR GLYCOGEN METABOLISM AFFECTS LIVER HOMEOSTASIS IN ARGININOSUCCINIC ACIDURIA.

Soria Leandro[1], A.M. D'alessio[1], E. Polishchuk[1], R. De Cegli[1] Y. Lee[2], J. Baruteau[3], M. Spada[4], C. Dionisi-Vici[4], V. Casertano[1], G. Parenti[1], N. Brunetti-Pierri[1]

[1] Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)
[2] Farmington, UCONN Health Center, Farmington, United States
[3] London, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, United Kingdom
[4] Roma, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS

Project: TGM22MT05; Brunetti-Pierri Nicola

Background: Nuclear glycogen catabolism supports histone acetylation and reduced nuclear glycogenolysis results in epigenetic changes. We found increased hepatic nuclear glycogen storage in AslNeo/Neo mice, a mouse model of Argininosuccinic Aciduria (ASA). Here, we investigated the mechanisms underlying nuclear glycogen storage and its consequences on liver homeostasis. Methods: Nuclear glycogen was evaluated by electron microscopy and immunofluorescence in livers of AslNeo/Neo mice, glycogen phosphorylase (PYGL) or alpha-glucosidase (GAA) deficient mice, and ASA patients. Western Blot on nuclear fractions were performed to evaluate protein abundance. AslNeo/Neo mice were treated by intraperitoneal injections of a pan-Histone Deacetylase inhibitor (HDACi) or sodium nitrite as Nitric oxide (NO) donor, or by intravenous injections of adeno-associated virus (AAV) vector expressing the human PYGL. Results: Nuclear glycogen storage was detected in mouse and human ASA livers but not in other mouse models of glycogen storage (GAA and PYGL deficiencies). Nuclear glycogen storage was associated to marked decrease in lysine acetylation of several histones and H3K9-dependent transcriptomic changes in AslNeo/Neo mouse livers. Treatment with a HDACi or AAV-mediated gene transfer of PYGL improved AslNeo/Neo mouse survival. Reduced PYGL in nuclear fractions of ASA livers suggested reduced glycogenolysis as mechanism responsible for glycogen storage in AslNeo/Neo nuclei. Treatment with NO donors restored nuclear levels of PYGL in AslNeo/Neo mice. Conclusions: In ASA liver, nuclear glycogen storage due to NO-dependent alteration in nuclear translocation of PYGL is associated with histone hypoacetylation, altered gene expression, and reduced survival of AslNeo/Neo mice. Our findings may have implications for development of improved therapies for liver disease in ASA and potentially, other liver disorders with aberrant nuclear glycogen storage.

Difetti congeniti del metabolismo

Difetto del metabolismo del ciclo dell'urea e disintossicazione da ammoniaca

IMPATTO DELL'ALTERATO METABOLISMO NUCLEARE DEL GLICOGENO SULL'OMEOSTASI EPATICA NEL ACIDURIA ARGINOSUCCINICA.

Il catabolismo del glicogeno nucleare supporta l'acetilazione degli istoni e la ridotta glicogenolisi nucleare determina cambiamenti epigenetici. Abbiamo riscontrato un aumento dell'accumulo di glicogeno nucleare epatico nei topi AslNeo/Neo, un modello murino di aciduria arginosuccinica (ASA). Qui, abbiamo studiato i meccanismi alla base dell'accumulo di glicogeno nucleare e le sue conseguenze sull'omeostasi epatica. Il glicogeno nucleare è stato valutato mediante microscopia elettronica e immunofluorescenza nei fegati di topi e pazienti ASA. I topi AslNeo/Neo sono stati trattati con iniezioni intraperitoneali di un inibitore dell'istone deacetilasi (HDACi) o nitrito di sodio come donatore di ossido nitrico (NO), o con iniezioni endovenose di un vettore virale adeno-associato (AAV) che esprime l'enzima glicogeno fosforilasi (PYGL). L'accumulo di glicogeno nucleare è stato rilevato nei fegati di topo e ASA umani, ma non in altri modelli di topo di accumulo di glicogeno. L'accumulo di glicogeno nucleare è stato associato a una marcata diminuzione dell'acetilazione della lisina di diversi istoni e a cambiamenti trascrittomici dipendenti da H3K9 nei fegati di topo AslNeo/Neo. Il trattamento con un HDACi o un trasferimento genico di PYGL mediato da AAV ha migliorato la sopravvivenza del topo AslNeo/Neo. La riduzione di PYGL nelle frazioni nucleari dei fegati ASA ha suggerito una ridotta glicogenolisi come meccanismo responsabile dell'accumulo di glicogeno nei nuclei AslNeo/Neo. Il trattamento con donatori di NO ha ripristinato i livelli nucleari di PYGL nei topi AslNeo/Neo. Conclusioni: nel fegato ASA, l'accumulo di glicogeno nucleare dovuto all'alterazione dipendente da NO nella traslocazione nucleare di PYGL è associato a ipoacetilazione degli istoni, espressione genica alterata e ridotta sopravvivenza dei topi AslNeo/Neo. I nostri risultati potrebbero avere implicazioni per lo sviluppo di terapie migliorate per la malattia epatica in ASA.

21

Inborn errors of metabolism

Lysinuric Protein Intolerance

IFN?-MEDIATED IMMUNE DYSREGULATION OF MACROPHAGES IN LYSINURIC PROTEIN INTOLERANCE

Prencipe Giusi[1], E. Loricchio[1], V. Matteo[1], I. Caiello[1], B. Siri[1], F. De Benedetti[1], C. Dionisi Vici[1]

[1]Rome, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS"

Project: GMR24T1131; Prencipe Giusi

Lysinuric protein intolerance (LPI) is a rare autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in the SLC7A7 gene, which encodes the cationic amino acid (CAA) transporter y+L amino acid transporter-1 (y+LTA-1). This transporter is primarily expressed in enterocytes, renal tubular cells, and monocytes/macrophages. Defective cationic amino acid transport in LPI patients results in significant metabolic disturbances. Beyond these metabolic issues, immune dysregulation is common, often leading to life-threatening immune-related conditions such as pulmonary alveolar

proteinosis (PAP) and macrophage activation syndrome (MAS). Our study aims to investigate immune dysregulation in LPI by analyzing bone marrow-derived macrophages (BMDMs), peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-derived macrophages, and THP-1 cells silenced for SLC7A7. BMDMs from LPI patients exhibited spontaneous upregulation of IFNγ and IFNγ-inducible genes (CXCL9, CXCL10, IDO1, GBP1, and STAT1), alongside increased secretion of IFNγ-driven chemokines. Similarly, PBMC-derived macrophages from LPI patients showed an M1-like phenotype, with increased expression of IFNγ, CXCL9, and CXCL10 compared to healthy controls-derived cells. Knockdown of SLC7A7 in THP-1 monocytic cells reproduced this inflammatory phenotype, confirming that defective CAA transport regulates macrophage polarization and function. Furthermore, plasma analysis from LPI patients revealed significantly elevated levels of calprotectin and neopterin, both markers of systemic macrophage activation, which correlated with MAS biomarkers like ferritin and LDH. These findings emphasize the pivotal role of IFNγ-driven immune dysregulation in LPI, similar to the mechanisms observed in other disorders associated with MAS, such as systemic juvenile idiopathic arthritis. Understanding these shared immune pathways may offer valuable insights into potential therapeutic strategies for LPI and related hyperinflammatory disorders.

Difetti congeniti del metabolismo

Intolleranza alle proteine con lisinuria

RUOLO DELL'INTERFERONE-GAMMA NELL'ALTERAZIONE FUNZIONALE DEI MACROFAGI NELL'INTOLLERANZA ALLE PROTEINE CON LISINURIA

L'intolleranza alle proteine con lisinuria (IPL) è una malattia genetica rara causata da mutazioni nel gene SLC7A7, che codifica per il principale trasportatore di aminoacidi cationici. Questo trasportatore è essenziale per il corretto funzionamento di cellule intestinali, renali e immunitarie, come i monociti/macrofagi. Il difetto nel suo funzionamento nei pazienti con IPL porta a sintomi intestinali e renali, nonché a gravi disfunzioni immunologiche, tra cui condizioni potenzialmente fatali come la proteinosi alveolare polmonare e la sindrome da attivazione dei macrofagi. I meccanismi cellulari e molecolari che spiegano lo sviluppo di queste complicazioni sono ancora poco chiari, rendendo difficile l'individuazione di trattamenti efficaci. I nostri dati preliminari suggeriscono che i macrofagi dei pazienti con IPL presentano una risposta infiammatoria anomala, con una marcata attivazione della via dell'interferone-gamma (IFNγ). Questa attivazione sembra essere un fattore chiave nella disfunzione immunitaria osservata in IPL e potrebbe contribuire all'insorgenza delle complicazioni gravi tipiche della malattia. I risultati ottenuti aprono la strada a nuove possibili strategie terapeutiche mirate a modulare l'infiammazione e migliorare la gestione delle complicazioni immunologiche nei pazienti con IPL.

22

Inborn errors of metabolism

Mitochondrial disease

EXPLOITING REDOX-ACTIVE MOLECULES AGAINST MITOCHONDRIAL DISEASES LINKED TO COMPLEX III AND COMPLEX I DYSFUNCTION

Donadon Michael[1], D. Bonesso[1], T. Varanita[1], A. Ongaro[1], R. Peruzzo[1], B. Angi[1], D. Fontana[1], M. Zeviani[1], L. Biasutto[1], A. Mattarei[1], C. Viscomi[1], I. Szabò[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GMR23T2021; Szabo Ildiko

Mitochondrial diseases result from a decreased oxidative phosphorylation (OXPHOS) that leads to a broad spectrum of incurable pathologies. Our goal was to understand whether redox-active membrane-permeant small molecules can be exploited to treat OXPHOS-¬related diseases. We selected a few molecules for their ability to replace the redox functions of the respiratory chain complexes I and III. Sub¬µM dose of the selected drugs is harmless, restores respiration and increases ATP production in complex I- or III- deficient¬ mouse embryonic fibroblasts as well as in fibroblasts from patients harboring pathogenic mutations in three different assembly/stabilization factors of complex III, including TTC19. The drugs normalized the mitochondrial membrane potential, mildly increased ROS production, and triggered mitochondrial biogenesis. These in vitro effects were confirmed also in vivo, in Drosophila melanogaster TTC19 KO, in Danio rerio TTC19 KD [1] as well in mouse models of complex I-and III-related disorders (Bonesso et al, in preparation), using mainly the redox cycler pyocyanin. Our in vitro results indicate a transcriptional reprogramming and an efficient metabolic rewiring in vivo upon pyocyanin treatment. Furthermore, newly designed and synthesized derivatives of the most promising drugs show enhanced life-time and tissue distribution. Administration of low, non¬toxic concentrations of the drugs and their derivatives significantly ameliorated movement and coordination proficiency, without inducing toxicity. Our results point to the possible exploitation of redox cyclers for therapy against diseases due to respiratory chain complex I and III dysfunction.

[1] Peruzzo R, Corrà S, Costa R, Brischigliaro M, Varanita T, Biasutto L, Rampazzo C, Ghezzi D, Leanza L, Zoratti M, Zeviani M, De Pittà C, Viscomi C, Costa R, Szabò I. Nature Communications (2021) 12, 2103.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattie mitocondriali

SFRUTTARE MOLECOLE REDOX-ATTIVE CONTRO LE MALATTIE MITOCONDRIALI LEGATE ALLA DISFUNZIONE DEL COMPLESSO III E DEL COMPLESSO I

Le malattie mitocondriali derivano da una ridotta fosforilazione ossidativa (OXPHOS) che porta a un ampio spettro di patologie incurabili. Il nostro obiettivo è capire se piccole molecole permeabili alla membrana redox-attive possono essere sfruttate per trattare malattie correlate a OXPHOS. Abbiamo selezionato alcune molecole per la loro capacità di sostituire le funzioni redox dei complessi della catena respiratoria I e III. La dose sub-µM dei farmaci selezionati non è tossica, ripristina la respirazione e aumenta la produzione di ATP nei fibroblasti embrionali di topo con mutazioni a livello del complessi I o III, nonché nei fibroblasti di pazienti che ospitano mutazioni in tre diversi fattori di assemblaggio/stabilizzazione del complesso III, tra cui TTC19. I farmaci normalizzano il potenziale di membrana mitocondriale, aumentano leggermente la produzione di ROS e innescato la biogenesi mitocondriale. Questi effetti in vitro sono stati confermati anche in vivo, in Drosophila melanogaster TTC19 KO, in Danio rerio TTC19 KD [1] e anche in modelli murini con disturbi correlati al complesso I e III (Bonesso et al, in preparazione), utilizzando principalmente il redox cycler piocianina. I nostri risultati in vitro indicano una riprogrammazione trascrizionale e un efficiente riprogrammazione metabolica in vivo dopo il trattamento con piocianina. Inoltre, derivati di nuova progettazione sintetizzati

da i farmaci più promettenti mostrano una maggiore durata di vita e distribuzione tissutale. La somministrazione in basse concentrazioni non tossiche dei farmaci e dei loro derivati ha migliorato significativamente la capacità di movimento e coordinazione, senza indurre tossicità. I nostri risultati indicano il possibile sfruttamento dei redox cycler per la terapia contro le malattie dovute alla disfunzione del complesso I e III della catena respiratoria.

23

Inborn errors of metabolism

Mitochondrial disease

RESCUING PNPASE DEFECTS IN BACTERIAL AND HUMAN CELL MODELS

Briani Federica[1], R. Pizzoccheri[1], F.A. Falchi[1], C. Camilloni[1]

[1]*Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale*

Project: GMR24T2008; Briani Federica

The main goal of this new project is to find small molecules that can help fix mutated forms of a crucial enzyme called polyribonucleotide phosphorylase (hPNPase). This enzyme is important for various functions in our cells' mitochondria. When the gene responsible for hPNPase, called PNPT1, has mutations, it can lead to serious neurological disorders (PNPT1-Related Multisystem Disease, PRMD). PRMD is very rare, and because of its rarity, pharmaceutical companies are unlikely to invest in developing treatments for it. Therefore, we need affordable ways to tackle this issue. To address this, I suggest using a drug repurposing strategy. This means we will look for so-far ignored activities of existing drugs that might help restore the function of the mutated hPNPase. We will screen about 3500 compounds that are either already approved for the human use or have passed early phases of clinical experimentation. The promising candidates will undergo further testing to see how well they work and if they are specific to the mutated enzyme. The assays I plan to apply in bacterial and human cell models and in vitro have been already set up in my laboratory thanks to previous support to my research by the Telethon Foundation (POLYVAR project, #GGP20001). Successful outcomes of this new project could relatively swiftly lead to pharmacological treatments, providing significant benefits for people with PRMD and their families. Moreover, the innovative "humanized" E. coli model we will use in this research could be explored to streamline drug development for other human diseases, especially those due to defective mitochondrial proteins conserved in bacteria.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattie mitocondriali

CORREGGERE DIFETTI DELLA PNPASI IN MODELLI UMANI E BATTERICI

L'obiettivo principale di questo nuovo progetto è trovare piccole molecole che possano aiutare a ripristinare la funzione di forme mutate di un enzima cruciale chiamato poliribonucleotide fosforilasi (PNPasi). Questo enzima è importante per varie funzioni nei mitocondri delle nostre cellule. Quando il gene per la PNPasi, chiamato PNPT1, presenta mutazioni, può portare a gravi disturbi neurologici (PNPT1-Related Multisystem Disease, PRMD). Questa condizione è molto rara e, a causa della sua rarità, è improbabile che le aziende farmaceutiche investano nello sviluppo di trattamenti ad hoc per curarla. Pertanto, per trovare una cura per queste malattie, abbiamo bisogno di sviluppare strategie relativamente poco costose. Per affrontare questa sfida, cercheremo attività ignote di farmaci esistenti che potrebbero aiutare a ripristinare la funzione della PNPasi mutata. In particolare, esamineremo una collezione di circa 3500 composti che sono già approvati per l'uso umano o che hanno superato le prime fasi della sperimentazione clinica. Le molecole promettenti saranno sottoposte a ulteriori test per capire come funzionano e se sono specifiche per la PNPasi mutata. I saggi che applicheremo nei modelli cellulari batterici e umani ed in vitro sono già stati sviluppati nel mio laboratorio nell'ambito del progetto POLYVAR precedentemente finanziato dalla Fondazione Telethon (#GGP20001). Risultati positivi di questo nuovo progetto potrebbero portare a trattamenti farmacologici in modo relativamente veloce, offrendo benefici significativi alle persone affette da PRMD e alle loro famiglie. Inoltre, l'innovativo modello di E. coli "umanizzato" che utilizzeremo potrebbe essere esplorato per ottimizzare lo sviluppo di farmaci per altre malattie umane, in particolare quelle causate da proteine mitocondriali difettose conservate nei batteri.

24

Inborn errors of metabolism

Mitochondrial DNA depletion syndrome

Hepatocerebral form of mtDNA depletion syndrome

24 HUMAN MPV17 FORMS ION CHANNELS IN A LIPID BILAYER

Corra' Samantha[1],
V. Checchetto[2], Y. Kravenska[2], A. Saponaro[3], A. Moroni[3]
I. Szabò[2], C. Viscomi[2], M. Zeviani

[1] *Padova, Istituto Veneto Di Medicina Molecolare (VIMM)*
[2]*Padova, Università Di Padova*
[3]*Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale*
[4]*Trieste, Ospedale Infantile Burlo Garofolo - IRCCS*

Project: GMR23T1065; Zeviani Massimo

Recently, we demonstrated that in vitro transcribed Drosophila melanogaster MPV17 (dMpv17) forms functional ion channels when inserted in a planar lipid bilayer. Notably, we showed that the electrica
l activity of dMpv17 is linked to the translocation of uridine, but not orotate across the membrane, highlighting its potential role in the transport of crucial metabolites. Additionally, we showed that the electrophysiological properties of dMpv17 are modified by pathogenetic mutations, the severity of which roughly correlates with the severity of the human condition. For instance, the S163F mutation completely abolished channel opening, while the R41Q mutation, which is typical of Navajo Neurohepatopathy, decreased without abolishing channel conductance. Here, we examined the biophysical properties of the human wild-type MPV17 (hMPV17) and of three different mutants, harboring three pathogenetic mutations. Specifically, the R50W and P64R mutations are linked to a hepatocerebral form of mtDNA depletion syndrome, while the P98L variant has been associated with Charcot-Marie Tooth disease. While the conductance of the hMPV17 measured in 150 mM KCl solution was comparable to that reported in previous experiments, R50W, P64R and P98L mutants form smaller channels.

These results are compatible with those observed in dMpv17 and support the hypohtesis that altered metabolite flux through MPV17 mutants may contribute to disease onset and progression. In addition, we are optimizing a purification pipeline to resolve the structure of hMPV17 by croygenic electron microscopy. Preliminary results indicate that the membrane mimetics amphipols are effective in producing single particles suitable for cryoEM analysis."

Difetti congeniti del metabolismo

Sindrome da deplezione del DNA mitocondriale; Sindrome da deplezioni del mtDNA; MDS

Forma epatocerebrale di malattia da deplezione del DNA mitocondriale

LA PROTEINA MPV17 FORMA CANALI IONICI IN UN DOPPIO STRATO LIPIDICO

Recentemente, abbiamo dimostrato che l'ortologo di MPV17 di Drosophila melanogaster (dMpv17), trascritto in vitro, è in grado di formare canali ionici funzionali quando inserito in un doppio strato lipidico artificiale. Inoltre, abbiamo evidenziato che dMpv17 è capace di trasportare uridina (ma non orotato) attraverso la membrana, suggerendo un potenziale ruolo nel trasporto di metaboliti essenziali. Abbiamo anche osservato che le proprietà elettrofisiologiche di dMpv17 vengono modificate da mutazioni patogenetiche, la cui gravità sembra essere correlata alla severità della condizione nell'uomo. Ad esempio, la mutazione S163F compromette quasi completamente l'apertura del canale, mentre la mutazione R41Q, caratteristica della neuroepatopatia Navajo, ne riduce la conduttanza. Nel presente studio, abbiamo esaminato le proprietà elettrofisiologiche della proteina umana (hMPV17) e di tre mutanti con diverse mutazioni patogenetiche. In particolare, le mutazioni R50W e P64R sono associate a una forma epatocerebrale di sindrome da deplezione di mtDNA, mentre la variante P98L è responsabile dell'insorgenza della malattia di Charcot-Marie-Tooth. La conduttanza di hMPV17, misurata in una soluzione di KCl 150 mM, è risultata in linea con i dati riportati in precedenti esperimenti, mentre i mutanti R50W, P64R e P98L formano canali di dimensioni inferiori. Questi risultati sono coerenti con quelli osservati per la proteina di Drosophila e supportano l'ipotesi che un flusso alterato di metaboliti attraverso questo canale possa contribuire all'insorgenza e alla progressione della malattia. Inoltre, stiamo perfezionando una pipeline di purificazione per risolvere la struttura di MPV17 tramite microscopia elettronica criogenica. I dati preliminari suggeriscono che l'uso di amfipoli permette di ottenere particelle adatte per l'analisi mediante cryoEM.

25

Inborn errors of metabolism

Mitochondrial disease

Isolated complex III deficiency

A MITOCHONDRIA-TARGETED DRUG AMELIORATES RESPIRATION AND IMPROVES MOTOR ENDURANCE IN A COMPLEX III DISEASE MODEL

Donadon M[1], Szabo Ildiko[1], Bonesso D.[1], Biasutto L.[2], Fontana D.[1], Putnik M.[1], Zeviani M.[1], Zoratti M.[1], Viscomi C.[1], Szabo I.[1]

[1]Padova, Università Di Padova
[2]Padova, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GMR23T2021; Szabo Ildiko

We have previously identified a class of small molecules able to shuttle electrons from NADH or reduced coenzymeQ to cytochrome c and thus enhance respiration and ATP level in cells lacking functional respiratory complex III. Even though in vivo application of these drugs enhance motor endurance and coordination, they are rapidly eliminated from the organisms. In order to improve their efficacy and pharmacokinetic profile, we generated specific derivatives that are targeted to mitochondria by means of a positively charged moiety covalently attached to the drugs. These new molecules are efficient at 100-fold lower concentrations compared to the original drug and show an improved pharmacokinetic profile and enhanced motor endurance in a complex III disease mouse model. Our results point to the possibility of ameliorating motor deficit caused by mitochondrial diseases linked to complex III dysfunction, without side effects.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattie mitocondriali

Deficit isolato del complesso III; Deficit isolato del complesso III della catena respiratoria mitocondriale

UN FARMACO INDIRIZZATO AI MITOCONDRI MIGLIORA LA RESPIRAZIONE E LA CAPACITA' MOTORIA IN UN MODELLO DI MALATTIA DEL COMPLESSO III

Abbiamo precedentemente identificato una classe di piccole molecole in grado di trasferire gli elettroni dal NADH o dal coenzimaQ ridotto al citocromo c, migliorando così la respirazione e il livello di ATP nelle cellule prive del complesso III funzionale della catena respiratoria. Anche se l'applicazione in vivo di questi farmaci aumenta la resistenza motoria e la coordinazione, essi vengono rapidamente eliminati dagli organismi. Per migliorarne l'efficacia e il profilo farmacocinetico, abbiamo generato derivati specifici che sono mirati ai mitocondri per mezzo di una molecola carica positivamente e attaccata covalentemente ai farmaci. Queste nuove molecole sono efficaci a concentrazioni 100 volte inferiori rispetto al farmaco originale e mostrano un profilo farmacocinetico migliore e una maggiore resistenza motoria in un modello murino di malattia del complesso III. I nostri risultati indicano la possibilità di migliorare il deficit motorio causato dalle malattie mitocondriali legate alla disfunzione del complesso III, senza effetti collaterali.

26

Inborn errors of metabolism

Niemann-Pick disease type C

EXPLORING NEW THERAPEUTIC TARGET FOR NIEMANN-PICK DISEASE: THE BET PROTEINS

Parente Martina[1], S. Caputo[1], A. Sacchi[1], M. Segatto[2], A. Barthelemy[3], F. Pfrieger[3], V. Pallottini[1]

[1]Rome, Università Di Roma Tre
[2]Pesche, Università Degli Studi Del Molise
[3]Strasbourg, University of Strasbourg, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences

Project: GMR23T2008; Pallottini Valentina

Niemann-Pick type C 1 disease (NPC) is a rare lysosomal disorder that is ultimately fatal, it is caused by mutation on Niemann-Pick type C 1 protein (NPC1) which mediates the extrusion of cholesterol and other lipids out of lysosomes. It manifests with a wide range of onset ages and symptoms, including visceral, neurological, and psychiatric issues, as well as varying life expectancies. Currently, treatment options are limited to palliative care and drugs that modify the disease's progression, underscoring the urgent need for new therapeutic strategies. In our study, we investigated BET proteins (bromodomain and extra-terminal domain) as potential drug targets for NPC using patient-derived fibroblasts carrying different NPC1 mutations. When cells were treated with JQ1, a BET protein inhibitor, we observed an increase both in NPC1 protein levels and localization to lysosomes. This treatment also reduced lysosomal enlargement and cholesterol buildup while promoting the release of lysosomal components outside the cell, in a dose- and time-dependent manner. The effect on NPC1 protein levels was largely consistent across different patient cell lines, although the degree of cholesterol reduction varied depending on the specific line. Additionally, we observed that JQ1, in combination with histone deacetylase inhibitors, produced concentration-dependent synergistic effects on cholesterol accumulation. Collectively, these findings support the role of epigenetic regulation in maintaining cellular NPC1 levels and cholesterol balance. This indicates that BET proteins play an essential role in cholesterol metabolism and could offer a promising new therapeutic avenue for treating NPC.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattia di Niemann-Pick disease tipo C; NP-C;

ESPLORAZIONE DI UN NUOVO BERSAGLIO TERAPEUTICO PER LA MALATTIA DI NIEMANN-PICK: LE PROTEINE ??BET

La malattia di Niemann-Pick di tipo C 1 (NPC) è un raro disturbo lisosomiale che risulta essere fatale ed è causato dalla mutazione sulla proteina di Niemann-Pick di tipo C 1 (NPC1) che media l'estrusione del colesterolo e di altri lipidi dai lisosomi. Si manifesta con un'ampia gamma di età di insorgenza e sintomi, tra cui problemi viscerali, neurologici e psichiatrici, nonché diverse aspettative di vita. Attualmente, le opzioni di trattamento sono limitate alle cure palliative e ai farmaci che modificano la progressione della malattia, sottolineando l'urgente necessità di nuove strategie terapeutiche. Nel nostro studio, abbiamo esaminato le proteine BET come potenziali bersagli farmacologici per la NPC utilizzando fibroblasti derivati da pazienti portatori di diverse mutazioni NPC1. In seguito al trattamento delle cellule con JQ1, un inibitore della proteina BET, abbiamo osservato un aumento sia nei livelli della proteina NPC1 che nella localizzazione lisosomiale. Questo trattamento ha anche ridotto l'ingrossamento lisosomiale e l'accumulo di colesterolo, promuovendo al contempo il rilascio di componenti lisosomiali all'esterno della cellula, in modo dose e tempo dipendente. L'effetto sui livelli di proteina NPC1 è stato ampiamente coerente tra le diverse linee cellulari dei pazienti, sebbene il grado di riduzione del colesterolo variasse a seconda della linea specifica. Inoltre, abbiamo osservato che JQ1, in combinazione con inibitori dell'istone deacetilasi, ha prodotto effetti sinergici concentrazione dipendenti sull'accumulo di colesterolo. Nel complesso, questi risultati supportano il ruolo della regolazione epigenetica nel mantenimento dei livelli cellulari di NPC1 e dell'equilibrio del colesterolo. Ciò indica che le proteine BET svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo del colesterolo e che potrebbero offrire una nuova promettente via terapeutica per il trattamento dell'NPC.

27

Inborn errors of metabolism

Niemann-Pick disease type C

DISSECTING THE ROLE OF CYTOPLASMIC SIGNALING METABOLITES IN NIEMANN-PICK DISEASE TYPE C

Carrer Alessandro[1], "G. Milan[1], M. Spacco[1], R. Zoncu[2])

[1]Padova, Istituto Veneto Di Medicina Molecolare (VIMM)
[2]Berkeley, Istituto Veneto Di Medicina Molecolare (VIMM)

Project: GMR23T1060; Carrer Alessandro

Mutations in the NPC1 gene cause accumulation of cholesterol within lysosomes, leading to the neurodegenerative Niemann-Pick type C disease (NPCD). However, the molecular mechanisms linking lysosomal storage dysfunction to neurodegeneration are largely unknown. We interrogate lysosome-initiated metabolic reprogramming as a primary driver of NPCD pathogenesis and a pharmacologically actionable target. The mammalian Target of Rapamycin-1 (mTORC1), which senses lysosomal cholesterol levels is hyper-activated in NPCD cells. Accordingly, mTORC1 inhibition alleviates cellular hallmarks of NPCD; in particular, it restores mitochondrial activity, which is invariably dysfunctional in NPCD and contributes to neuronal pathogenesis. Mitochondrial function is critically supported by intermediates of the mevalonate pathway (MVP) that uses the signaling metabolite (and universal acetyl donor) acetyl-CoA to synthetize sterols and isoprenoids. Preliminary data show that lysosomal cholesterol overload perturbs the MVP in an mTORC1-dependent manner. It also elevates histone acetylation, which is sensitive to the availability of acetyl-CoA. We hypothesized mTORC1-regulated MVP intermediates impact a) the mitochondria and b) the nuclear epigenome. Testing neuronal cell lines - including i3neurons - showed mTORC1-dependent mitochondrial fragmentation and redox dyshomeostasis in NPCD cells, which become susceptible to ferroptotic death. Mechanistically, this is mediated by phosphorylation of the fission factor DRP-1 and accumulation of mtROS. We also observed remodeling of acetylated histones that exacerbates in differentiated neurons. The contribution of acetyl-CoA-dependent epigenetic deregulation to impaired neuronal function is being examined. The project will illuminate MVP-mTORC1 synergism as targetable contributor of NPCD pathogenesis to possibly unveil environmental factors that influence disease outcome.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattia di Niemann-Pick disease tipo C; NP-C;

STUDIO DEI METABOLITI CITOPLASMATICI NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA DI NEIMANN-PICK DI TIPO C

Le mutazioni nel gene NPC1 causano l'accumulo di colesterolo all'interno dei lisosomi, portando alla malattia neurodegenerativa di Niemann-Pick di tipo C (NPCD). Tuttavia, i meccanismi molecolari che collegano la disfunzione dell'accumulo lisosomiale alla neurodegenerazione sono in gran parte sconosciuti.

Il Target della Rapamicina nei mammiferi-1 (mTORC1), che rileva i livelli di colesterolo lisosomiale, è iperattivato nelle cellule NPCD. Di conseguenza, l'inibizione di mTORC1 allevia i segni cellulari della NPCD; in particolare, ripristina l'attività mitocondriale, che è invariabilmente disfunzionale nella NPCD e contribuisce alla patogenesi neuronale.

La funzione mitocondriale è supportata dagli intermedi della via del mevalonato (MVP) che utilizza il metabolita di segnalazione (e donatore universale di acetile) acetil-CoA per sintetizzare steroli e isoprenoidi. Dati preliminari mostrano che il sovraccarico di colesterolo lisosomiale altera l'MVP in modo dipendente da mTORC1. Aumenta anche l'acetilazione degli istoni, che è sensibile alla disponibilità di acetil-CoA. Abbiamo ipotizzato che gli intermedi dell'MVP regolati da mTORC1 influenzino a) i mitocondri e b) l'epigenoma nucleare.

Test su linee cellulari neuronali - inclusi i3neurons - hanno mostrato una iper frammentazione mitocondriale dipendente da mTORC1 e difetti redox nelle cellule NPCD, che diventano suscettibili alla morte ferroptotica. Questo è mediato dalla fosforilazione del fattore di fissione mitocondriale DRP-1 e dall'accumulo di mtROS.

Abbiamo anche osservato un rimodellamento degli istoni acetilati particolarmente evidente nei neuroni differenziati. Stiamo esaminando il contributo della deregolazione epigenetica dipendente dall'acetil-CoA alla compromissione della funzione neuronale.

Il progetto farà luce sul sinergismo MVP-mTORC1 come contributo bersagliabile della patogenesi NPCD per possibilmente svelare fattori ambientali che influenzano l'esito della malattia.

28

Inborn errors of metabolism

GM1-gangliosidosis

Molecular Evolution of an Hyperfunctional ?-galactosidase for the HSC Gene Therapy of GM1 Gangliosidosis

Bucciarelli Linda[1], E. Scarabello[1], G. Altieri[1], C. Laterza[1] V. Poletti[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GMR24T2020; Poletti Valentina

"Lysosomal Storage Diseases (LSDs) are rare inherited metabolic disorders caused by deficiency of a lysosomal protein. Few LSDs benefit from Enzyme Replacement Therapy (ERT), as it cannot cross the blood-brain barrier. Allogeneic Hematopoietic Stem/Progenitor Cell (HSC) transplantation (HSCT) may provide metabolic cross-correction by the activity of donor-derived myeloid/microglial cells acting as a local source of therapeutic enzyme, reducing lysosomal storage and local inflammation. However, HSCT is not an indication for most neurodegenerative LSDs. HSC Gene Therapy (GT), i.e. autologous transplantation of gene-modified HSCs, showed safety and transformative clinical efficacy for multiple LSDs, without requiring a cell-donor, any immunological issue and a faster immune reconstitution. GM1 gangliosidosis (OMIM #230500) is a lethal, neurological LSD caused by deficiency of β-galactosidase (β-gal), encoded by the GLB1 gene. Our recent data produced in Glb1-/- mice, showed a higher therapeutic potential of the murine enzyme compared to the human one, providing phenotypic amelioration in vivo at a minimal vector dose. The aim of this study is the design of a hyperfunctional human β-gal (hyβ-gal) for the HSC GT of GM1 Gangliosidosis, based on the murine isoform. It would retain the higher activity and stability of the murine enzyme, while preserving physiological protein-protein interactions in a human context. It will be tested for phenotype correction in patient-derived fibroblasts and GM1-derived human brain organoids. We are currently characterizing a first hyβ-gal, which sustained a ~6-fold higher activity than the hu. enzyme, comparable to the murine isoform, in human K562 cells and patient-derived fibroblasts. Preliminary data supports its correct processing and secretion. Overall, this project has the ambition of providing early proof-of-efficacy of a hyβ-gal GT approach in relevant preclinical models of GM1 Gangliosidosis, supporting its future translation."

Difetti congeniti del metabolismo

Gangliosidosi GM1

EVOLUZIONE IN VITRO DI UN ENZIMA ?-GALATTOSIASI IPERFUNZIONALE PER LA TERAPIA GENICA BASATA SU CELLULE STAMINALI E PROGENITRICI EMATOPOIETICHE PER LA GANGLIOSIDOSI GM1

Le Malattie da Accumulo Lisosomiale (LSDs) sono rare patologie metaboliche ereditarie causate dalla carenza di una proteina lisosomiale. Poche LSDs beneficiano della Terapia di Sostituzione Enzimatica (ERT), a causa dei limiti legati alla barriera ematoencefalica. Il trapianto allogenico di cellule staminali/progenitrici ematopoietiche (HSCT) può fornire una cross correzione metabolica grazie all'attività delle cellule mieloidi/microgliali derivate dal donatore, che agiscono come fonte locale dell'enzima terapeutico. Tuttavia, l'HSCT non è indicato per la maggior parte delle LSDs neurodegenerative. La terapia genica, basata su trapianto autologo di HSC geneticamente modificate, ha dimostrato sicurezza ed efficacia clinica trasformativa per molte neuro-LSD. La gangliosidosi GM1 è una neuro-LSD causata dalla carenza di β-galattosidasi (β-gal), codificata dal gene GLB1. Dati recenti ottenuti su modelli murini Glb1-/-, hanno mostrato un potenziale terapeutico superiore dell'enzima murino rispetto a quello umano, con un miglioramento fenotipico in vivo a una dose minima di vettore. L'obiettivo di questo studio è sviluppare una β-gal umana iperfunzionale (hyβGal) ispirata alla isoforma murina. hyβGal sarà caratterizzata una maggiore attività e stabilità, preservando al contempo le interazioni proteina-proteina fisiologiche in un contesto umano. Il potenziale terapeutico verrà testato in fibroblasti derivati da pazienti e in organoidi cerebrali umani derivati da GM1. Attualmente stiamo caratterizzando una prima hyβGal, che ha mostrato un'attività ~6 volte superiore rispetto all'enzima umano e paragonabile alla isoforma murina, in cellule K562 e fibroblasti di pazienti. Dati preliminari supportano il suo corretto processamento e secrezione. Complessivamente, questo progetto si propone di fornire una prima dimostrazione di efficacia di un approccio di GT basato su hyβGal in modelli preclinici rilevanti per la futura traduzione clinica.

29

Inborn errors of metabolism

Fabry disease

Lysosomal storage disease

THE PROKINETICIN SYSTEM AND GLIA CELLS AS PHARMACOLOGICAL TARGETS TO CONTROL NEUROINFLAMMATION AND TO RELIEVE PAIN IN A MURINE MODEL OF FABRY-ANDERSON DISEASE

Sacerdote Paola[1], G. Galimberti[1], S. Franchi[1], G. Amodeo[1], B. Riboldi[1], S. Ceruti[1], P. Sacerdote[1]

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GMR24T1073; Sacerdote Paola

Fabry-Anderson disease (FD) is an X-linked lysosomal storage disorder. A deficient alpha-galactosidase A (Gal-A) leads to Gb3 accumulation in different tissues, including the nervous system. FD patients suffer from lifetime-lasting neuropathic pain that develops in childhood and resists specific treatments. Glial and infiltrating immune cells into the nervous system are involved in neuropathic pain pathogenesis. The prokineticin system (PKS) is a family of chemokines important in inflammation and pain that may represent a new therapeutic target. PKS antagonists counteract chronic inflammatory and neuropathic pain in several conditions. This study wants to investigate whether PKS antagonism with PC1 and glial inhibition with minocycline, contrasting neuroinflammation, may relieve FD pain both in an early and more advanced stage of the pathology, proposing a novel pharmacological approach. 10 and 25-week-old FD male mice, Gal-A deficient, were treated with minocycline (10 mg/kg, intraperitoneal, once daily) and PC1 (150 µg/kg, subcutaneous, twice daily) for fourteen consecutive days. Hypersensitivity was constantly monitored. Levels of PKS, cytokines and (neuro)inflammatory markers were evaluated in sciatic nerve, dorsal root ganglia, spinal cord and gut as mRNA and protein. All FD mice suffer from mechanical allodynia, thermal hyperalgesia, abdominal pain and are hyposensitive to cold stimuli. These alterations are associated with marked neuroinflammation, with PKS up-regulation, pro-inflammatory cytokines increase, and glia/immune cells' markers overexpression in the analyzed tissue. Both PC1 and minocycline relief all the painful symptoms and reduce neuroinflammation. Our data demonstrate that pharmacological inhibition of the PK system (by PC1) or the glial cells (by minocycline) may be a promising approach to control FD pain.

Difetti congeniti del metabolismo

malattia di Fabry; Deficit di alfa-galattosidasi A; FD; Malattia di Anderson-Fabry ; Angiocheratoma diffuso;

Malattie da accumulo lisosomiale

IL SISTEMA DELLE PROCHINETICINE E LE CELLULE GLIALI COME BERSAGLIO FARMACOLOGICO PER CONTROLLARE LA NEUROINFIAMMAZIONE E ALLEVIARE IL DOLORE IN UN MODELLO MURINO DI MALATTIA DI ANDERSON-FABRY

La malattia di Anderson-Fabry (FD) è una patologia genetica da accumulo lisosomiale. La scarsa presenza dell'enzima alfa-galactosidasi (α-gal) causa l'accumulo di GB3 in numerosi tessuti, incluso il sistema nervoso. I pazienti Fabry soffrono di dolore neuropatico che si presenta nell'infanzia, dura tutta la vita ed è poco responsivo ai trattamenti odierni. Le cellule gliali e quelle immunitarie infiltranti in sistema nervoso sono coinvolte nella patogenesi del dolore neuropatico. Il sistema delle prochineticine (PKS) è una famiglia di chemiochine importanti nella infiammazione e nel dolore e rappresentano un nuovo bersaglio terapeutico, dal momento che antagonisti farmacologici del PKS tolgono il dolore neuropatico di altra origine. Questo studio vuole scoprire se l'antagonista del PKS, PC1 e l'inibizione della glia con l'antibiotico minociclina, contrastando la neuroinfiammazione siano in grado di togliere il dolore sia in una fase precoce sia avanzata della patologia. Topi Fabry, mancanti di α-gal, di 10 e 25 settimane di età sono trattati per 14 giorni con minociclina (10 mg/Kg una volta/die) o con PC1 (50ug/Kg due volte /die). Il dolore è valutato per tutta la durata del trattamento e alla fine sono stati misurati i livelli del PKS, delle citochine e dei marker di neuroinfiammazione nei nervi, gangli delle radici dorsali,nel midollo spinale e nell'intestino. I topi Fabry presentavano molti sintomi dolorosi, quali allodinia tattile e termica, iperalgesia termica e dolore addominale. Questi sintomi erano associati ad un significativo stato di neuroinfiammazione in tutti i tessuti analizzati, con aumento del PKS, delle citochine pro-infiammatorie e un' attivazione gliale e microgliale. Sia l'aminociclina sia PC1 erano in grado di alleviare il dolore e di ridurre la neuroinfiammazione. I dati suggeriscono che l'inibizione farmacologica del PKS e dell'attivazione gliale siano approcci molto promettenti per alleviare il dolore neuropatico nella malattia di Fabry.

30

Inborn errors of metabolism

Fabry disease

Lysosomal storage disease

LIVER-DIRECTED GENE TARGETING AS A POTENTIAL THERAPY FOR FABRY DISEASE

Muro Andres[1], H. Saxena[1], J. Biasizzo[2], G. Romano[1], R. Domenis[2], G. Bortolussi[1], D. Ferino[2], A. Iaconcig[1], M. Ferro[2], A. Vicidomini[1], L. Zentilin[1], A. Dardis[2]

[1]Trieste, International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology (ICGEB)"
[2]Udine, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria Della Misericordia

Project: GGP20128; Muro Andrés

"Fabry disease (FD) is an X-linked inherited, lysosomal storage disorder caused by Alpha Galactosidase-A (GLA) gene mutations, resulting in the accumulation of glycosphingolipids (globotriaosylceramide, Gb3) in lysosomes, systemic clinical manifestations and reduced lifespan. Enzyme replacement therapy (ERT) and chaperone therapy are noncurative and with limitations. We developed a potential therapeutic approach based on the permanent genetic modification of hepatocytes by targeting the albumin locus in vivo with a WT or codon-optimised (CO) version of the human GLA cDNA. We modelled late-onset and early-onset FD by treating juvenile (P30) and neonatal (P5) Fabry mice (Gla KO). To increase safety related to programmable nucleases, we applied a nuclease-free approach coupled with the treatment with fludarabine, which enhances gene targeting rate. Lyso-Gb3 reduction in plasma and tissues of juvenile mice was in the range of 80-95%, higher than the reduction obtained using SaCas9 (60-80%). The approach was also tested in neonatal P5 mice and results are under analysis. Preliminary data of mice treated with donor and Cas9 showed higher efficacy than in juvenile mice. A dose escalation study with liver-specific AAV-mediated episomal gene therapy was done as a proof-of-principle in juvenile mice. Treatment with the lowest dose (3.0E11vg/kg) resulted in the clearance of 85-95% lyso-Gb3 in target tissues, being more efficient than ERT treatment. Higher doses completely cleared lysoGb3 accumulation. We showed that treatment of early-onset FD is very effective with a genome targeting strategy, while non-integrating AAV-mediated liver gene therapy is very efficacious for late onset FD, even at low AAV doses. This data supports a promising one-shot therapy approach to ameliorate the phenotype irrespective of the mutation, targeting both the early and late-onset FD conditions. The translational applicability of the integrative strategy is being validated in humanized mice."

Difetti congeniti del metabolismo

malattia di Fabry; Deficit di alfa-galattosidasi A; FD; Malattia di Anderson-Fabry ; Angiocheratoma diffuso

Malattie da accumulo lisosomiale

TERAPIA PER LA MALATTIA DI FABRY BASATA SULL'EDITING GENETICO NEL FEGATO SENZA L'UTILIZZO DI NUCLEASI

La malattia di Fabry (FD) è causata da mutazioni nel gene dell'alfa galattosidasi-A (GLA), determinando l'accumulo di glicosfingolipidi (Gb3) nei lisosomi, gravi manifestazioni cliniche e ridotta aspettativa di vita. Le terapie attuali, come la terapia di sostituzione enzimatica (ERT) e la terapia con chaperone, non sono risolutive e presentano limiti significativi. Abbiamo sviluppato un approccio terapeutico basato sull'inserimento permanente del cDNA umano GLA nel genoma degli epatociti in vivo. Per modellare la FD ad esordio precoce e tardivo, abbiamo trattato topi Fabry (GLA KO) giovani (P30) e neonatali (P5). Per aumentare la sicurezza correlata alle nucleasi programmabili, abbiamo applicato un approccio senza nucleasi abbinato al trattamento con fludarabina, che aumenta il tasso di targeting genico. Questo ha portato a una riduzione dell'accumulo di liso-Gb3 nel plasma e nei tessuti tra l'80% e il 95%, superiore al risultato ottenuto con SaCas9 (60%-80%). L'approccio è stato inoltre testato nei topi P5 neonati e i risultati sono in fase di analisi. Parallelamente, è stato condotto uno studio con terapia genica episomiale mediata da AAV fegato-specifica nei topi giovani. Il trattamento con la dose bassa (3.0E11vg/kg) ha determinato la riduzione dell'85-95% di liso-Gb3 nei tessuti, risultando più efficiente di ERT. Dosi superiori hanno completamente eliminato l'accumulo. In sintesi, abbiamo dimostrato che il trattamento della FD ad esordio precoce risulta altamente efficace mediante una strategia di targeting genomico. La terapia genica epatica non integrativa mediata da AAV è molto efficace per la FD ad esordio tardivo, anche a dosi ridotte di AAV. Questi dati supportano un promettente approccio terapeutico one-shot per migliorare il fenotipo indipendentemente dalla mutazione, offrendo soluzioni efficaci per entrambe le forme di FD. L'applicabilità traslazionale della strategia integrativa è in fase di validazione su modelli murini umanizzati.

31

Inborn errors of metabolism

Gaucher disease

Lysosomal storage disease

31ENHANCING INTERACTIONS WITH ?-GLUCOCEREBROSIDASE BY CYCLOPROPANE-FUSED PIPECOLIC ACID DERIVATIVES

Della Nave Giulio[1], D. Scarpi[1], Sesto Fiorentino[1], C. Matassini[1], A. Goti[1], F. Cardona[1], E. G. Occhiato[1], F. Clemente[1]

[1]Sesto Fiorentino, Università Di Firenze

Project: GSA22P001; Clemente Francesca

Gaucher's disease (GD) is one of the most common lysosomal storage diseases, and it is characterized by a series of symptoms, that ranges from the abnormal enlargement of internal organs and skeletal complications to more severe neurological impairments, often leading to high mortality, especially in infancy. This genetic disorder follows an autosomal recessive inheritance pattern, and it is caused by mutations in the gene encoding the lysosomal enzyme β-glucocerebrosidase (GCase). These mutations alter the enzyme's structure, preventing its proper trafficking to the lysosome, where it normally hydrolyses glucosylceramide (GlcCer) into glucose and ceramide. In recent years, an innovative therapeutic approach, known as pharmacological chaperone therapy, has been developed. This treatment is usually based on reversible inhibitors that, when administered at sub-inhibitory concentration, interact with the mutated enzyme to restore its correct structure and catalytic activity. Among the most promising pharmacological chaperones for GCase there are polyhydroxylated piperidine compounds. In this concept, these molecules have been further functionalized by introducing a cyclopropane moiety, using suitable derivatives of pipecolic acids as starting materials. These pipecolic acid derivatives, which can be synthesized from common aldose sugars, represent an ideal platform to insert various substituents, such as long alkyl chains, which have shown an increased affinity for GCase. The effect of incorporating a fused cyclopropane system into these derivatives will be studied to determine how the resulting structural rigidity influences their biological activity towards GCase enzyme.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattia di Gaucher; Deficit di acido beta-glucosidasi;

Malattie da accumulo lisosomiale

COME MIGLIORARE LE INTERAZIONI CON LA ?-GLUCOCEREBROSIDASI MEDIANTE DERIVATI DELL'ACIDO PIPECOLICO CICLOPROPANATI

La malattia di Gaucher (GD) è una delle più comuni malattie da accumulo lisosomiale, ed è caratterizzata da un'ampia gamma di disturbi che vanno dall'ingrossamento anomalo degli organi interni e da complicazioni scheletriche fino a gravi compromissioni neurologiche, spesso associate a un'elevata mortalità, soprattutto nell'infanzia. Questo disturbo genetico segue un modello di ereditarietà autosomica recessiva ed è causato da mutazioni nel gene che codifica l'enzima lisosomiale β-glucocerebrosidasi (GCase). Le mutazioni alterano la struttura dell'enzima, impedendone il corretto trasporto al lisosoma, dove normalmente catalizza la degradazione della glucosilceramide (GlcCer) in glucosio e ceramide. Negli ultimi anni è stata sviluppata una nuova strategia terapeutica nota come terapia farmacologica chaperonica . Questo approccio si basa sull'uso di inibitori reversibili che, somministrati a concentrazioni sub-inibitorie, interagiscono con l'enzima mutato per ripristinarne la corretta struttura e attività catalitica. Tra i chaperoni farmacologici più promettenti per GCase vi sono composti a struttura piperidinica poliidrossilata. In questo lavoro, i composti sono stati ulteriormente funzionalizzati con l'introduzione di un sistema ciclopropanico, utilizzando derivati idonei di acidi pipecolici come materiali di partenza. Questi derivati, sintetizzabili a partire da comuni zuccheri aldosi, rappresentano una piattaforma ideale per l'introduzione di vari sostituenti, come lunghe catene alchiliche, importanti per l'interazione con GCase. L'effetto dell'incorporazione di un sistema ciclopropanico fuso in questi derivati sarà studiato per valutare come la rigidità strutturale risultante influenzi la loro attività biologica nei confronti dell'enzima GCase.

32

Inborn errors of metabolism

Gaucher disease

Lysosomal storage disease

ENHANCING GCASE ACTIVITY FOR GAUCHER DISEASE: A NOVEL MULTITARGET APPROACH THROUGH THE SYNTHESIS OF ANTIOXIDANT/ANTI-INFLAMMATORY PHARMACOLOGICAL CHAPERONES.

Morano Alessio[1], C. Matassini[1], A. Goti[1](Co-author), F. Cardona[1], F. Clemente[1]

[1]Sesto Fiorentino, Università Di Firenze

Project: GSA22P001; Clemente Francesca

The multitarget approach is a therapeutic strategy aimed at simultaneously targeting multiple molecular factors associated with a disease. This concept is particularly useful for treating complex disorders, which often result from multiple pathological processes. Among these, nitrogen-containing glycomimetics like iminosugars have gained attention as pharmacological chaperones (PCs) for the treatment of lysosomal storage disorders (LSDs). PCs are small molecules that assist in restoring the function of mutated enzymes by promoting proper folding and enhancing their transport from endoplasmic reticulum to lysosomes when used at subinhibitory concentrations. In this study, we synthesized a series of trihydroxypiperidines conjugated with antioxidant or anti-inflammatory moieties, designed as bifunctional agents for the treatment of Gaucher disease (GD), the most common LSD, which results from mutations in the GBA gene encoding lysosomal β-glucocerebrosidase enzyme (GCase). By potentially restoring GCase activity while reducing the oxidative stress and inflammatory state observed in GD patients, these molecules offer a dual-target therapeutic approach. The study presents the synthesis of these bifunctional molecules and their biological evaluation in relation to GCase activity. All synthesized molecules exhibited significant inhibitory activity, with IC50 values in the micromolar range, when evaluated on the recombinant enzyme at neutral pH, mimicking endoplasmic reticulum conditions. When the assay was performed at acidic pH (5.8), higher IC50 values were considered favorable (indicating less inhibitory activity), as under the acidic conditions of the lysosome, the chaperone should allow the natural substrate of the enzyme (glucosylceramide) to bind, facilitating its hydrolysis. Under these conditions, a significant increase in GCase activity was observed, with activity enhanced by a factor of 1.2-fold to 3-fold.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattia di Gaucher; Deficit di acido beta-glucosidasi

Malattie da accumulo lisosomiale

POTENZIARE L'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA GCASE PER LA MALATTIA DI GAUCHER: UN NUOVO APPROCCIO MULTITARGET ATTRAVERSO LA SINTESI DI NUOVI CHAPERONI FARMACOLOGICI ANTIOSSIDANTI E ANTINFIAMMATORI.

La strategia multitarget è un approccio terapeutico volto a colpire contemporaneamente diversi fattori molecolari associati a una malattia. Questo concetto è particolarmente utile per trattare disturbi complessi, che spesso derivano da processi patologici multipli. A questo proposito, i glicomimetici azotati, come gli iminosugari, hanno attirato l'attenzione come chaperoni farmacologici (PC) per il trattamento di malattie da accumulo lisosomiale (LSD). I PC sono piccole molecole che aiutano a ripristinare la funzione degli enzimi mutati, promuovendo il corretto ripiegamento e migliorando il loro trasporto dal reticolo endoplasmatico (ER) ai lisosomi quando utilizzati a concentrazioni subinibitorie. In questo lavoro, sono state sintetizzate una serie di triidrossipiperidine legate a gruppi antiossidanti o antinfiammatori, come agenti bifunzionali per il trattamento della malattia di Gaucher (GD), la più comune LSD, causata da mutazioni nel gene GBA che codifica per l'enzima lisosomiale β-glucocerebrosidasi (GCase). Queste molecole offrono un approccio terapeutico bifunzionale, ripristinando l'attività di GCase e riducendo lo stress ossidativo e l'infiammazione nei pazienti con GD. Lo studio presenta la sintesi di queste molecole bifunzionali e la loro valutazione biologica in relazione all'attività di GCase. Tutte le molecole sintetizzate hanno mostrato una significativa attività inibitoria, con valori di IC50 nel micromolare, quando valutate sull'enzima ricombinante a pH neutro, simulando le condizioni del ER. Quando il test è stato eseguito a pH acido (5.8), valori più alti di IC50 vengono considerati favorevoli (indicando una minore attività inibitoria), poiché, nelle condizioni acide del lisosoma, il chaperone dovrebbe lasciare il posto al substrato naturale dell'enzima (glucosilceramide), facilitandone l'idrolisi. In queste condizioni, è stato osservato un aumento significativo dell'attività di GCase, con un incremento dell'attività da 1.2 a 3 volte.

33

Inborn errors of metabolism

Gaucher disease

Lysosomal storage disease

SEVERE GBA1 MUTATIONS: IDENTIFICATION OF CELLULAR DAMAGES AND A NOVEL NANOBODY-BASED THERAPEUTIC STRATEGY IN NEURONOPATHIC GAUCHER DISEASE

Sinisgalli Chiara[1], E. Franzin[1], F. Sansonetti[1], T. Dal Maso[2], E. Greggio[1], W. Versées[2], N. Plotegher[1]

[1]Padova, Università Di Padova
[2]Bruxelles, VIB-VUB Center for Structural Biology; Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel

Project: GMR23T2024; Plotegher Nicoletta

Gaucher disease (GD) is a lysosomal storage disorder caused by homozygous or compound heterozygous mutations of GBA1, the gene encoding the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase). Over 300 mutations in GBA1 have been identified, affecting the enzyme's activity, its correct folding and trafficking. In turn, the homeostasis of various cellular compartments is affected. In addition to lysosomes, several studies reported ER stress due to accumulation of unfolded protein and Golgi fragmentation was also observed. In the present work, we characterize different GBA1 mutations by combining an in silico approach, in vitro mutant GCase production and characterization and cellular studies. Different GCase mutants (N370S, L444P, E326K, G325R and F213I) were characterized using several computational tools, such as MAESTROWeb, DUET, DDGun and iStable to evaluate protein stability. These same mutants were purified from ExpiHEK cells to conduct in vitro assays to study their activity and stability. In parallel, confocal imaging and electron microscopy experiments were performed on fibroblasts from patients carrying these mutations. These data showed Golgi fragmentation and alteration in the normal structure of the ER, which lost its tubular and well-defined organization. Understanding the mechanisms of action of different mutants is key to identify new therapeutic targets. Although therapies like enzyme replacement (ERT) and substrate reduction (SRT) have

improved patient outcomes, no cure exists and SRT and ERT do not improve neurological symptoms of neuronopathic GD (nGD). Thus, we developed 20 nanobodies (Nbs) that bind GCase with varying affinities, and able to improve its stability and activity. Some showed promising results also for the N370S mutant, suggesting that they can also affect the non-functional mutants associated to nGD.Further experiments will focus on assessing the potential application of Nbs to improve the function of the previously selected GCase mutants

Difetti congeniti del metabolismo

Malattia di Gaucher; Deficit di acido beta-glucosidasi;

Malattie da accumulo lisosomiale;

MUTAZIONI di GBA1: IDENTIFICAZIONE DEI DANNI CELLULARI E NANOBODIES COME NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA NELLA MALATTIA DI GAUCHER NEURONOPATICA

La malattia di Gaucher (GD) è un disturbo da accumulo lisosomiale causato da mutazioni omozigoti o eterozigoti composti nel gene GBA1, che codifica per l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi (GCase). Sono state identificate oltre 300 mutazioni nel gene GBA1 che influenzano l'attività dell'enzima, il suo corretto ripiegamento e il suo traffico, compromettendo l'omeostasi di vari compartimenti cellulari. Nel presente lavoro, ci occupiamo di studiare diverse mutazioni di GBA1 combinando un approccio in silico, la produzione e la caratterizzazione in vitro della GCase mutata e studi cellulari. Diverse mutazioni di GCase (N370S, L444P, E326K, G325R e F213I) sono state caratterizzate utilizzando diversi strumenti computazionali, come MAESTROWeb, DUET, DDGun e iStable, per valutare la stabilità della proteina. Queste stesse mutazioni sono state purificate da cellule ExpiHEK per condurre saggi in vitro per studiarne l'attività e la stabilità. Parallelamente, sono stati eseguiti esperimenti di imaging confocale e microscopia elettronica su fibroblasti di pazienti portatori di queste mutazioni. I dati mostrano frammentazione del Golgi e alterazioni nella normale struttura del reticolo endoplasmatico. Comprendere i meccanismi d'azione di diverse mutazioni è fondamentale per identificare nuovi bersagli terapeutici. Sebbene le terapie come la sostituzione enzimatica (ERT) e la riduzione del substrato (SRT) abbiano migliorato gli esiti nei pazienti, non esiste una cura e SRT ed ERT non migliorano i sintomi neurologici della forma neuropatica (nGD). Pertanto, abbiamo sviluppato 20 nanobodies (Nb) che si legano a GCase con affinità variabili e in grado di migliorarne la stabilità e l'attività. Alcuni hanno mostrato risultati promettenti promettenti anche per la mutazione N370S, suggerendo che possano influenzare anche i mutanti non funzionali associati a nGD. Ulteriori esperimenti valuteranno la possibile applicazione dei Nb anche sugli altri mutanti di GCase selezionati.

34

Inborn errors of metabolism

Lysosomal storage disease

TOLEROGENIC DENDRITIC CELL-BASED IMMUNOTHERAPY TO PREVENT UNWANTED IMMUNE RESPONSE IN ENZYME REPLACEMENT THERAPY FOR LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS

Fortunato Marta Fortunato[1], D. Tomasoni[1], F. Russo[1], S. Gasperini[2], S. Fecarotta[3], M.E. Bernardo[1], G. Parenti[3], A. Aiuti[1], L. Passerini[1], S. Gregori[1]

[1]Milan, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[2]Monza, Fondazione IRCCS San Gerardo Dei Tintori
[3]Naples, Università Di Napoli Federico II

Project: TGT22C09; Gregori Silvia

Enzyme replacement therapy (ERT), when available, is the treatment of choice for Lysosomal Storage Disorders (LSDs). Immune response to the infused enzyme can occur in treated patients (pts) limiting the therapeutic efficacy of protein replacement approaches. We demonstrated that IL-10 engineered tolerogenic dendritic cells (DCAg/IL-10) can efficiently modulate antigen(Ag)-specific T and B cell responses. Here we propose the use of DCAg/IL-10 as enzyme-specific adjuvant immunotherapy for LSD pts undergoing ERT. To characterize the immune status of ERT treated pts (Mucopolysaccharidosis (MPS)-I, MPSIVA, Pompe disease, '-mannosidosis), we dissected their immune response to the therapeutic enzyme and tested the effect of DCAg/IL-10 on the adaptive responses to ERT in a mouse model of LSD. Anti-drug antibodies (ADA) were present in the serum of most of the pts with high titer early after ERT initiation. ADA progressively switched form IgG1 to IgG4 subclass and interfered with enzyme uptake in vitro. Furthermore, we found increased levels of inflammatory cytokines/chemokines in pts' plasma, compared to healthy controls. Despite the altered environment, pts' monocytes could efficiently acquire tolerogenic properties upon differentiation into IL-10 producing tolerogenic DCs (DC-10). In MPSI mice (a-L-iduronidase; IDUA-/-) receiving ERT, we detected IDUA-specific CD4+ T cells early after ERT initiation and the induction of anti-IDUA antibodies in a T cell dependent manner. Repetitive injections of engineered DCs expressing IDUA and IL-10 reduced circulating anti-IDUA antibodies. Our results suggest that, in ERT treated pts, a pro-inflammatory milieu can sustain the aberrant activation of peripheral immune cells, thus indirectly contributing to the enzyme-specific adaptive immune response while not impacting the tolerogenic potential of DCs. In vivo data suggest that tolDC therapy can limit the immune response elicited by ERT, thus potentially fostering its efficacy.

Difetti congeniti del metabolismo

Malattie da accumulo lisosomiale;

Immunoterapia basata su cellule dendritiche tollerogeniche per prevenire la risposta immunitaria avversa nella terapia enzimatica sostitutiva per le malattie da accumulo lisosomiale

La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) è il trattamento standard per le malattie da accumulo lisosomiale (LSD). I pazienti trattati (pz) possono sviluppare una risposta immunitaria (RI) contro l'ERT, limitando l'efficacia terapeutica. Abbiamo dimostrato che le cellule dendritiche tollerogeniche ingegnerizzate con IL-10 (DCAg/IL-10) modulano efficacemente le risposte di cellule T e B antigene(Ag)-specifiche. Qui proponiamo l'uso di DCAg/IL-10 come immunoterapia adiuvante specifica per l'enzima nei pz di LSD sottoposti ad ERT. Per caratterizzare lo stato immunologico dei pz trattati con ERT (Mucopolisaccaridosi (MPS)-I, MPSIVA, malattia di Pompe, α-mannosidosi), abbiamo studiato la loro RI all'enzima terapeutico e testato l'effetto di DCAg/IL-10 sulla risposta adattativa all'ERT in un modello murino di LSD. All'inizio dell'ERT, anticorpi antifarmaco (ADA) sono stati rilevati ad alti livelli nel siero di molti pazienti. Con il progredire del trattamento gli ADA tendono a passare dalla sottoclasse IgG1 alla IgG4, interferendo con l'internalizzazione dell'enzima in vitro. Inoltre, nel plasma dei pz i livelli di citochine/chemochine infiammatorie sono aumentati rispetto ai controlli sani. Nonostante l'ambiente alterato, i monociti dei pz sono capaci di differenziare in DC tollerogeniche produttrici di IL-10. Nei topi MPSI (L-iduronidasi; IDUA-/-) trattati con ERT, gli anticorpi anti-IDUA vengono indotti in maniera CD4-dipendente

e la risposta T CD4 IDUA-specifica è rilevata all'inizio dell'ERT. Ripetute iniezioni di DCIDUA/IL-10 riducono i livelli di anticorpi anti-IDUA. Questi risultati suggeriscono che, nei pz trattati con ERT, l'ambiente pro-infiammatorio sostiene l'attivazione aberrante del sistema immunitario, contribuendo indirettamente alla RI adattativa specifica per l'ERT ma senza compromettere il potenziale tollerogenico delle DC. I dati in vivo indicano che la terapia con DCAg/IL-10 può limitare la RI indotta da ERT, favorendone potenzialmente l'efficacia.

35

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome)

TARGETING THE MITOCHONDRIAL ENZYME MONOAMINE OXIDASE B TO TREAT MUCOPOLYSACCHARIDOSES: A DRUG REPURPOSING STRATEGY

F. Venegas[1], M. Canton[1], R. Tomanin[1], L. Rigon[1], A. Salimovaa[1] C. De Filippis[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GMR23T2178; Canton Marcella

Mucopolysaccharidoses (MPSs) are a group of rare and severe inherited diseases, due to the deficit of lysosomal enzymes degrading mucopolysaccharides (also named glycosaminoglicans, GAG). GAG accumulation drives a severe inflammatory systemic disease, although the mechanisms have been only partially elucidated. Inflammation is considered the main cause of neuropathogenesis and osteoarticular disease in MPSs. Enzyme replacement therapy (ERT) has been developed for some types of MPSs, but the treatment is poorly effective in crucial body districts, such as the cardiac and the osteo-articular ones, and totally ineffective in the central nervous system. In this context, we uncovered a novel, non-redundant inflammatory pathway mediated by Monoamine oxidase B (MAOB), a mitochondrial enzyme that forms hydrogen peroxide as a product of the oxidation of dietary amines and neurotransmitters. During an inflammatory process, the excess of hydrogen peroxide generated by MAOB is required to trigger NF-κB, a transcription factor essential to start and sustain the expression of proinflammatory and profibrotic genes. As the mitochondria-lysosome crosstalk is essential to maintain cellular homeostasis, we hypothesize that MAOB could be relevant in driving mitochondrial/lysosomal dysfunction and inflammation in MPSs. Based on our findings, MAOB can represent a novel target to dampen inflammation and improve patients' life. Our project proposes a low-cost strategy, named 'drug repurposing', that is particularly interesting for rare diseases for which investments are often limited. On the basis of our promising preliminary data and scientific background, we plan to assess the efficacy of a MAOB inhibitor, clinically approved for years to treat Parkinson's disease, in two mouse models of MPS, with particular attention to brain and heart. We will address this issue by different approaches, including histological, biochemical, metabolomic and functional measurements.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Sindrome di Hunter; Mucopolisaccaridosi, tipo 2; Mucopolisaccaridosi, tipo II; MPS2; MPSII;

Sindrome di Sanfillipo; Mucopolisaccaridosi, tipo 3; Mucopolisaccaridosi tipo III; MPS3; MPSIII;

LA MONOAMINO OSSIDASI B COME NUOVO BERSAGLIO PER TRATTARE LE MUCOPOLISACCARIDOSI: UNA STRATEGIA DI RIPOSIZIONAMENTO DEI FARMACI

Le mucopolisaccaridosi (MPS) sono un gruppo di malattie rare, dovute al deficit di enzimi lisosomiali che degradano i mucopolisaccaridi (detti anche glicosamminoglicani, GAG). L'accumulo di GAG determina una grave malattia infiammatoria sistemica, i cui meccanismi sono stati solo parzialmente chiariti. L'infiammazione è considerata la causa principale della neuropatogenesi e della malattia osteoarticolare nelle MPS. La terapia enzimatica sostitutiva (ERT) è stata sviluppata per alcuni tipi di MPS, ma il trattamento è scarsamente efficace a livello cardiaco e osteo-articolare, e totalmente inattivo nel sistema nervoso centrale. In questo contesto, abbiamo scoperto una nuova via metabolica proinfiammatoria mediata dalla monoamino ossidasi B (MAOB), un enzima mitocondriale che forma acqua ossigenata come prodotto dell'ossidazione di ammine e neurotrasmettitori. In condizioni infiammatorie, l'eccesso di acqua ossigenata dovuto all'aumentata espressione di MAOB attiva NF-κB, un fattore di trascrizione essenziale per avviare e mantenere l'espressione di geni proinfiammatori e profibrotici. Poiché il crosstalk tra mitocondri e lisosomi è essenziale per mantenere l'omeostasi cellulare, ipotizziamo che MAOB possa essere rilevante nel determinare la disfunzione mitocondriale/lisosomiale e l'infiammazione nelle MPS. In base alle nostre scoperte, MAOB può rappresentare un nuovo bersaglio per attenuare l'infiammazione e migliorare la vita dei pazienti. Il nostro progetto propone una strategia a basso costo, detta "drug repurposing", che è particolarmente interessante per le malattie rare per le quali gli investimenti sono spesso limitati. Sulla base dei nostri dati preliminari e del background scientifico, intendiamo valutare l'efficacia di un inibitore MAOB, clinicamente approvato da anni per il trattamento del morbo di Parkinson, in due modelli murini di MPS, con particolare attenzione per il cervello ed il cuore.

36

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome)

Mucopolysaccharidosis I H (Hurler disease)

Exploring the link between amyloid deposition, autophagy dysfunction and neuro-inflammation in neuronopathic mucopolysaccharidoses

L. Borzacchiello[1], A. Parente[1], Fraldi Alessandro[1], A. Monaco[1], M. Giaccio[1], M. Bamundo[1], R. Rubino[1], A. Fraldi[1]

[1]Naples, Ceinge Biotecnologie Avanzate

Project: GMR22T1082; Fraldi Alessandro

A hallmark of several neurodegenerative conditions is the brain deposition of amyloidogenic proteins, including α-syn, tau, and Aβ protein, which causes cytotoxicity by interfering with various cellular functions. We have shown that brain deposition of multiple amyloid proteins is a key contributor to neurodegenerative processes in neuronopathic mucopolysaccharidoses (MPS), a group of neurometabolic inherited conditions belonging to lysosomal

storage disorders and characterized by dysfunction of autophagy-lysosomal pathway (ALP). It is known that amyloids can be degraded by ALP. In previous works, we have shown that amyloid aggregation itself may affect ALP, thus triggering a vicious cycle, which boost neurodegenerative cascades. Here, using brain samples and neuronal cultures from MPS mouse models we demonstrate that amyloids accumulate in the proximity of lysosomes, causing massive lysosomal enlargement and perikaryal clustering. Cell-free data show that such effect is mediated by the direct binding of α-syn to the lysosomal membrane that induce the assembly and fusion of lysosomes in large structures. This, in turns, reduces lysosomal dynamics, thus impairing lysosomal capability to encounter and clear autophagosomes to complete autophagy. We also have shown that amyloid deposition in MPS is involved in the initiation of inflammatory cascades by triggering microglia and astroglia activation. Specifically, our data indicate a strong induction of A1 reactive astrocytes, a neurotoxic phenotype, which involve the loosing of normal homeostatic functions and the secretion of neurotoxic factors. Our results uncover mechanistic insights linking amyloid aggregation to both ALP-mediated brain homeostasis and neuroinflammation in neuronopathic MPS. Targeting these mechanisms may be instrumental for developing innovative therapeutic strategies to treat neuronopathy in MPS

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Sindrome di Sanfillipo; Mucopolisaccaridosi, tipo 3; Mucopolisaccaridosi tipo III; MPS3; MPSIII;

Sindrome di Hurler; Malattia di Hurler; Mucopolisaccaridosi, tipo 1H; Mucopolisaccaridosi, tipo IH; MPS1H; MPSIH;

STUDIO DEL LEGAME TRA DEPOSIZIONE DI PROTEINE AMILOIDI, DISFUNZIONE DELL'AUTOFAGIA E NEUROINFIAMMAZIONE NELLE MUCOPOLISACCARIDOSI NEURODEGENERATIVE

In lavori precedenti, abbiamo dimostrato che la deposizione di proteine amiloidi tra cui α-synuclein, tau e Aβ nel cervello contribuisce in modo chiave ai processi neurodegenerativi nelle mucopolisaccaridosi (MPS), un gruppo di condizioni neurometaboliche ereditarie appartenenti alla famiglia delle malattie da accumulo lisosomiale e caratterizzate da disfunzione della via autofagia-lisosomiale (ALP). È noto che le proteine amiloidi possono essere degradate dall'ALP. Noi abbiamo dimostrato che la stessa aggregazione amiloide può compromettere l'ALP, innescando così un circolo vizioso che induce le cascate neurodegenerative. Nello studio che presentiamo qui, utilizzando campioni di cervello e colture neuronali provenienti da modelli murini MPS, dimostriamo che le proteine amiloidi si accumulano in prossimità dei lisosomi, causando un massiccio aumento del loro volume associato ad un "clustering" nel soma dei neuroni. Dati in sistemi "cell-free" mostrano che tale effetto è mediato dal legame diretto dell'α-synuclein con la membrana lisosomiale che induce la fusione e l'assemblaggio dei lisosomi in strutture di grandi dimensioni. Ciò, a sua volta, riduce la dinamica lisosomiale, compromettendo così la loro capacità eliminare gli autofagosomi durante il processo autofagico. Abbiamo inoltre dimostrato che la deposizione delle proteine amiloidi nelle MPS è coinvolta nell'induzione di cascate infiammatorie mediante l'attivazione di microglia e astroglia. Nello specifico, i nostri dati indicano una forte induzione degli astrociti reattivi A1, un fenotipo neurotossico, che comporta la perdita delle normali funzioni omeostatiche e la secrezione di fattori neurotossici. I nostri risultati fanno luce sui meccanismi che collegano l'aggregazione amiloide all'omeostasi cerebrale mediata da ALP e alla neuroinfiammazione nelle MPS. Capire questi meccanismi può essere determinante per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative per il trattamento della neuropatologia nelle MPS.

37

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome)

ROLE OF HEPARAN SULFATE ACTIVE RESIDUES IN DRIVING TAUOPATHY IN SANFILIPPO SYNDROME

Alberti Francesca[1], B. Mongiardi[2], M. Monaco[1], C. Somma[2], V. De Luca[3], M. De Risi[3], MB Huynh[4], D. Papy-Garcia, E. De Leonibus[1], P. Marotta[1]

[1]Naples, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)
[2]Naples, Università Degli Studi Della Campania Luigi Vanvitelli
[3]Naples, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[4]Paris, Cell Growth, Tissue Repair and Regeneration (CRRET), UPEC EA 4397/ERL CNRS 9215, Université Paris Est Créteil, Université Paris Est, Créteil, France.

Project: GSA23E003; De Leonibus Elvira

Mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-IIIA), also called Sanfilippo syndrome, is a rare lysosomal storage disease (LSDs) caused by the loss of function of the gene coding for a lysosomal enzyme, N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (SGSH) involved in the physiological catabolism of heparan sulfates (HS). In MPS-IIIA, undegraded HS accumulate in the lysosome, progressively engulfing it and damaging its degradative capacity, which is thought to be responsible for the accumulation of secondary storages composed of misfolded proteins such as alpha-synuclein, beta-amyloid (Ab) and tau, leading to neurodegeneration. However, previous studies in Alzheimer' disease reported that specific neuronal forms of HS, such as 3S-HS, which is sulfated in the 3-O-position, can favor the aggregation of tau. Based on this set of evidence, we tested the novel hypothesis that accumulation of intracellular 3S-HS in MPS-IIIA might contribute to proteinopathy, preceding lysosomal dysfunction. We have identified intracellular accumulation of 3S-HS in MPS-IIIA cells, correlating with accumulation of Tau and Ab. Culturing MPS-IIIA cells with the G2 peptide, which specifically interferes with 3S-HS, we were able to rescue tau accumulation. This preliminary evidence in vitro supports a causative role of heparan sulfate active residues in proteinopathy in MPS-IIIA, which, if confirmed in vivo, pave the way for novel therapeutic approaches for Sanfilippo syndrome.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Sindrome di Sanfillipo; Mucopolisaccaridosi, tipo 3; Mucopolisaccaridosi tipo III; MPS3; MPSIII;

RUOLO DEI RESIDUI ATTIVI DI EPARAN SOLFATO NELLA TAUPATIA ALLA GUIDA NELLA SINDROME DI SANFILIPPO

La mucopolisaccaridosi di tipo IIIA (MPS-IIIA), chiamata anche sindrome di Sanfilippo, è una rara malattia da accumulo lisosomiale (LSD) causata dalla perdita di funzione del gene che codifica per un enzima lisosomiale, la N-sulfoglucosamina solfoidrolasi (SGSH), coinvolto nel catabolismo fisiologico degli eparan solfati (HS). Nella MPS-IIIA, l'HS non degradato si accumula nel lisosoma, inghiottendolo progressivamente e danneggiandone la capacità degradativa, che si ritiene sia responsabile dell'accumulo di depositi secondari composti da proteine mal ripiegate come l'alfa-sinucleina, la beta-amiloide (Ab) e la tau, che portano alla neurodegenerazione. Tuttavia, studi precedenti sulla malattia di Alzheimer hanno riportato che specifiche forme neuronali di HS, come 3S-HS, che è solfatata in posizione 3-O, possono favorire l'aggregazione di tau. Sulla base di questo insieme di prove, abbiamo testato la nuova ipotesi secondo cui l'accumulo di 3S-HS intracellulare in MPS-IIIA

potrebbe contribuire alla proteinopatia, precedendo la disfunzione lisosomiale. Abbiamo identificato l'accumulo intracellulare di 3S-HS nelle cellule MPS-IIIA, correlato all'accumulo di Tau e Ab. Coltivando cellule MPS-IIIA con il peptide G2, che interferisce specificamente con 3S-HS, siamo stati in grado di salvare l'accumulo di tau. Questa evidenza preliminare in vitro supporta un ruolo causale dei residui attivi di eparan solfato nella proteinopatia nella MPS-IIIA, che, se confermati in vivo, aprirebbero la strada a nuovi approcci terapeutici per la sindrome di Sanfilippo.

38

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome)

PHARMACOLOGICAL STIMULATION OF AUTOPHAGY TO RESCUE PROTEINOPATHY AND COGNITIVE DECLINE IN LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS

Somma Cristina[1], M. Monaco[1], A. Capuozzo[1], D.L. Medina[1], M. De Risi[1], E. De Leonibus[1]

[1] Pozzuoli, Naples, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: GSA23H001; De Leonibus Elvira

Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of rare inherited metabolic disorders caused by defects in lysosomal function. Among these, Mucopolysaccharidoses (MPS) are characterized by the loss of function of lysosomal enzymes responsible for the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). This defect leads to the production, at the cellular level, of secondary storages comprised of undegraded proteins. In some of these syndromes, this translates into a neurodegenerative phenotype with pediatric dementia. Promoting the degradation of secondary storages is one of the most promising therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. Genetic overexpression of the transcription factor EB (TFEB), which controls 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 of stimulating TFEB and crossing the blood-brain barrier. In the current study, using validated animal and cellular models of MPS, we are testing a compound that has been shown to promote TFEB-mediated autophagy and lysosomal biogenesis in wild-type/control animals. Our in vitro analysis demonstrated that the drug is effective in patients' cell lines of various types of MPS, shedding light on the mechanism by which it activates autophagic flux in the context of disease. Analyses conducted in a validated animal model of MPS-IIIA have shown that the drug improves the cognitive deficits and favours the clearance of secondary storages composed of beta-amyloid. These results provide proof-of-concept evidence on a novel therapeutic compound for the treatment of LSDs.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Sindrome di Sanfillipo; Mucopolisaccaridosi, tipo 3; Mucopolisaccaridosi tipo III; MPS3; MPSIII;

STIMOLAZIONE FARMACOLOGICA DELL'AUTOFAGIA PER IL RECUPERO DELLA PROTEINOPATIA E DEL DECLINO COGNITIVO NELLE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

I disturbi da accumulo lisosomiale (LSD) sono un gruppo di rare malattie metaboliche ereditarie causate da difetti nella funzione lisosomiale. Tra questi, le mucopolisaccaridosi (MPS) sono caratterizzate dalla perdita di funzione degli enzimi lisosomiali responsabili della degradazione dei glicosaminoglicani (GAG). Questo difetto porta, a livello cellulare, alla formazione di accumuli secondari costituiti da proteine non degradate. In alcune di queste sindromi, ciò si traduce in un fenotipo neurodegenerativo con demenza pediatrica. Promuovere la degradazione degli accumuli secondari rappresenta una delle strategie terapeutiche più promettenti per prevenire la neurodegenerazione. La overespressione genetica del fattore di trascrizione EB (TFEB), che controlla i geni coinvolti nel processo di degradazione autofagica/lisosomiale, sembra favorire la degradazione degli aggregati proteici in modelli animali di neurodegenerazione. Tuttavia, esistono ancora pochi farmaci sintetici in grado di stimolare TFEB e attraversare la barriera emato-encefalica. Nel presente studio, utilizzando modelli animali e cellulari validati di MPS, stiamo testando un composto che ha dimostrato di promuovere l'autofagia mediata da TFEB e la biogenesi lisosomiale in animali wild-type/di controllo. Le nostre analisi in vitro hanno dimostrato che il farmaco è efficace nelle linee cellulari di pazienti affetti da diverse forme di MPS, facendo luce sul meccanismo con cui attiva il flusso autofagico nel contesto della malattia. Le analisi condotte in un modello animale validato di MPS-IIIA hanno mostrato che il farmaco migliora i deficit cognitivi e favorisce la rimozione degli accumuli secondari composti da beta-amiloide. Questi risultati forniscono un'evidenza per l'utilizzo di un farmaco innovativo per il trattamento delle malattie da accumulo lisosomiale.

39

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL)

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome)

COMBINING PHENOTYPIC HIGH-CONTENT IMAGING WITH THE REPURPOSING OF DRUGS TO TACKLE LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS.

Montefusco Sandro[1], A. Capuozzo[1], C. La Vecchia[1], D. Medina[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22CBDM04; Medina Diego

Lysosomes are ubiquitous intracellular organelles that receive and degrade macromolecules from the secretory, endocytic, autophagic, and phagocytic membrane-trafficking pathways. Lysosomal dysfunction causes lysosomal storage disorders (LSDs) and contributes to common neurodegenerative diseases such as Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD), and Huntington's (HD). The progressive accumulation of undigested macromolecules within the cell in these diseases results in cellular dysfunction and clinical manifestations with variable associations of visceral, skeletal, hematologic, and severe neurological involvement. While replacing the functional gene remains the cure option for LSDs, the increasing knowledge of the intracellular pathways involved in the pathogenesis of these diseases represents an alternative to treating these diseases by pharmacological approaches. High-content screening (HCS) is a sophisticated method for drug discovery that combines all the molecular tools of modern cell biology with automated high-resolution microscopy, robotic handling, and image analysis. This technology can generate

multiparametric cell-based assays to identify disease-relevant cellular phenotypes and survey small molecule correctors. Here, we present a platform that combines gene-edited cellular models of LSDs, HCS, and the repurposing of drugs to intelligently identify novel therapies to treat Batten disease and mucopolysaccharidosis type IIIA, respectively.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Ceroidolipofuscinosi neuronale; NCL

Sindrome di Sanfillipo; Mucopolisaccaridosi, tipo 3; Mucopolisaccaridosi tipo III; MPS3; MPSIII

COMBINARE L'IMAGING FENOTIPICO CON IL RIPOSIZIONAMENTO DEI FARMACI PER STUDIARE LE MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE

I lisosomi sono organelli intracellulari ubiquitari che ricevono e degradano macromolecole provenienti dalle vie di traffico di membrana secretoria, endocitica, autofagica e fagocitica. La disfunzione lisosomiale causa malattie da accumulo lisosomiale (LSD) e contribuisce a comuni malattie neurodegenerative come l'Alzheimer (AD), il Parkinson (PD) e la Corea di Huntington (HD). L'accumulo progressivo di macromolecole non digerite all'interno della cellula in queste malattie porta a disfunzioni cellulari e a manifestazioni cliniche con associazioni variabili di coinvolgimento viscerale, scheletrico, ematologico e neurologico grave.

Sebbene la sostituzione del gene funzionale rimanga l'opzione di cura per le LSD, la crescente conoscenza delle vie intracellulari coinvolte nella patogenesi di queste malattie rappresenta un'alternativa per trattarle tramite approcci farmacologici.

Lo screening ad alto contenuto (HCS) è un metodo sofisticato per la scoperta di farmaci che combina tutti gli strumenti molecolari della moderna biologia cellulare con microscopi automatizzati ad alta risoluzione, manipolazione robotica e analisi delle immagini. Questa tecnologia può generare saggi cellulari multiparametrici per identificare fenotipi cellulari rilevanti per la malattia e individuare correttori a piccole molecole.

Qui presentiamo una piattaforma che combina modelli cellulari di LSD modificati geneticamente, HCS e il riposizionamento di farmaci per identificare in modo intelligente nuove terapie per trattare rispettivamente la malattia di Batten e la mucopolisaccaridosi di tipo IIIA.

40

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Globoid cell disease (Krabbe disease)

Lysosomal storage disease

EXPLOITING ADVANCED HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL (HIPSC)-BASED 3D MODELS TO STUDY GLOBOID CELL LEUKODYSTROPHY.

Mangiameli Elisabeth[1],
C. Rosato[1], **F. Cupaioli**[2], **R. Alfieri**[2], **I. Merelli**[1], **A. Gritti**[1]

[1]*Milan, Italy, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget); IRCCS San Raffaele Scientific Institute*
[2]*Segrate (MI), Italy, National Research Council (CNR), Institute for Biomedical Technologies*

Project: TGT22C10; Gritti Angela

Globoid cell leukodystrophy (GLD) is caused by ß-galactosylceramidase (GALC) deficiency, which is crucial for sphingolipid metabolism. This deficiency results in toxic substrate accumulation, driving demyelination, neurodegeneration, and neuroinflammation in the central and peripheral nervous systems. While glial dysfunction was traditionally seen as the leading cause of GLD, new evidence suggests neurons may play a more significant role in white matter damage. In prior studies, we used patient-specific human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) to model GLD and explore gene therapy strategies. Through hiPSC-derived neural stem/progenitor cells (NPCs) and 2D neuronal/glial cultures, we identified mutation-dependent neuronal and oligodendroglial differentiation defects, revealing early, unrecognized pathogenic events. However, these 2D conditions limited the maturation of neurons and oligodendrocytes (OLs). To address this, we developed 3D spheroids from hiPSCs of healthy donors (HD), GLD patients, and isogenic GALC knock-out (KO) and knock-in (KI) lines generated via CRISPR-Cas9. Over a detailed time course (50, 100, and 150 days), we demonstrated that (i) 3D spheroids were efficiently generated from all hiPSC lines; (ii) HD and GLD organoids contained immature (OLIG2+) and mature (MBP+) OLs, MAP2+ neurons, and GFAP+ astrocytes; (iii) GLD spheroids exhibited pathological hallmarks absent in 2D cultures. Using single-cell RNA sequencing at 100 and 150 days, we identified distinct neuronal and glial subtypes, disease-specific gene expression alterations, and cellular composition changes linked to GLD. This integration of transcriptomics with phenotypic analysis revealed molecular mechanisms driving disease progression. Our 3D platform captures key GLD pathology, uncovering molecular signatures, temporal gene expression dynamics, and critical disease pathways, providing a foundation for studying GLD and other neurodegenerative leukodystrophies.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Krabbe; Leucodistrofia a cellule globoidi; Deficit di GALC; Deficit di galattocerebrosidasi; Deficit di galattosilceramidasi;

Malattie da accumulo lisosomiale;

Sviluppo di modelli 3D avanzati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) per lo studio della Leucodistrofia a Cellule Globoidi.

La leucodistrofia a cellule globoidi (GLD) è causata da mutazioni nel gene GALC, essenziale per il metabolismo degli sfingolipidi. La carenza di GALC porta all'accumulo tossico di substrati nel sistema nervoso centrale e periferico, causando demielinizzazione, neurodegenerazione e neuroinfiammazione. Sebbene il danno gliale sia stato tradizionalmente considerato la principale manifestazione della GLD, nuove evidenze suggeriscono un ruolo chiave dei neuroni durante la patologia. Nei nostri studi precedenti abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) derivate da pazienti per stabilire nuovi modelli sperimentali di GLD e per esplorare terapie geniche. Studiando progenitori neurali (NPC) e colture 2D neuronali/gliali, abbiamo identificato difetti di differenziamento neuronale e oligodendrogliale, rivelando eventi patogenetici precoci. Tuttavia, i modelli 2D non supportano la maturazione completa di neuroni e oligodendrociti (OL), le cellule più colpite nella patologia. Per superare questo limite, abbiamo sviluppato sferoidi 3D da hiPSC di donatori sani, pazienti GLD e linee isogeniche GALC knock-out (KO) e knock-in (KI) generate con CRISPR-Cas9. Con un'analisi temporale (50, 100 e 150 giorni), abbiamo dimostrato

che: (i) gli sferoidi 3D si generano efficacemente da tutte le linee hiPSC; (ii) gli organoidi contengono oligodendrociti immaturi/maturi, neuroni e astrociti; (iii) gli sferoidi GLD mostrano caratteristiche patologiche assenti nei modelli 2D. Il sequenziamento dell'RNA a singola cellula (100-150 giorni) ha rivelato che gli sferoidi contengono molte popolazioni neuronali e gliali distinte e ha messo in luce alterazioni caratteristiche della malattia, L'integrazione con l'analisi fenotipica potrà chiarire i meccanismi molecolari della progressione della GLD. La nostra piattaforma 3D riproduce fedelmente la patologia e rappresenta uno strumento innovativo per lo studio della GLD e di altre malattie neurodegenerative."

41

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

CLN13 / Type B Kufs

Lysosomal storage disease

Modelling ultra rare diseases in Drosophila melanogaster: Towards genetic avatars of patients for functional study of Type B Kufs disease pathogenesis

G. Vitale[1], T. Vaccari[1], G. Del Malvo, F. Rattazzi

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GMR23T1152; Vaccari Thomas

Lysosomal storage disorders (LSD) are a large and heterogeneous group of neurodegenerative disease associated with a broad variety of mutations in different lysosomal genes. The most common type of LSD are lipidoses, in particular the neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL). Among NCL CLN13/Type Kufs disease is an ultra-rare adult-onset neurodegenerative condition characterized by cognitive decline, dementia, psychiatric problems, motor disfunction, unvoluntary movements such as tremors and tics that lead to premature death. Cathepsin F (CTSF), the gene encoding for the lysosomal protease CTSF, was identified as the causative gene of Type K disease. Because CTSF is a lysosomal enzyme essential for correct catabolism, one of main cellular hallmark of the pathology is the accumulation of autofluorescent lipopigments in cells of the nervous system. To date, 21 CtsF variants have been associated with CLN13 leading to variable symptoms in affected patients. By editing of the Drosophila melanogaster genome to delete CtsF, we have generated an in vivo model of Type B Kufs disease. Drosophila CtsF loss of function animals display the main pathological traits of patients, such as lysosomal and autophagy alterations and neuromotor deficit. The latter defect is rescued by reintroduction of the wild-type Drosophila CtsF. To generate fly avatars of Type Kufs disease, we recently constructed transgenic flies to inducibly express CtsF variants with conserved mutations that have been found in six patients. We will soon attempt to use these variants in comparison to wild-type CtsF. These functional studies will elucidate disease pathogenesis paving the way to identify future markers and targets for diagnosis and therapeutical approaches.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Ceroido Lipofuscinosi Neuronale, 13, tipo Kufs; CLN13;

Malattie da accumulo lisosomiale;

MODELLIZZAZIONE DELLE MALATTIE ULTRA RARE IN DROSOPHILA MELANOGASTER: VERSO AVATAR GENETICI DEI PAZIENTI PER LO STUDIO FUNZIONALE DELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA DI KUFS DI TIPO B

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSD) rappresentano un ampio e eterogeneo gruppo di patologie neurodegenerative associate a una grande varietà di mutazioni in diversi geni lisosomiali. Il tipo più comune di LSD sono le lipidosi, in particolare la ceroidolipofuscinosi neuronale (NCL). Tra le NCL, la malattia di Kufs di tipo CLN13 è una condizione neurodegenerativa a insorgenza adulta estremamente rara, caratterizzata da declino cognitivo, demenza, problemi psichiatrici, disfunzioni motorie e movimenti involontari, come tremori e tic, che portano a morte prematura. Il gene *Cathepsin F* (CTSF), che codifica per la proteasi lisosomiale CTSF, è stato identificato come il gene causativo della malattia di Kufs di Tipo B. Poiché CTSF è un enzima lisosomiale essenziale per il corretto catabolismo, uno dei principali segni cellulari della patologia è l'accumulo di lipopigmenti autofluorescenti nelle cellule del sistema nervoso. Ad oggi, sono state associate a CLN13 ventuno varianti di *CtsF*, le quali determinano sintomi variabili nei pazienti affetti.

Modificando il genoma di *Drosophila melanogaster* per eliminare *CtsF*, abbiamo generato un modello in vivo della malattia di Kufs di Tipo B. Gli animali privi della funzione di *CtsF* in *Drosophila* mostrano le principali caratteristiche patologiche riscontrate nei pazienti, come alterazioni lisosomiali e dell'autofagia, oltre a deficit neuromotori. Quest'ultimo difetto viene ripristinato dalla reintroduzione del gene *CtsF* wild-type di *Drosophila*. Per creare avatar genetici della malattia di Kufs, abbiamo recentemente costruito moscerini transgenici in grado di esprimere in modo inducibile varianti di *CtsF* con mutazioni conservate, identificate in sei pazienti. A breve confronteremo queste varianti con il *CtsF* wild-type. Questi studi funzionali permetteranno di chiarire la patogenesi della malattia, aprendo la strada all'identificazione di nuovi marcatori e bersagli per la diagnosi e per approcci terapeutici.

42

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

CLN5

INSIGHTS INTO THE ROLE OF LYSOSOMAL PROTEIN CLN5 IN NEURODEGENERATION USING ZEBRAFISH AS A TOOL

S. Bernardi[1], Marchese Maria[1], R. Vivarelli[1], S. Doccini[1], L. Santucci[1], A. Ogi[1], R. Licitra[2], S. Mero[1], S.C.F. Neuhauss[3], J. Zang[3] R. Soliymani[4], G. Signore[2], M.M. Lalowski[5], F.M. Santorelli[1], M. Marchese[1]

[1]Pisa, Fondazione IRCCS Stella Maris
[2]Pisa, Università Di Pisa
[3]Zurigo, University of Zurich
[4]Helsinki, University of Helsinky
[5]Poznań, Adam Mickiewicz University

Project: GGP20011; Marchese Maria

CLN5 disease, a form of juvenile dementia within the neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL), is associated with mutations in the CLN5 gene encoding the lysosomal bis(monoacylglycero)phosphate (BMP) synthase, essential for BMP production and lysosomal function. Limited knowledge of cellular mechanisms and unclear drug targets hinder translating this to children's treatment, which

remains symptomatic. We developed and characterized a new cln5 knock-out zebrafish model that replicates key features and molecular signatures of the human disease. Loss of Cln5 function in vivo altered axonal growth of retinal ON-bipolar cells and disrupted calcium homeostasis in the cerebellum, revealing new disease features. Additionally, multi-omic analyses at different developmental stages revealed an impaired glucose metabolism as an original finding in NCL. A novel biomarker, PHGDH, was validated in zebrafish and human skin fibroblasts harboring pathogenic variants in CLN5, and in CLN7. We also tested metformin which improved the expression of PHGDH in patient-derived cells, and rescued zebrafish behavior. Preliminary optogenetics data indicates potential circuit-specific alterations in Purkinje cells, providing insight into cerebellar dysfunction in NCL disease. This work demonstrates the profound metabolic impact of CLN5 dysfunction, offering a promising avenue toward targeted therapies for neuronal ceroid lipofuscinosis.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Ceroido Lipofuscinosi Neuronale, 5; CLN5;

ANALISI DEL RUOLO DELLA PROTEINA LISOSOMIALE CLN5 NELLA NEURODEGENERAZIONE UTILIZZANDO IL ZEBRAFISH COME STRUMENTO

La malattia CLN5, una forma di demenza giovanile all'interno delle ceroidolipofuscinosi neuronali (NCL), è associata a mutazioni nel gene CLN5, che codifica per la bis(monoacilglicero)fosfato (BMP) sintetasi lisosomiale, fondamentale per la produzione di BMP e per la funzione lisosomiale. La conoscenza limitata dei meccanismi cellulari e l'incertezza sui target terapeutici ostacolano lo sviluppo di trattamenti per i bambini, i quali rimangono puramente sintomatici. Abbiamo sviluppato e caratterizzato un nuovo modello in zebrafish con perdita di funzione di cln5 che riproduce le caratteristiche chiave e le principali vie molecolari della malattia umana. La perdita della funzione di Cln5 in vivo ha alterato la crescita assonale delle cellule bipolari ON della retina e compromesso l'omeostasi del calcio nel cervelletto, rivelando nuove caratteristiche della malattia. Inoltre, analisi multi-omiche in diverse fasi dello sviluppo hanno evidenziato un metabolismo del glucosio alterato come scoperta originale nelle NCL. Un nuovo biomarcatore, PHGDH, è stato validato nello zebrafish e nei fibroblasti cutanei umani con varianti patogeniche in CLN5 e CLN7. Abbiamo anche testato la metformina, che ha migliorato l'espressione di PHGDH in cellule derivate da pazienti e ha recuperato i comportamenti anomali nel modello in zebrafish. Dati preliminari di optogenetica indicano potenziali alterazioni specifiche nei circuiti delle cellule di Purkinje, fornendo informazioni sulla disfunzione cerebellare nella malattia NCL. Questo lavoro dimostra l'impatto metabolico profondo della disfunzione di CLN5, offrendo una promettente strada verso terapie mirate per le ceroidolipofuscinosi neuronali.

43

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

CLN8

REPURPOSING OF ANTIDIABETIC AGENTS AND IDENTIFICATION OF DISEASE BIOMARKERS BY LIPIDOMICS ANALYSIS IN A NOVEL ZEBRAFISH MODEL OF CLN8

L. Santucci[1], S. Bernardi[1], R. Vivarelli[1], T. Baldwin[2], I. Doykov[2], S. Guttman[2], W. E. Heywood[2], F.M. Santorelli[1], M. Marchese[1]

[1]Pisa, Fondazione IRCCS Stella Maris
[2]London, University College London

Project: GSA23C003; Marchese Maria

Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are a group of rare genetic neurodegenerative diseases comprising 13 subtypes, all caused by mutations in the CLN genes. CLN8 disease is a late-infantile form of NCL linked to mutations in the CLN8 gene, with current treatment options limited to palliative care. This study explores the potential of antidiabetic drugs to slow disease progression in a cln8 zebrafish knockout model and identifies lipid biomarkers for tracking the disease. We tested 10 antidiabetic drugs in cln8 mutant zebrafish, among them a greater effect has been showed by metformin and albiglutide, which modulate glucose metabolism, autophagy, and lipid pathways. These treatments reduced hyperexcitability, rescued locomotor defects of larvae, increased pro-autophagic protein expression, and lowered pro-inflammatory gene expression, suggesting beneficial therapeutic effects in cln8 mutants. Additionally, lipidomic analysis of cln8 zebrafish brains revealed significant alterations in lysophosphoethanolamines, with opposite trends between juvenile and adult fish. In adults, ceramide and sulfatide pathways, commonly implicated in other neurodegenerative disorders, exhibited marked differences in cln8 mutants compared to wild-type siblings. Our findings suggest that repurposing antidiabetic drugs could offer a novel therapeutic strategy for NCL and potentially other neurodegenerative disorders. Furthermore, we identified lipid biomarkers that may serve as valuable tools for monitoring disease progression and treatment response.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Ceroido Lipofuscinosi Neuronale, 8; CLN8;

RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI ANTIDIABETICI E IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI DELLA MALATTIA TRAMITE ANALISI LIPIDOMICA IN UN NUOVO MODELLO DI ZEBRAFISH DI CLN8

Le ceroidolipofuscinosi neuronali (NCLs) sono un gruppo di rare malattie neurodegenerative genetiche, comprendenti 13 sottotipi, tutte causate da mutazioni nei geni CLN. La malattia CLN8 è una forma a esordio infantile tardivo di NCL associata a mutazioni nel gene CLN8, per la quale le opzioni terapeutiche attuali sono limitate alle cure palliative. Questo studio esplora il potenziale dei farmaci antidiabetici nel rallentare la progressione della malattia in un modello di zebrafish di cln8 e identifica biomarcatori lipidici per il monitoraggio della patologia. Sono stati testati 10 farmaci antidiabetici nei pesci mutanti cln8, tra questi hanno avuto un migliore effetto la metformina e l'albiglutide, noti per modulare il metabolismo del glucosio, l'autofagia e le vie lipidiche. Questi trattamenti hanno ridotto l'iper-eccitabilità, migliorato la locomozione, aumentato l'espressione di proteine pro-autofagiche e ridotto l'espressione di geni pro-infiammatori, suggerendo effetti terapeutici benefici nei mutanti cln8. Inoltre, l'analisi lipidomica dei cervelli di zebrafish cln8 ha rivelato alterazioni significative nelle lisofosfoetanolamine, con tendenze opposte tra pesci giovani e adulti. Negli adulti, le vie delle ceramidi e solfatidi, comunemente implicate in altre malattie neurodegenerative, hanno mostrato differenze marcate nei mutanti cln8 rispetto ai controlli. I nostri risultati suggeriscono che il riposizionamento di farmaci antidiabetici potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per le NCL e, potenzialmente, per altre malattie neurodegenerative. Inoltre, abbiamo identificato biomarcatori lipidici che potrebbero essere strumenti preziosi per monitorare la progressione della malattia e la risposta ai trattamenti.

44

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Aceruloplasminemia

ROLE OF MYELOPEROXIDASE-MEDIATED NEUROINFLAMMATION IN ACERULOPLASMINEMIA

Carmeno Camilla[1], B. Ferrini[1], A. Conti[1], A. Zanardi[1], S. Belloli[1], P. Rainone[2], R.M. Moresco[2], G. De Palma[3], E. Gilberti[3], I. Nardini[1], C. Scali[1], A. Denardo[1], G. Magherini[1], A. Caricasole[1], M. Alessio[1]

[1]Milano, Università Vita Salute San Raffaele
[2]Milano, Università Di Milano Bicocca
[3]Brescia, Università Degli Studi Di Brescia

Project: GMR22T1053; Alessio Massimo

Aceruloplasminemia (Acp) is characterized by lack of ferroxidase ceruloplasmin (Cp), causing brain iron accumulation and neurodegeneration. Beside its enzymatic role Cp inhibits myeloperoxidase (MPO) a neuroinflammation mediator. We hypothesized that in Acp increased MPO-activity and microglia-mediated neuroinflammation may drive early neuronal damage. The aim is to define neuroinflammation timing and the role of MPO-mediated neuroinflammation in Acp, distinguishing Cp-ferroxidase activity from its MPO-inhibition role in neuroprotection. In cpKO mice we will assess neuroinflammation and neurodegeneration during disease progression, then investigating brain MPO expression/activity in correlation with them. Recombinant Cp (rCp) and Cp-mutants where ferroxidase activity or interaction with MPO is abolished will be used for replacement therapy in cpKO mice to test their therapeutic role. MPO level was lower in cpKO than WT mice at 10 months, while MPO activity was higher in cpKO mice at 6 months, when neuronal symptoms should start. Purkinje cell loss was detected already in 6 months-old mice and confirmed at 10 months, together with iron accumulation in the choroid plexus. 18F-FDG uptake showed higher metabolism in the brain of cpKO mice at 3 months compared to WT, while an opposite trend was shown at 10 months. However IL1ß and IL6 mRNA levels are similar in both genotype along aging. Neuroinflammation will be further studied examining microglial activation and astrocytes dysfunction. rCp was produced, pharmacokinetics studies showed that when administered to mice had lower serum stability than plasma-purified Cp (pCp) but retained its activity. CpKO mice were treated for 4 months but neither rCp nor pCp had effect on the hematological parameters and both proteins elicited an immune response, that might have a neutralizing effect. Mutant lacking ferroxidase activity was produced and validated, while mutant lacking MPO-binding activity was not achieved.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Aceruloplasminemia; Deficit ereditario di ceruloplasmina

RUOLO DELLA NEUROINFIAMMAZIONE MEDIATA DALLA MIELOPEROSSIDASI NELL'ACERULOPLASMINEMIA

L'aceruloplasminemia (Acp) è caratterizzata dalla mancanza della ceruloplasmina (Cp), che causa accumulo di ferro nel cervello e neurodegenerazione. Oltre al suo ruolo enzimatico, Cp inibisce la mieloperossidasi (MPO), un mediatore della neuroinfiammazione. Ipotizziamo che nell'Acp l'aumento dell'attività di MPO e la neuroinfiammazione mediata dalla microglia possano causare danni neuronali precoci. Lo scopo è definire i tempi della neuroinfiammazione e il ruolo di MPO nell'Acp, distinguendo attività ferrossidasica e inibizione dell'MPO. Nei topi cpKO valuteremo la neuroinfiammazione e la neurodegenerazione durante la progressione della malattia, quindi studieremo l'espressione/attività MPO cerebrale in correlazione con esse. La Cp ricombinante (rCp) e i mutanti Cp in cui l'attività ferrossidasica o l'interazione con MPO è abolita saranno utilizzati per la terapia sostitutiva. MPO era più bassa nei topi cpKO rispetto ai topi WT a 10 mesi, mentre l'attività di MPO era più alta nei topi cpKO a 6 mesi, quando dovrebbero iniziare i sintomi neuronali. La perdita di cellule di Purkinje è stata rilevata già a 6 mesi e confermata a 10 mesi, insieme all'accumulo di ferro nei plessi coroidei. L'uptake di 18F-FDG ha mostrato metabolismo più elevato nel cervello di topi cpKO a 3 mesi rispetto ai WT e una tendenza opposta a 10 mesi. Tuttavia i livelli di mRNA di IL1ß e IL6 sono simili in entrambi i genotipi. Verranno anche esaminati attivazione della microglia e disfunzione degli astrociti. Studi di farmacocinetica hanno mostrato che rCp aveva una stabilità nel siero dei topi inferiore rispetto alla Cp plasmatica (pCp) ma manteneva la sua attività. I topi CpKO sono stati trattati per 4 mesi, ma né rCp né pCp hanno avuto effetto sui parametri ematologici ed entrambe hanno suscitato una risposta immunitaria che potrebbe avere effetto neutralizzante. È stato prodotto e convalidato un mutante privo di attività ferrossidasica ma non è stato ottenuto un mutante incapace di legare MPO

45

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Pantothenate kinase-associated neurodegeneration

COASY protein-associated neurodegeneration

EXPLOIT IRON-BURDEN ASTROCYTES AND MOUSE MODELS TO DEFINE THE THERAPY FOR PKAN AND COPAN.

LEVI Sonia[1]

[1]Milano, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GGP20047; Levi Sonia

Iron deposition in the brain is a hallmark of PKAN and CoPAN, two disorders characterized by progressive neurodegeneration. PKAN is caused by mutation in PANK2, encoding the mitochondrial pantothenate kinase 2, which is the first enzyme of the biosynthesis of the Coenzyme A (CoA). The mutation in COASY, that encodes the bifunctional enzyme essential for the final steps of CoA biosynthesis, is the cause of CoPAN. The relationship between CoA dysfunction and iron accumulation was not clear, mainly due to the lack of disease model that recapitulated the phenotype. In the recent years we obtained iPS-derived astrocytes by reprogramming fibroblasts from PKAN and CoPAN patients, showing strong iron accumulation and mimicking the human phenotype. The project was aimed to clarify the pathogenic mechanism of the two disorders, by studies focused on cellular and mitochondria iron metabolism, mitochondria functionality, oxidative stress and endosomal trafficking, in these suitable models of CoA deficiency. We also tested the efficacy of some of the previously identified therapeutic compounds: CoA, 4-PBA and deferiprone, which preliminary studies demonstrated effective in rescuing pathological phenotypes related to defective CoA biosynthesis. Our studies provide evidence of the molecular pathways that trigger iron accumulation and showed that astrocytes are a cellular model that really recapitulate the pathological phenotype. Also, our data emphasize the potential therapeutic efficacy of the tested drugs that inhibited the iron deposition and attenuate the other deleterious effects of the diseases, thus proving the effi-

cacy of these compounds. Ex vivo histological analysis of the new conditional mouse model, in which Coasy was deleted under the control of the human GFAP promoter, revealed that Coasy ablation in radial glia and astrocytic lineage triggers abnormal neuronal development and chronic neuroinflammation, offering new insights into disease mechanisms.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Neurodegenerazione associata a pantotenato chinasi; NBIA1; Neurodegenerazione con deposito cerebrale di ferro, tipo 1; PKAN; Sindrome di Hallervorden-Spatz

Neurodegenerazione associata alla proteina COASY; CoPAN; NBIA6; Neurodegenerazione con accumulo cerebrale di ferro da mutazione di COASY

L'UTILIZZO DEI MODELLI ASTROCITARI RICCHI DI FERRO E DEI MODELLI MURINI PER DEFINIRE LA TERAPIA PER PKAN E COPAN.

La deposizione di ferro nel cervello è un tratto distintivo di due malattie neurodegenerative progressive: PKAN e CoPAN. La PKAN è causata da mutazioni nel gene PANK2, che produce un enzima chiave nella sintesi del Coenzima A (CoA). La CoPAN è causata da mutazioni nel gene COASY, che codifica un enzima altrettanto cruciale per la stessa via biosintetica. Fino a poco tempo fa, il legame tra alterazioni del CoA e accumulo di ferro non era ben compreso a causa della mancanza di modelli di malattia adeguati. A questo scopo, siamo riusciti a sviluppare un modello cellulare utilizzando astrociti derivati da pazienti affetti da PKAN e CoPAN, che mostrano un significativo accumulo di ferro, replicando quindi il principale fenotipo umano. Il nostro progetto si è concentrato sullo studio dei meccanismi alla base di queste malattie, analizzando il metabolismo del ferro, la funzione mitocondriale, lo stress ossidativo e il traffico di proteine nelle cellule. Inoltre, stiamo testando l'efficacia di potenziali terapie, utilizzando CoA, 4-PBA e deferiprone, che in studi preliminari hanno mostrato risultati promettenti nel contrastare i difetti nella biosintesi del CoA. I nostri risultati forniscono nuove evidenze sui processi molecolari che portano all'accumulo di ferro in queste malattie e dimostrano come gli astrociti possano essere un modello cellulare prezioso per studiare queste patologie. Inoltre, i dati suggeriscono che i farmaci testati mostrano un'efficacia terapeutica, attenuando gli effetti delle malattie attraverso la riduzione della deposizione di ferro. Infine, l'analisi di un nuovo modello murino, in cui il gene Coasy è stato inattivato in modo specifico nelle cellule gliali, ha rivelato che la mancanza di Coasy in queste cellule causa anomalie nello sviluppo neuronale e neuroinfiammazione cronica, offrendo nuove prospettive sui meccanismi di queste malattie.

46

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies

GENETIC AND CELLULAR BASIS OF THE NEURODEGENERATIVE PATHOLOGY FENIB

Miranda Banos Maria Elena[1], A. Quintiliani[1], I. Serangeli[1], I. Aldobiyan[2], A. Giustini[1], R. Ronzoni[3], M.E. Colantuoni[1], I. Furina[1], L. Canafoglia[4], B. Castellotti[4], G. Marucci[4], E. Salsano[4], A. Stabile[4], D.A. Lomas, A. Fra[5], G. Lupo[1], J.A. Irving[3]

[1]Rome, Università Di Roma La Sapienza
[2]London and Riyadh, University College London, UK and King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia
[3]London, University College London, UK
[4]Milano, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta
[5]Brescia, Università Degli Studi Di Brescia

Project: GMR23T1217; Miranda Banos Maria Elena

FENIB (familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies) is a severe neurodegenerative disease characterised by epilepsy, myoclonus and dementia, caused by mutations in neuroserpin, a protein secreted by neurons involved in neuronal maturation and synapse formation and remodelling. These mutations promote the formation of neuroserpin polymers in the endoplasmic reticulum, which aggregate to form inclusion bodies typical of FENIB. We have described five out of the six FENIB variants known to date, and our analyses have shown that the severity of disease (assessed by age of onset, clinical symptoms and number of inclusions in the brain) is directly proportional to the instability of the protein and its propensity to form polymers. Using mouse neural progenitor cells expressing G392E neuroserpin differentiated to neurons, we have shown effects that include chronic oxidative stress, mitochondrial alterations, a reduction in mitochondria-endoplasmic reticulum contacts and neuronal death, with activation of nuclear factor kappa B but not of the unfolded protein response. To date, only a few cases of FENIB have been reported worldwide, probably due to the absence of diagnostic tools; patient presentation is variable and neuroserpin inclusions have only been observed post mortem. By using a combination of bioinformatic analyses and molecular and cellular biology approaches, complemented by clinical collaborations, we aim to discover and characterise new mutations that cause FENIB, and to better understand how different mutations lead to polymer formation and disease. Here we report the characterisation of two novel mutations, V394G and A179P, associated with late and early clinical symptoms of FENIB respectively. We have found that both promote the formation of neuroserpin polymers and their accumulation within the endoplasmic reticulum of COS-7 cells, reducing normal neuroserpin secretion, thus confirming both variants as new FENIB mutations.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Encefalopatia familiare con corpi inclusi di neuroserpina; FENIB;

BASI GENETICHE E CELLULARI DELLA PATOLOGIA NEURODEGENERATIVA FENIB

La FENIB (encefalopatia familiare con corpi di inclusione di neuroserpina) è una grave malattia neurodegenerativa caratterizzata da epilessia, mioclono e demenza, causata da mutazioni nella neuroserpina, una proteina secreta dai neuroni coinvolta nella maturazione neuronale e nella formazione e rimodellamento delle sinapsi. Queste mutazioni promuovono la formazione di polimeri di neuroserpina dentro dei neuroni, che aggregano creando corpi di inclusione tipici della FENIB. Fino ad ora, abbiamo descritto cinque delle sei mutazioni causanti FENIB e dimostrato che la gravità della malattia (valutata in base all'età di insorgenza, i sintomi clinici e il numero di inclusioni nel cervello) è direttamente proporzionale all'instabilità della proteina e alla sua propensione a formare polimeri. Utilizzando cellule progenitrici neurali di topo che esprimono neuroserpina G392E differenziate in neuroni, abbiamo trovato effetti che includono stress ossidativo cronico, alterazioni mitocondriali, riduzione dei contatti tra mitocondri e reticolo endoplasmatico e morte neuronale. Ad oggi, sono stati riportati solo pochi casi di FENIB, probabilmente a causa dell'assenza di strumenti diagnostici; la presentazione dei pazienti è variabile e le inclusioni di neuroserpina sono state osservate solo post mortem. Utilizzando analisi bioinformatiche e approcci di biologia

molecolare e cellulare, integrati da collaborazioni cliniche, il nostro obbiettivo è quello di scoprire e caratterizzare nuove mutazioni che causano FENIB, e comprendere meglio come diverse mutazioni portino alla formazione di polimeri e alla malattia. Qui riportiamo la caratterizzazione di due nuove varianti, V394G e A179P, associate rispettivamente a sintomi tardivi e precoci di FENIB. Entrambe promuovono la formazione di polimeri di neuroserpina e loro accumulo nel reticolo endoplasmatico di cellule COS-7, riducendo la normale secrezione della proteina, confermando quindi entrambe le varianti come nuove mutazioni FENIB.

47

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts

ROLE OF AQUAPORIN-4 ISOFORM MUTATIONS IN MEGALENCEPHALIC LEUKOENCEPHALOPATHY WITH SUBCORTICAL CYSTS (MLC)

Asci Ilaria[1], C. Palazzo[1], G. Signorile[1], M. Favia[1], O. Valente[1], P. Abbrescia[1], A. Frigeri[1]

[1]Bari, Università Degli Studi Di Bari Aldo Moro

Project: GMR23T1193; Frigeri Antonio

Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts (MLC) is a rare neurodegenerative disorder characterized by brain edema, early-onset macrocephaly, and subcortical cysts. Mutations in the MLC1 or GLIALCAM genes, primarily responsible for MLC, impair water balance in astrocytes and may affect aquaporin-4 (AQP4), the brain's main water channel. A recent study identified a homozygous A215T mutation in the NPA motif of AQP4, crucial for water transport, in MLC patients. AQP4, mainly located at astrocyte end-feet, plays a critical role in maintaining brain water homeostasis and regulating brain edema. AQP4 exists in four isoforms -M23, M1, M23ex, and M1ex- which aggregate into supramolecular structures called orthogonal arrays of particles (OAPs). To investigate the A215T mutation's effects, we used DNA constructs containing mutated versions of AQP4 isoforms (MELP-AQP4). Initially, we optimized transfection conditions using HEK293 cells, a classic immortalized cell model, transiently transfected with wild-type (WT) and MELP-AQP4 isoforms. Immunoblotting results revealed reduced protein expression in MELP-AQP4-transfected cells, suggesting a potential degradation mechanism for the mutated AQP4 isoforms. Additionally, immunofluorescence experiments followed by confocal microscopy showed altered subcellular localization. We further explored whether MELP-AQP4 was retained in the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus using compartment-specific fluorescent constructs. Subsequent experiments will transition to astrocytic cells (DI-TNC1), which better mimic the in vivo environment. This will help us understand the effects of MELP-AQP4 isoforms on OAP aggregation, interactions with GLIALCAM and MLC1, and water transport. Finally, MELP-AQP4 mice are being developed to investigate the functional relevance of this mutation in vivo. These investigations will enhance our understanding of AQP4's role in MLC and may lead to novel therapeutic strategies for this disorder.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Leucoencefalopatia megalencefalica con cisti sottocorticali; Sindrome di Van der Knapp; Leucodistrofia megalencefalica; Leucoencefalopatia megalencefalica vacuolizzante con cisti sottocorticali; Megalencefalia - leucodistrofia cistica; MLC;

RUOLO DELLE MUTAZIONI DELL'AQUAPORINA-4 NELLA LEUCOENCEFALOPATIA MEGALENCEFALICA CON CISTI SOTTOCORTICALI (MLC)

La Leucoencefalopatia Megalencefalica con cisti sottocorticali (MLC) è una rara patologia neurodegenerativa caratterizzata da edema cerebrale, macrocefalia precoce e cisti sottocorticali. Questa patologia è causata principalmente da mutazioni nei geni MLC1 o GLIALCAM, che alterano l'equilibrio idrico negli astrociti, probabilmente influenzando l'aquaporina-4 (AQP4), il principale canale per l'acqua nel sistema nervoso centrale. Uno studio recente ha identificato nei pazienti con MLC una mutazione A215T nel gene AQP4 in una regione cruciale per il trasporto dell'acqua. Esistono 4 isoforme di AQP4 -M23, M1, M23ex e M1ex- che si aggregano in strutture chiamate OAPs (Orthogonal Arrays of Particles). Per studiare gli effetti della mutazione A215T, abbiamo testato le condizioni ottimali di trasfezione in cellule HEK293, un modello cellulare standard, con isoforme wild-type (WT) e mutate (MELP-AQP4). I primi risultati di immunoblotting mostrano una diminuzione dell'espressione proteica nelle cellule MELP-AQP4, suggerendo un possibile ruolo della mutazione nel meccanismo di degradazione. Inoltre, esperimenti di immunofluorescenza e analisi confocale indicano una localizzazione alterata della proteina mutata. A tal proposito, stiamo valutando una possibile ritenzione della proteina mutata nel reticolo endoplasmatico o nel Golgi mediante l'uso di costrutti fluorescenti specifici per questi compartimenti. In una fase successiva, gli esperimenti saranno traslati a cellule astrocitarie (DI TNC1), che meglio riproducono l'ambiente in vivo, per valutare l'impatto delle varianti MELP-AQP4 sull'aggregazione in OAPs, sull'interazione con GLIALCAM e MLC1 e sul trasporto dell'acqua. Infine, verrà utilizzato un modello murino MELP-AQP4 al fine di indagare in vivo la rilevanza funzionale di questa mutazione. Queste ricerche rappresentano un passo fondamentale per comprendere il ruolo dell'AQP4 nella MLC e fornire nuove prospettive per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative.

48

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease

48NEURON-ASTROCYTE INTERACTIONS FOR SPATIAL MEMORY AND THEIR IMPLICATIONS IN FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE

M. Gaborit[1], M. Speggiorin[2], S. Mariotti[3], A. Arabi[2], L.F. Rossi[4], L. Mariotti[1]

[1]Padova, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Padova, Università Di Padova
[3]Modena, Università Di Modena E Reggio Emilia
[4]Rovereto di Trento, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)

Project: GMR22T1031; Mariotti Letizia

Astrocytes are thought to be key mediators of plasticity in the hippocampal circuit, which is required to form new memories of rewarding events and is severely impaired in familial Alzheimer's disease (fAD). However, whether astrocyte activation in response to reward signals promotes learning remains poorly understood, as does astrocytes's link to AD pathogenesis. To address this question, we trained a mouse model of fAD in a

spatial memory task, and compared their performance to 3, 6 and 8 age-matched wild-type mice. Mice foraged in search of three reward locations, changed and learnt anew every day. After learning, short or long-term memory was measured as the time spent exploring empty reward locations on the same and on the following day. Then we recorded astrocytes Ca2+ responses to dopaminergic agonists in slice, and assayed hippocampal Aβ plaques load with immunohistochemistry. Mice learnt the task and showed robust short-term memory. However, 8 months-old fAD mice struggled to remember reward locations from the previous day. This long-term memory deficit were preceded by decreased astrocytes responses to dopaminergic agonists and increased load of Aβ plaques starting at 6 months. These data suggest that astrocytes dopaminergic activation maybe required for long-term memory and its disfunction may precedes learning impairment in fAD.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Alzheimer familiare, autosomica dominante, a esordio precoce; EOFAD; Malattia di Alzheimer familiare; Malattia di Alzheimer familiare, autosomica dominante, a esordio precoce

INTERAZIONI NEURONE-ASTROCITA PER LA MEMORIA SPAZIALE E RELATIVE IMPLICAZIONI NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER FAMILIARE

Gli astrociti sono ritenuti mediatori essenziali della plasticità nel circuito ippocampale, che costituisce il substrato della formazione di nuove memorie di eventi gratificanti, funzione gravemente compromessa nella malattia di Alzheimer familiare (fAD). Tuttavia, non è ancora noto se l'attivazione degli astrociti in risposta ai segnali di ricompensa promuova l'apprendimento, ne' se gli astrociti siano implicati nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Per fare luce su questi meccanismi, abbiamo addestrato un modello murino di fAD in un esercizio di memoria spaziale e confrontato la sua performance con topi wild-type di età corrispondente, a 3, 6 e 8 mesi. Ai topi è stato chiesto di apprendere tre posizioni di ricompensa, che cambiavano e venivano di nuovo apprese ogni giorno. Dopo l'apprendimento, la memoria a breve o lungo termine è stata misurata come il tempo trascorso esplorando le posizioni di ricompensa vacanti, sia lo stesso giorno che il giorno successivo. Successivamente, abbiamo registrato le risposte degli astrociti ad agonisti dopaminergici in sezioni cerebrali e misurato il carico di placche Aβ ippocampali con immunoistochimica. Dimostriamo che i topi imparano l'esercizio e mostrano una robusta memoria a breve termine. Tuttavia, ad 8 mesi i topi fAD hanno difficoltà a ricordare le posizioni di ricompensa del giorno precedente. Questo deficit di memoria a lungo termine è preceduto da una riduzione delle risposte degli astrociti agli agonisti dopaminergici e da un aumento del carico di placche Aβ a partire dai 6 mesi di età. Questi dati suggeriscono che l'attivazione dopaminergica degli astrociti potrebbe essere necessaria per la memoria a lungo termine e che il suo malfunzionamento potrebbe precedere il deterioramento dell'apprendimento nella malattia di Alzheimer familiare.

49

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Familial Alzheimer's disease

CEREBRAL VASCULARIZATION AND GLIOVASCULAR INTERFACE CHARACTERIZATION IN THE B6.152H MOUSE MODEL OF FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE.

Zonta Micaela[1], A. Di Spiezio[1], A. Lia[2], A. Chiavegato[2]

[1]Padova, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Padova, Università Di Padova

Project: GMR23T1234; Zonta Micaela

Cerebrovascular dysfunction is often associated to Alzheimer's disease (AD), where it contributes to neuronal degeneration and amyloid accumulation lowering the threshold for dementia in familial and sporadic AD patients. The interplay between vascular pathology and AD progression, however, has been poorly explored in preclinical models. We here aim to characterize cerebrovascular function in the B6.152H mouse model of familial AD, carrying APPSwe mutation in neurons and PSEN2 N141I mutation in neurons and astrocytes. Astrocytes play a fundamental role in the neurovascular unit and their function is strictly coupled to intracellular Ca2+ signaling. We recently demonstrated a significant impairment of astrocytic Ca2+ signal in the somatosensory cortex (SSCx) of B6.152H mice, associated to neuronal plasticity defects. Notably, we also developed a genetic strategy that fully restores neuronal plasticity by rescuing physiological astrocyte signal. The goal of our project is to test whether this rescue strategy can be beneficial also in dampening vascular dysfunction. We are collecting data on the vascularization of the SSCx in 8 month-old WT and AD mice, evaluated through 2-photon microscopy in anesthetized animals after intraluminal labelling of vessels (TRITC-dextran) and 3D reconstruction of the vascular tree. In parallel, we are characterizing possible astrocyte signal defects at the gliovascular interface, by imaging Ca2+ signal at astrocytic endfeet (specialized processes in contact with vessels) expressing the genetically encoded Ca2+ probe GCaMP6f. In addition, we are analysing the cerebral tissue distribution of the astrocyte-specific protein Aquaporin-4 (AQP-4) to evaluate possible alterations in its polarization between endfeet and cerebral parenchyma, as described in other AD models. The characterization of these pathological aspects will allow testing the potential beneficial effects of the rescue strategy of astrocyte signal developed in our laboratory.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Alzheimer familiare

CARATTERIZZAZIONE DEL SISTEMA VASCOLARE CEREBRALE E DELL'UNITÀ GLIOVASCOLARE NEL MODELLO MURINO B6.152H DI MALATTIA DI ALZHEIMER FAMILIARE.

La malattia di Alzheimer (AD) è spesso accompagnata da disfunzioni cerebrovascolari, che contribuiscono alla degenerazione neuronale e all'accumulo di amiloide favorendo l'insorgenza di demenza nei pazienti AD sporadici e familiari. Pochi sono, tuttavia, gli studi sulla relazione tra patologia vascolare e progressione dell'AD in modelli preclinici. Il nostro obiettivo è caratterizzare la funzione cerebrovascolare nel modello murino B6.152H di AD familiare, con mutazione APPSwe nei neuroni e PSEN2 N141I in neuroni ed astrociti. Gli astrociti giocano un ruolo fondamentale nell'unità neurovascolare, e la loro attività è strettamente legata al segnale intracellulare Ca2+. Abbiamo recentemente dimostrato che nei topi B6.152H gli astrociti della corteccia somatosensoriale (SSCx) presentano un'alterazione significativa del segnale Ca2+, associata a difetti di plasticità nei circuiti neuronali. Abbiamo sviluppato una strategia genetica che permette di recuperare completamente la

plasticità neuronale attraverso il recupero del segnale fisiologico negli astrociti. Scopo di questo progetto è verificare se tale strategia possa contribuire a ridurre la disfunzione vascolare. Stiamo valutando la vascolarizzazione della SSCx in topi WT e AD, mediante microscopia a 2 fotoni in anestesia dopo marcatura dei vasi con TRITC destrano. In parallelo, stiamo caratterizzando i possibili difetti di segnale degli astrociti all'interfaccia con i vasi, registrando il segnale Ca2+ a livello degli endfeet (processi specializzati in contatto con i vasi) dopo espressione del sensore per il Ca2+ GCaMP6f. Inoltre, stiamo analizzando la distribuzione della proteina Aquaporina-4, specificamente espressa dagli astrociti, per valutare possibili alterazioni nella sua polarizzazione tra endfeet e parenchima cerebrale, come descritto in altri modelli AD. La caratterizzazione di questi aspetti patologici ci permetterà di verificare i possibili effetti benefici della strategia di recupero da noi sviluppata.

50

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Huntington disease

DEFECTIVE SIALYLATION PATHWAYS REPRESENT A DRUGGABLE TARGET IN HUNTINGTON'S DISEASE

G. Pepe[1], L. Pizzati[1], S.J. Moons[2], K. Świtońska-Kurkowska[3], P. Scarselli[1], I. Coletta[1], N. Valentini[1], M. Figiel[3], T.J. Boltje[2], R. Parlato[4], A. Di Pardo[1], V. Maglione[1]

[1] Pozzilli, Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed - IRCCS
[2]Nijmegen, Cluster of Molecular Chemistry, Institute for Molecules and Materials, Radboud University Nijmegen
[3]Poznań, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences
[4]Mannheim, Division for Neurodegenerative Diseases, Department of Neurology, Mannheim Center for Translational Neuroscience

Project: GMR24T2035; Maglione Vittorio

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 proteins. Defective metabolism of sialic acid-containing glycolipids, such as gangliosides, has been described as important determinant Huntington's disease (HD) pathogenesis. In this study, we investigated the metabolism of polysialic acid (polySia), a sugar polymer commonly linked to the neural cell adhesion molecule (NCAM), a protein essential for brain development, plasticity and regeneration. Our findings demonstrated, for the first time, that metabolism of polySia is normally regulated by huntingtin (Htt), and became precociously perturbed in HD mice. Importantly, treatment with a highly cell permeant sialic acid derivative (PNANA) mitigates motor deficit and ameliorated cognitive decline in a HD mouse model. These beneficial effects were associated with activation of neuroprotective pathways and amelioration of mouse neuropathology. Under the mechanistic point of view, treatment with PNANA stimulated sialic acid metabolism and restored normal sialylation state of sialo-conjugates (NCAM and gangliosides). This was associated with increased expression of endosomal markers Eea1 and Rab7, lysosomal biogenesis marker TFEB and stimulation of autophagic flux. Altogether our results indicate that the defective sialic acid pathways may represent an effective therapeutic target in HD. We believe that this study may contribute to clarified some still unexplored aspects of disease pathogenesis and to implement or to eventually define novel strategies for a better management of the disease.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Huntington; HD; Corea di Huntington;

LE ALTERAZIONI DEI MECCANISMI DI "SIALILAZIONE" RAPPRESENTANO UN BERSAGLIO TERAPEUTICO NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

L'acido sialico (Sia) è un monosaccaride acido a nove atomi di carbonio presente naturalmente alle estremità delle catene glucidiche sulla superficie delle cellule e delle proteine solubili. Alterazioni nel metabolismo dei glicolipidi contenenti acido sialico (gangliosidi) sono stato identificate come un fattore determinante nella patogenesi della Malattia di Huntington (MH). In questo studio, abbiamo analizzato il metabolismo dell'acido polisialico (polySia), un polimero di zucchero, legato comunemente alla Molecola di Adesione Cellulare Neuronale (NCAM), una proteina essenziale per lo sviluppo, la plasticità e la rigenerazione del cervello. I nostri risultati dimostrano, per la prima volta, che il metabolismo di polySia è normalmente regolato dalla huntingtina (Htt) e che nei topi affetti da MH subisce alterazioni precoci. Inoltre, il trattamento con un derivato dell'acido sialico, altamente permeabile (PNANA), riduce i deficit motori e migliora il declino cognitivo in un modello murino di MH. Questi effetti benefici sono associati all'attivazione di meccanismi neuroprotettivi e al miglioramento della neuropatologia nel modello animale. Dal punto di vista meccanicistico, il trattamento con PNANA ripristina il normale stato di "sialilazione" dei "sialo-coniugati" (NCAM e gangliosidi). Questo effetto si associa ad un aumenta espressione dei marcatori endosomiali Eea1 e Rab7, del marcatore di biogenesi lisosomiale TFEB, e alla stimolazione del flusso autofagico. In conclusione, i nostri risultati indicano che il metabolismo dei sialo-coniugati può rappresentare un valido bersaglio terapeutico per la Malattia di Huntington. Pertanto, riteniamo che questo studio possa contribuire a chiarire alcuni aspetti ancora poco investigati nella patogenesi della malattia e ad aprire la strada a nuove strategie terapeutiche.

51

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Huntington disease

CHOLESTEROL-RELATED SYNAPTIC SIGNATURE IN THE PRODROMAL HUNTINGTON'S DISEASE

M. Vitali[1], F. Sangalli[1], C. Caggiati[1]
E. Vezzoli[2], F. Campanelli[3], G. Marino[4], G. Natale[4], B. Ruozi[5], M.A. Vandelli[5], J. Duskey[5], I. Ottonelli[5], G. Tosi[5], V. Ghiglieri[3]
M. Valenza[1]

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Milan, Università Vita Salute San Raffaele
[3]Rome, Università San Raffaele - Roma
[4]Rome, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli
[5]Modena, Università Di Modena E Reggio Emilia

Project: GMR22T1079; Valenza Marta

Huntington's disease (HD) is a genetic, adult-onset,

neurodegenerative disorder caused by an expansion of CAG repeats (>39) in the Huntingtin gene and characterized by the loss of striatal neurons and cortical neurons projecting to the striatum. After a variable pre-symptomatic period, individuals carrying the HD mutation enter a prodromal stage. At this stage, subtle changes in cognition have been described. Although cognitive impairments begin many years before motor onset and are often reported as the most debilitating aspects of HD, there are no drugs or treatments that efficiently target these aspects. A recent characterization of the zQ175DN HD mouse model identified the beginning of the prodromal stage at 20 weeks of age. At this age, HD mice already show reduced brain cholesterol biosynthesis and exhibit cognitive decline but not motor defects, which appear 7 months later. Notably, the pre-symptomatic administration of cholesterol through brain-permeable nanoparticles prevents cognitive decline in prodromal HD mice (Birolini, Valenza et al., 2023). In this study, we have characterized the synaptic signature of the striatum of prodromal HD mice by evaluating the immunofluorescence-based synaptic density of excitatory and inhibitory synapses, transmission electron microscopy and ultrastructure of excitatory synapses, and the level of synaptic proteins linked to cholesterol and cognitive processes in the synaptosomes. Optogenetic studies in HD mice crossed with transgenic mice expressing the light-activated ion channel Channelrhodopsin-2 are also ongoing to identify the striatal circuits linked to the synaptic changes identified at this early stage of the disease. Further characterization of the synaptic signature in naïve and cholesterol-treated HD mice at the prodromal stage will help to decipher the mechanisms of cholesterol efficacy and to identify novel and early cholesterol-related targets of intervention against cognitive decline.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Huntington; HD; Corea di Huntington

IDENTIFICAZIONE DEI CAMBIAMENTI SINAPTICI ASSOCIATI AL COLESTEROLO NELLA FASE PRODROMICA DI MALATTIA DI HUNTINGTON

La malattia di Huntington è una malattia neurodegenerativa genetica rara causata da un'espansione di ripetizioni di triplette CAG (>39) nel gene codificante la proteina Huntingtina. La malattia si manifesta in età adulta ed è caratterizzata dalla degenerazione dei neuroni striatali e dei neuroni corticali che proiettano allo striato. Dopo un periodo pre-sintomatico, gli individui portatori della mutazione entrano in una fase prodromica, caratterizzata da lievi deficit cognitivi, che iniziano molti anni prima dell'insorgenza dei difetti motori tipici della malattia. Nonostante i deficit cognitivi siano spesso segnalati come gli aspetti più debilitanti della malattia, non esistono ad oggi farmaci o trattamenti specifici efficaci. La fase prodromica di malattia è stata recentemente descritta anche in un modello animale Huntington (zQ175DN). In questa fase, gli animali Huntington mostrano già una ridotta produzione di colesterolo cerebrale, che influenza negativamente l'attività sinaptica, e iniziano a sviluppare deficit cognitivi, mentre i difetti motori compaiono 7 mesi dopo. Infine, la somministrazione sistemica di colesterolo tramite nanoparticelle permeabili al cervello in fase presintomatica di questi animali previene il declino cognitivo in fase prodromica (Birolini, Valenza et al., 2023). In questo studio, abbiamo identificato, mediante approcci multidisciplinari, i cambiamenti a livello di sinapsi e di circuiti associati alla ridotta produzione di colesterolo cerebrale e al declino cognitivo nella fase prodromica di malattia. Un'ulteriore caratterizzazione nei topi HD prodromici naïve e trattati con colesterolo è in corso con l'obiettivo di decifrare i meccanismi dell'efficacia delle strategie basate sul colesterolo e identificare nuovi bersagli correlati al colesterolo su cui agire per contrastare preocemente il declino cognitivo prima che compaia la neurodegenerazione.

52

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Huntington disease

DNA AS DRIVER OF ITS OWN INSTABILITY WITHIN THE HUNTINGTON'S DISEASE LOCUS

Zobel Martina[1], "M. Zobel, S. Ma[2], E. Zanella[2], D. Scalzo[1], S. Maestri[1], Y. Doksani[3], E. Cattaneo[1]

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Milan, IFOM ETS - Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare
[3]Milan, IFOM ETS - Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare

Project: GMR23T1059; Cattaneo Elena

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disease caused by a CAG repeat expansion in exon 1 of the HUNTINGTIN gene (HTT). HTT-CAG repeats are somatically and meiotically unstable. Their instability is evident in the brain regions affected by HD. Genome-Wide Association Studies showed that number and purity of the CAGs - whether perfect or interrupted by silent G-A nucleotide substitutions – are drivers of pathogenesis. However, whether there is a direct link between length/composition of the CAGs and the progressive accumulation of CAG instability in the most affected cell types remains elusive. In a joint effort between our lab and Ylli Doksani's lab at IFOM, we are investigating how the length and the composition of HTT-CAG repeats affect their stability and their associated pathological phenotypes among those studied in the laboratory (from transcriptional abnormalities, to brain cholesterol production, to synaptic dysfunction). In particular, by using clinically-relevant variants of HTT-CAG repeats we are studying how they affect the rate of CAG tract replication and the formation of DNA secondary structures. In these experiments, we have found that CAG composition influences these parameters with consequences for the phenotypes under investigation. Currently, we are using electron microscopy to visualize the ultrafine structure of CAG repeats at high resolution. Thus, our results identify the DNA sequence itself as a key factor upstream of somatic instability of the CAG tract of HTT exon 1 and its associated phenotypes.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Huntington; HD; Corea di Huntington;

IL DNA COME FATTORE CHIAVE DELL'INSTABILITÀ DEL LOCUS GENICO RESPONSABILE DELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

La malattia di Huntington (HD) è una malattia rara, ereditaria e neurodegenerativa causata dall'espansione di triplette CAG presenti nell'esone 1 del gene HUNTINGTIN (HTT). Le ripetizioni CAG sono instabili sia nella linea germinale sia nei neuroni più colpiti dalla malattia, un fenomeno chiamato instabilità somatica. Studi di popolazione hanno dimostrato che il numero e la purezza delle ripetizioni CAG – tutte uguali o interrotte da sostituzioni nucleotidiche silenti G-A - sono fattori determinanti della patogenesi. Tuttavia, non è ancora chiaro se esista un legame diretto tra la lunghezza/composizione delle ripetizioni CAG e il progressivo accumulo di instabilità delle ripetizioni CAG nei tipi cellulari più affetti dalla malattia. In collaborazione con il laboratorio di Ylli Doksani presso IFOM, stiamo studiando come la lunghezza e la composizione delle ripetizioni CAG influenzano l'instabilità del DNA nel tratto CAG ripetuto e quali siano i fenotipi patologici associati tra quelli più

studiati in laboratorio (dalle anomalie trascrizionali, alla produzione di colesterolo cerebrale, alle disfunzioni sinaptiche). In particolare, introducendo varianti cliniche delle ripetizioni CAG stiamo studiando come queste influenzino la velocità di replicazione del tratto CAG e la formazione di strutture secondarie del DNA. In questi esperimenti abbiamo scoperto che la composizione del CAG influenza questi parametri con conseguenze per i fenotipi in esame. Attualmente, stiamo utilizzando la microscopia elettronica per visualizzare ad alta risoluzione la struttura ultrafine delle ripetizioni CAG. I nostri risultati identificano, quindi, la sequenza stessa del DNA come fattore chiave a monte dell'instabilità somatica del tratto CAG dell'esone 1 di HTT e dei fenotipi ad esso associati.

53

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Huntington disease

EXPLORING THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF CORTICAL ADAM10 INHIBITION IN HUNTINGTON'S DISEASE

Zuccato Chiara[1], A. Scolz[1],A. Lenci[1], C. Cordiglieri[2], E. Vezzoli[3], G. Pepe[4], V. Maglione[4],E. Cattaneo[1]

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Milano, Fondazione Istituto Nazionale Di Genetica Molecolare (Ingm)
[3]Milano, Università Vita Salute San Raffaele
[4]Pozzilli, Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed - IRCCS

Project: GMR24T1065; Zuccato Chiara

Striatal atrophy and cognitive decline in Huntington's disease (HD) are primarily caused by mutant huntingtin-induced phenotypes in presynaptic cortical neurons of the cortico-striatal circuitry. Cortical dysfunction therefore represents an exciting target for the development of new HD therapies. We have previously linked hyperactive ADAM10 to HD synaptic dysfunction and cognitive decline. We also demonstrated the therapeutic potential of ADAM10 inhibition in HD. More recently, we found that ADAM10 plays a critical role in the presynapse by binding to proteins involved in synaptic vesicle transport and release. At the same time, increased ADAM10 level has been shown to reduce synaptic vesicle density in HD cortical neurons. This prompted us to investigate whether presynaptic cortical ADAM10 inhibition is necessary and sufficient to counteract cortico-striatal dysfunction and striatal degeneration in HD. To test this hypothesis, we reconstructed the HD cortico-striatal circuitry in vitro using microfluidic chambers with separated compartments, which allowed for the selective treatment of the cortical and striatal components with ADAM10 inhibitors. We successfully recapitulated the loss of cortico-striatal synaptic connectivity and the striatal atrophy observed in HD mouse models. We also assessed the impact of selective cortical ADAM10 inhibition on well-established presynaptic molecular defects in HD. More recently, we have explored cortico-striatal connectivity in HD mice following the administration of a chemical ADAM10 inhibitor via the intranasal route, which bypasses the blood-brain barrier, enabling efficient delivery to the cerebral cortex.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Huntington; HD; Corea di Huntington;

INIBIRE L'ENZIMA ADAM10 IN CORTECCIA: UNA NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA PER IL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

La malattia di Huntington è una patologia neurodegenerativa ereditaria che colpisce il Sistema Nervoso Centrale, portando a un deterioramento delle capacità motorie, cognitive ed emotive. La causa della malattia è una mutazione nel gene HTT che codifica per la proteina huntingtina. Le aree cerebrali più colpite sono la corteccia e lo striato che sono connesse dalla via cortico-striatale. In questa via, i neuroni corticali mandano proiezioni verso lo striato, stabilendo contatti con i neuroni di quest'area e formando un circuito fondamentale per il corretto funzionamento del cervello. Numerosi studi hanno evidenziato che l'espressione di huntingtina mutata nei neuroni corticali è sufficiente a compromettere la funzionalità di questo circuito, portando alla morte dei neuroni striatali. Il "danno corticale" causato dalla proteina mutata è quindi determinante nell'insorgenza della patologia. In questo studio ci concentriamo su un enzima chiamato ADAM10 che è cruciale per la struttura e la funzione dei circuiti cerebrali. Nella malattia di Huntington, l'attività di ADAM10 è eccessivamente elevata e causa malfunzionamento delle connessioni neuronali. Studi recenti ci fanno ipotizzare che sia proprio l'aumento dell'attività enzimatica di ADAM10 nella corteccia a contribuire alle disfunzioni del circuito cortico-striatale e alla degenerazione dello striato. Il nostro obiettivo è verificare se nella malattia di Huntington l'inibizione di ADAM10 nella corteccia sia sufficiente a ripristinare l'attività del circuito cortico-striatale e a prevenire la perdita di cellule nervose nello striato. Se così fosse si potrebbero sviluppare nuove strategie terapeutiche per la malattia di Huntington specificatamente mirate alla corteccia e basate sull'inibizione di ADAM10. Poichè la corteccia è molto più accessibile ai farmaci rispetto allo striato, eventuali risultati positivi permetterebbero di accelerare lo sviluppo di inibitori di ADAM10 per uso clinico.

54

Genetic neurological disorder/Neurodegenerative diseases

Huntington disease

CIRCHTT(2,3,4,5,6) – CO-EVOLVING WITH THE HTT CAG-REPEAT TRACT - MODULATES HUNTINGTON`S DISEASE PHENOTYPES

Biagioli Marta[1], J. Morandell[1]

[1]Trento, Università Di Trento

Project: GMR24T1100; Biagioli Marta

Circular RNA (circRNA) molecules play crucial roles in brain development and brain-related disorders. In this study, we identified and validated a circRNA, circHTT(2,3,4,5,6), originating from the Huntington's disease (HD) gene locus. We demonstrated its evolutionary conservation across various mammalian species, is abundant expression in the central nervous system and found a correlation between circHTT(2,3,4,5,6) levels and the length of the CAG-repeattractinexon-1ofHTTinbothhumanandmouseHDmodels.

The mouse counterpart, circHtt(2,3,4,5,6), is expressed during embryonic development, increases throughout nervous system maturation, and becomes abnormally upregulated in the presence of an expanded CAG tract. Although an IRES-like motif was predicted in circHtt(2,3,4,5,6), direct translation fron this site does not appear to occur in adult mouse brain tissue. However, a small but consistent portion of circHtt(2,3,4,5,6) associates with the 40S ribosomal subunit, indicating a potential role in protein translation regulation.

Finally, overexpression experiments in HD-relevant STHdh striatal cells revealed that circHtt(2,3,4,5,6) can modulate CAG expansion-driven cellular defects, particularly in cell-to-substrate adhesion, identifying it as a possible novel disease modifier in Huntington's Disease pathology.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Malattia di Huntington; HD; Corea di Huntington;

CIRCHTT(2,3,4,5,6) – CHE SI EVOLVE IN SINCRONIA CON LA REGIONE RIPETUTA DEL GENE HTT – MODULA FENOTIPI CELLULARI NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON.

Le molecole di RNA circolare (circRNA) svolgono funzioni fondamentali durante lo sviluppo cerebrale e nei disturbi ad esso correlati. In questo studio abbiamo identificato e validato un circRNA, circHTT(2,3,4,5,6), derivante dal locus genetico implicato nella malattia di Huntington (HD), particolarmente espresso nel sistema nervoso centrale. Abbiamo evidenziato la sua conservazione evolutiva in diverse specie di mammiferi e scoperto una correlazione tra i livelli di circHTT(2,3,4,5,6) e la lunghezza del tratto di ripetizione CAG nell'esone 1 del gene HTT in modelli sperimentali di HD sia umani che murini. L'ortologo murino, circHtt(2,3,4,5,6), espresso durante l'embriogenesi, aumenta durante lo sviluppo del sistema nervoso ed è sovra-espresso in maniera aberrante in presenza del tratto CAG espanso. Sebbene in circHtt(2,3,4,5,6) sia individuato un elemento IRES, questo circRNA non sembra essere tradotto direttamente nel tessuto cerebrale del topo adulto. Tuttavia, una frazione modesta, ma chiaramente presente, di circHtt(2,3,4,5,6) si associa alla subunità ribosomiale 40S, suggerendo un possibile ruolo nella regolazione della traduzione proteica.

Infine, esperimenti di sovraespressione di circHtt(2,3,4,5,6) nelle cellule striatali STHdh, modello semplice, ma rilevante per la malattia, hanno rivelato la sua capacità di modulare i difetti cellulari indotti dall'espansione del CAG nell'adesione cellula-substrato, rivelando, così, un possibile nuovo modificatore della patologia della malattia di Huntington.

55

Genetic neurological disorder/Prion diseases

Fatal Familial Insomnia

FATAL FAMILIAL INSOMNIA: PREVENTIVE TREATMENT WITH DOXYCYCLINE OF AT RISK INDIVIDUALS

Forloni Gianluigi[1]

[1]*Milano, Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS*

Project: GSP21002; Forloni Gianluigi, Roiter Benedetto Ignazio, Tagliavini Fabrizio

In this project, we carry out a preclinical treatment with doxycycline (DOXY) in subjects with a genetic risk of developing fatal familial insomnia (FFI). FFI is a rare genetic neurodegenerative disease characterized by disrupted sleep, autonomic hyperactivation, and motor abnormalities. FFI is inherited in an autosomal dominant manner and is associated with the aspartic acid to asparagine mutation at codon 178 of the prion protein gene, along with a methionine at the polymorphic codon 129 (D178N/M129). The disease is devastating, and patients typically die within one year of onset, with no treatments available. Genetic analysis among family members with a history of FFI has permitted the identification of 22 subjects carrying the mutation. Based on historical data, we determined that the age range of 50-55 years is the life period with the highest risk of developing FFI. This is the first preventive study in FFI, utilizing the unique opportunity to treat, under controlled conditions, a large pedigree of individuals at risk of developing the disease. The potential efficacy of DOXY in prion diseases is derived from experimental investigations and two clinical observational studies in Italy and Germany, which demonstrated positive effects on survival. Thus, in a single-blind study, 11 asymptomatic carriers were treated with DOXY (100-200 mg/day orally) and monitored for ten years to determine the incidence of the disease. Doxycycline was well tolerated, with no evidence of major side effects. Over the ten years of observation, four mutation carriers developed FFI, while three additional carriers, including homozygous twins, developed the disease later. Although the small sample size limits the statistical power of the analysis, and the comparison group composed solely of historical data may not be considered standard, the probability of observing this result within ten years has a p<0.05, suggesting that doxycycline may delay the onset of FFI.

Disordini genetici neurologici/Malattie da Prioni

Insonnia Familiare Fatale; FFI; IFF;

INSONNIA FATALE FAMILIALE: TRATTAMENTO PREVENTIVO CON DOXICICLINA IN SOGGETTI A RISCHIO

In questo progetto, abbiamo effettuato un trattamento preclinico con doxiciclina (DOXY) in soggetti con rischio genetico di sviluppare insonnia familiare fatale (FFI). La FFI è una rara malattia neurodegenerativa genetica caratterizzata da sonno interrotto, iperattivazione autonomica e anomalie motorie. La FFI è ereditata in modo autosomico dominante ed è associata alla mutazione dell'acido aspartico in asparagina al codone 178 del gene della proteina prionica, associata alla metionina al codone 129 (D178N/M129). La malattia è devastante e i pazienti in genere muoiono entro un anno dall'esordio, senza trattamenti disponibili. L'analisi genetica tra i membri di famiglie con una storia di FFI ha consentito l'identificazione di 22 soggetti portatori della mutazione. Sulla base dei dati storici, abbiamo determinato come età a rischio elevato di sviluppare FFI la fascia tra i 50-55 anni. Questo è il primo studio preventivo sulla FFI, che sfrutta l'opportunità unica di trattare, in condizioni controllate, un ampio pedigree di individui a rischio di sviluppare la malattia. La potenziale efficacia di DOXY nelle malattie da prioni derivava da indagini sperimentali e cliniche precdenti. Pertanto, in uno studio preventivo, 11 portatori asintomatici, scelti sulla base dell'età, hanno ricevuto DOXY (100-200 mg/giorno per via orale) e sono stati monitorati per dieci anni. La doxiciclina è stata ben tollerata, senza effetti collaterali importanti. Nel corso dei dieci anni di osservazione, quattro portatori della mutazione hanno sviluppato la FFI, mentre altri tre portatori, tra cui gemelli omozigoti, hanno sviluppato la malattia in seguito. Sebbene le piccole dimensioni del campione limitino la potenza statistica dell'analisi e il gruppo di confronto composto esclusivamente da dati storici possa non essere considerato standard, la probabilità di osservare questo risultato entro dieci anni ha un p<0,05, il che suggerisce che la doxiciclina può ritardare l'insorgenza della FFI.

56

Genetic neurological disorder/Prion diseases

Inherited Creutzfeldt-Jakob disease

Fatal Familial Insomnia

TARGETING THE UNDRUGGABLE: CHEMICAL EXPLORATION OF A PRION PROTEIN DEGRADER COMPOUND

Innocenti Nicole[1], E. Biasini[1]

[1]Trento, Università Di Trento

Project: GGP20043; Biasini Emiliano

Prion diseases are rare and fatal neurodegenerative disorders caused by protein misfolding. The interaction between the normal protein isoform (PrP) and the pathogenic isoform (PrPSc) results in the conversion of PrP to PrPSc, leading to the accumulation of the abnormal protein and ultimately to disease. Although PrP is considered an undruggable protein by classical pharmacology, our previous work has shown that by stabilising a PrP folding intermediate, it may be possible to induce its degradation and stop the cascade leading to fatal aggregation. This new approach, called Pharmacological Protein Inactivation by Folding Intermediate Targeting (PPI-FIT), makes it possible to identify a folding intermediate and design small ligands to promote its degradation by the cellular quality control machinery, which recognises such artificially stabilised intermediates as incorrectly folded species. We have applied PPI-FIT to target PrP and identified a pharmacological degrader (named SM875) capable of dose-dependently suppressing the expression of the protein [1]. A general synthetic plan for SM875 was designed, more than 50 analogs were synthesised, purified and characterised to test them for biological activity. A new image-based screening method was also developed and validated to improve screening efficiency. Dose-dependent analysis of each molecule allowed us to establish a first structure-activity relationship for SM875, which was used to refine the docking model of the compound-pocket interaction. These results provide the basis for a new chemical exploration of compounds active against the folding intermediate of PrP and potentially for the development of a treatment for prion diseases.

1. G. Spagnolli et al., Pharmacological inactivation of the prion protein by targeting a folding intermediate, Commun. Biol., 2021, 4, 1–16, doi: 10.1038/s42003-020-01585-x."

Disordini genetici neurologici/Malattie da Prioni

Malattia ereditaria di Creutzfeldt-Jakob; fCJD; CJD ereditaria;

Insonnia Familiare Fatale; FFI; IFF;

TARGETING THE UNDRUGGABLE: ESPLORAZIONE CHIMICA DI UN DEGRADER DELLA PROTEINA PRIONICA

Le malattie da prioni sono patologie neurodegenerative rare e fatali causate dal malfunzionamento della proteina prionica. Il processo patologico si innesca quando l'interazione tra l'isoforma normale della proteina (PrP) e quella patogena (PrPSc) converte la PrP in PrPSc, portando all'accumulo della proteina anomala e, di conseguenza, alla comparsa della malattia. Sebbene la PrP sia tradizionalmente considerata una proteina difficile da colpire con i metodi della farmacologia classica, studi precedenti hanno dimostrato che stabilizzando un intermedio di ripiegamento della PrP è possibile indurne la degradazione e bloccare la cascata patologica responsabile della sua aggregazione. Questo approccio innovativo, noto come Pharmacological Protein Inactivation by Folding Intermediate Targeting (PPI-FIT), permette di identificare intermedi di ripiegamento specifici e progettare molecole in grado di promuoverne la degradazione. Applicando questa strategia alla proteina prionica, è stata identificata una molecola chiamata SM875, capace di sopprimere l'espressione della proteina in modo dose-dipendente [1]. Per ottimizzare il composto, sono stati sintetizzati, purificati e caratterizzati oltre 50 analoghi, testandone l'attività biologica. Inoltre, è stato sviluppato e validato un nuovo metodo di screening per aumentare l'efficienza dei test biologici. Queste attività hanno permesso di definire una prima structure-activity relationship (SAR) per SM875, che è stata utilizzata al fine di perfezionare il modello di interazione molecolare. I risultati ottenuti pongono le basi per un'esplorazione chimica più approfondita di composti attivi contro l'intermedio di ripiegamento della PrP e per lo sviluppo di potenziali trattamenti per le malattie da prioni.

1. G. Spagnolli et al., Pharmacological inactivation of the prion protein by targeting a folding intermediate, Commun. Biol., 2021, 4, 1–16, doi: 10.1038/s42003-020-01585-x."

57

Genetic neurological disorder/Prion diseases

Inherited Creutzfeldt-Jakob disease

Fatal Familial Insomnia

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES OF ZN(II)-BNPYP FOR THE DEVELOPMENT OF DUAL ANTI-PRION DRUGS

Zucchelli Chiara[1], R. Chiesa[2], E. Caruso[3], J. Castilla[4], G. Musco[1], C. Zucchelli[1]

[1]Milano, Università Vita Salute San Raffaele
[2]Milano, Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS
[3]Varese, Università Dell'insubria
[4]Bizkaia, Spain, Spain, Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (CIC BioGUNE)

Project: GMR24T2028; Zucchelli Chiara

Genetic, neurodegenerative prion diseases are rare, fatal, and rapidly progressing. They are due to the prion protein (PrPC) conversion into a pathogenic form (PrPSc). Currently, there are no approved therapies. We identified Zn(II)-BnPyP porphyrin as the first molecule with potent, strain-independent, dual anti-prion activity: it binds to both PrPC domains, inhibiting PrPSc replication and reducing PrPC levels. Like many anti-prion compounds, Zn(II)-BnPyP has insufficient blood-brain-barrier permeability, limiting its therapeutic effectiveness in vivo. Neverthless, it offers a unique opportunity to understand the structural determinants for dual anti-prion activity. In our project just funded by Telethon Foundation, we will exploit NMR spectroscopy and docking methods to generate experimentally-driven structural models of Zn(II)-BnPyP in complex with both PrPC domains. As both Zn(II)-BnPyP metal and chemical groups influence its anti-prion activity, we will conduct a Structure-Activity Relationship study. We will synthesize Zn(II)-BnPyP derivatives with different metals or chemical groups and analyze them for interaction with PrPC domains (NMR titrations and Saturation Transfer Difference experiments), binding affinity (NMR/Dynamic Mass Redistribution titrations), destabilization of PrPC structure (Circular Dichroism melting experiments),

PrPC reduction in neuroglioma H4 cells, inhibition of PrPSc replication (Protein Misfolding Cyclic Amplification reactions), and anti-prion efficacy in prion-infected neuroblastoma N2a cells. Structural models of Zn(II)-BnPyP in complex with PrPC, and definition of the optimal metal and chemical groups for effective PrPC interaction and dual anti-prion activity will allow us to develop compounds with improved drug-like properties, and a more potent mechanism of action with respect to the anti-prion molecules studied so far, as they will inhibit PrPSc replication and reduce PrPC levels at the same time.

Disordini genetici neurologici/Malattie da Prioni

Malattia ereditaria di Creutzfeldt-Jakob; fCJD; CJD ereditaria;

Insonnia Familiare Fatale; FFI; IFF;

STUDI SULLA RELAZIONE TRA STRUTTURA E ATTIVITÀ DI ZN(II)-BNPYP PER LO SVILUPPO DI FARMACI ANTIPRIONICI CON DOPPIO MECCANISMO D'AZIONE

Le malattie genetiche da prioni sono rare, letali e progrediscono rapidamente. Si verificano perché la normale proteina prionica (PrPC) si trasforma in una forma dannosa (PrPSc). Attualmente, non esistono trattamenti approvati per queste malattie. Abbiamo scoperto che una molecola chiamata Zn(II)-BnPyP può combattere efficacemente le malattie da prioni attraverso un duplice meccanismo: legandosi a PrPC, blocca la formazione di PrPSc e riduce i livelli di PrPC nelle cellule. Anche se Zn(II)-BnPyP non può entrare facilmente nel cervello, cosa che limita la sua efficacia come trattamento, essa rappresenta un'opportunità preziosa per capire le caratteristiche necessarie affinché una molecola abbia un doppio effetto anti-prionico. Nel progetto in avvio finanziato da Telethon utilizzeremo tecniche avanzate come spettroscopia NMR e calcoli computazionali per creare modelli strutturali che mostrino come Zn(II)-BnPyP interagisce con PrPC. Poiché il metallo e i gruppi chimici di Zn(II)-BnPyP influenzano la sua attività anti-prione, studieremo diverse versioni di questa molecola. Realizzeremo derivati di Zn(II)-BnPyP con metalli e gruppi chimici differenti ed esamineremo come si legano a PrPC influenzandone la struttura. Valuteremo questi derivati per la loro capacità di ridurre i livelli di PrPC nelle cellule e bloccare la replicazione di PrPSc, e per la loro efficacia complessiva in modelli cellulari di malattia prionica. Grazie a questo progetto potremo identificare i migliori metalli e gruppi chimici necessari ad una molecola per legarsi efficacemente a PrPC e per avere una forte, doppia attività anti-prionica. Potremmo così sviluppare nuove molecole con proprietà simili a farmaci e un meccanismo d'azione più potente rispetto alle molecole anti-prione studiate finora.

58

Genetic neurological disorder

Aicardi-Goutières syndrome

INVESTIGATING MITOCHONDRIAL ALTERATIONS AS NOVEL THERAPEUTIC TARGETS FOR THE AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME

Kajaste Rudnitski Anna[1], **"A. Mapelli**[1], **A. Tavoni**[1], **M. Cavallo**[1], **G. Milanesi**[1], **C. Casali**[1], **M. Biggiogera**[1], **K. Lefkimmiatis**[1]

[1]*Pavia, Università Di Pavia*

Project: GMR24T1027; Kajaste-Rudnitski Anna Christina

The Aicardi-Goutières Syndrome (AGS) is a rare monogenic leukodystrophy caused by mutations in any one of ten genes encoding for proteins involved in the metabolism/processing of RNA/DNA (e.g. TREX1 and RNASEH2). Although accumulation of endogenous nucleic acids and consequent type I IFN activation are considered main drivers of pathogenesis in AGS, the precise molecular mechanisms and cell types triggering disease remain elusive primarily due to the lack of animal models recapitulating human neuropathology. We have generated human induced pluripotent stem cells (hiPSC) defective for TREX1 or RNASEH2B to study AGS pathology in cells of the human central nervous system (CNS). We observed that AGS astrocytes mediate neurotoxicity through spontaneous DNA damage associated with activation of inflammatory and DNA damage responses. Interestingly, our preliminary observations indicate that AGS astrocytes also show signs of mitochondrial alterations and aberrantly accumulate mitochondrial nucleic acids. Moreover, TREX1-deficient cells harbour fragmented mitochondria, impaired mitochondrial membrane potential and aberrant expression of mitochondrial and metabolic genes. On these premises, we hypothesize that mitochondrial defects could contribute to AGS neurotoxicity. Taking advantage of the prototypic TREX1 deficiency model of AGS, we propose here to 1) Investigate the role of TREX1 in mitochondrial homeostasis; 2) Define the role of mitochondrial alterations in AGS-neuroinflammation; 3) Target mitochondrial alterations to curtail AGS neurotoxicity. Our results will fill important knowledge gaps regarding the potential involvement of mitochondria in AGS neuroinflammation and inform the development of novel targeted therapies to prevent onset and progression of this and other deadly neurodegenerative disorders.

Disordini genetici neurologici

Sindrome di Aicardi-Goutières; AGS; Encefalopatia con calcificazione dei gangli basali; Encefalopatia con calcificazione intracranica e linfocitosi cronica del liquido cerebrospinale;

STUDIO DELLE ALTERAZIONI MITOCONDRIALI COME NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI PER LA SINDROME DI AICARDI-GOUTIÈRES

La sindrome di Aicardi-Goutières (AGS) è una rara leucodistrofia monogenica causata da mutazioni in uno qualsiasi dei dieci geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo/processamento dell'RNA/DNA (ad esempio TREX1 e RNASEH2). Sebbene l'accumulo di acidi nucleici endogeni e la conseguente attivazione dell'IFN di tipo I siano considerati i principali fattori della patogenesi dell'AGS, i precisi meccanismi molecolari e i tipi cellulari che scatenano la malattia rimangono sfuggenti, principalmente a causa della mancanza di modelli animali che ricapitolano la neuropatologia umana. Abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) difettose per TREX1 o RNASEH2B per studiare la patologia AGS nelle cellule del sistema nervoso centrale umano (SNC). Abbiamo osservato che gli astrociti AGS mediano la neurotossicità attraverso il danno spontaneo al DNA associato all'attivazione di risposte infiammatorie e al danno al DNA. È interessante notare che le nostre osservazioni preliminari indicano che gli astrociti AGS mostrano anche segni di alterazioni mitocondriali e accumulano in modo aberrante acidi nucleici mitocondriali. Inoltre, le cellule carenti di TREX1 ospitano mitocondri frammentati, potenziale di membrana mitocondriale compromesso ed espressione aberrante di geni mitocondriali e metabolici. Su queste premesse, ipotizziamo che i difetti mitocondriali potrebbero contribuire alla neurotossicità dell'AGS. Sfruttando il modello prototipico del deficit di TREX1 dell'AGS, proponiamo qui di 1) Investigare il ruolo di TREX1 nell'omeostasi mitocondriale; 2) Definire il ruolo delle alterazioni mitocondriali nella neuroinfiammazione AGS; 3) Mirare alle alterazioni mitocondriali per ridurre la neurotossicità dell'AGS. I nostri risultati colmeranno importanti lacune nella

conoscenza riguardo al potenziale coinvolgimento dei mitocondri nella neuroinfiammazione da AGS e informeranno lo sviluppo di nuove terapie.

59

Genetic neurological disorder

Autosomal recessive primary microcephaly

TARGETING OLIGODENDROGLIA TO SUSTAIN BRAIN DEVELOPMENT IN PRIMARY AUTOSOMAL RECESSIVE MICROCEPHALY 17 (MCPH17) MODELS

Boda Enrica[1], M. Khastkhodaei Ardakani[1], M. Bonato[1], N. Di Cintio[1], A. Incerti Tinterri[1], M. Felline[1], A. Renna[2], F. Di Cunto[1], B. Sacchetti[2], F. Ferrini[2], A. Buffo[1]

[1]Orbassano (TO), Istituto Di Neuroscienze Cavalieri Ottolenghi"
[2]Torino, Università Di Torino

Project: GMR22T1066; Boda Enrica

Primary autosomal recessive microcephaly-17 (MCPH17) is caused by mutations in CIT, encoding for Citron Kinase (CIT-K), a serine-threonine kinase involved in DNA repair and cytoskeletal dynamics. MCPH17 patients display microcephaly, simplified gyrification, seizures, cognitive and motor deficits, and - in case of CIT truncating mutations - neonatal mortality. Cit-k KO mice recapitulate the main features of MCPH17, including epilepsy and early mortality. Besides neuronal defects, both MCPH17 patients and Cit-k KO mice show a severe CNS hypomyelination and reduction of oligodendroglial cells. Hypomyelination, oligodendrocyte apoptosis and senescence were also found in conditional mutant mice where Cit-k was deleted only in oligodendroglia, in line with a cell-intrinsic role of Cit-k loss in producing oligodendrocyte alterations.

In the frame of the Telethon project, we found that hypomyelination and oligodendroglial defects contribute per se (i.e. independently of neuronal defects) to some aspects of pathology (i.e. perinatal susceptibility to epileptic seizures and cognitive impairment at later stages). Thus, we tested the hypothesis that restoring oligodendroglia may positively impact on the neuronal/circuit development and on the functional outcome of Cit-k KO MCPH17 mouse model. Pharmacological and cell-based interventions aimed at restoring oligodendroglia resulted in a reduced epileptic phenotype, better motor performances along with a partial rescue of the cortical inhibitory neurotransmission and upregulation of markers indicative of interneuron maturation. In case of oligodendroglial cell transplantation, Cit-k KO mouse lifespan was also remarkably increased. Thus, although in MCPH17 glial cell dysfunctions have been mostly neglected, our data show that targeting oligodendroglia – although not correcting microcephaly - is an effective option to sustain brain development and ultimately ameliorate the functional phenotype of the animal model of the disease.

Disordini genetici neurologici

Microcefalia primitiva autosomica recessiva; MPCH; Microcefalia vera;

CORREGGERE LE DISFUNZIONI DELL'OLIGODENDROGLIA PER SOSTENERE LO SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE IN MODELLI DI MICROCEFALIA AUTOSOMICA RECESSIVA PRIMARIA 17 (MCPH17)

La microcefalia autosomica recessiva primaria-17 (MCPH17) è causata da mutazioni in CIT, che codifica per la Citron Kinase (CIT-K), una serina-treonina chinasi coinvolta nella riparazione del DNA e nella dinamica del citoscheletro. I pazienti MCPH17 presentano microcefalia, girificazione semplificata, crisi epilettiche, deficit cognitivi e motori e, in caso di mutazioni troncanti di CIT, mortalità neonatale. I topi Cit-k KO ricapitolano le principali caratteristiche della MCPH17. Oltre ai difetti neuronali, i pazienti MCPH17 e i topi Cit-k KO mostrano una grave ipomielinizzazione del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e una riduzione delle cellule oligodendrogliali. Ipomielinizzazione e difetti degli oligodendrociti sono presenti anche in topi condizionali in cui Cit-k è deletata solo nell'oligodendroglia, in linea con un ruolo cell-intrinsic di Cit-k nella biologia degli oligodendrociti.

Nell'ambito del progetto Telethon abbiamo scoperto che l'ipomielinizzazione e i difetti oligodendrogliali contribuiscono di per sé (cioè indipendentemente dai difetti neuronali) ad alcuni aspetti della patologia, i.e. suscettibilità perinatale alle crisi epilettiche e deterioramento cognitivo. Abbiamo quindi testato l'ipotesi che il recupero dell'oligodendroglia possa avere un impatto positivo sullo sviluppo dei circuiti e sul fenotipo del modello animale di MCPH17. Approcci farmacologici e di trapianto volti a ripristinare l'oligodendroglia portano ad un miglioramento del fenotipo epilettico e delle prestazioni motorie e ad un parziale recupero della neurotrasmissione inibitoria corticale. Nel caso del trapianto di oligodendrociti, la durata della vita del topo Cit-k KO è anche significativamente aumentata. In conclusione, sebbene nella MCPH17 le disfunzioni delle cellule gliali siano state trascurate, i nostri dati mostrano che correggere l'oligodendroglia è un'opzione efficace per sostenere lo sviluppo del SNC e migliorare il fenotipo funzionale del modello animale della malattia

60

Genetic neurological disorder

Childhood absence epilepsy

Familial paroxysmal ataxia

NEW GENOME EDITING STRATEGIES FOR EPISODIC ATAXIA AND ABSENCE EPILEPSY: OPTIMIZING SPLICE ISOFORMS FOR ENHANCED CALCIUM CHANNEL FUNCTION

Jaudon Fanny[1], A. Ragnini[1], I. Musante[2], R. Ruggeri[1], S. Riccardi[1],P. Scudieri[2], L. Muzzi[2], F. Guida[2], F. Zara[2], L.A. Cingolani[1]

[1]Trieste, Università Di Trieste
[2]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS

Project: GJC22053; Cingolani Lorenzo, Scudieri Paolo

In this study, we address CACNA1A loss-of-function mutations, which cause several neurological disorders, including episodic ataxia type 2 and absence epilepsy, by modulating the expression of splice variants from the related gene CACNA1B. We demonstrate the effectiveness of this strategy in both human iPSC-derived neurons and Cacna1a-deficient mice. Loss of CACNA1A, which encodes the CaV2.1 P/Q-type calcium channel, leads to increased expression of CACNA1B, which encodes the CaV2.2 N-type calcium channel. However, despite this compensation, the neurological symptoms associated with

CaV2.1 loss-of-function persist, in part because CaV2.2 is less efficient at supporting neuronal communication than CaV2.1. Our research has demonstrated that the ability of these channels to facilitate neuronal communication is regulated by a conserved splicing event that generates two major isoforms, EFa and EFb, for both channels. Notably, in the brain, only CaV2.1 maintains sufficiently high levels of the more effective isoform, EFa, for optimal neuronal function. We hypothesized that increasing the levels of the EFa isoform of CaV2.2 could compensate for CaV2.1 deficiency. To achieve this, we have developed a CRISPR/Cas9-based gene-editing strategy to regulate the expression of these splice variants. Our results demonstrate that enhancing the levels of the EFa isoform of CaV2.2 rescues electrophysiological defects in human iPSC-derived neurons with CACNA1A mutations, as well as restores neuronal communication, corrects motor deficits and resolves absence epilepsy in CaV2.1-deficient mice. Importantly, by focusing on the upregulation of CaV2.2, our strategy has the potential to counteract the effects of a wide range of CaV2.1 mutations.

Disordini genetici neurologici

Epilessia con assenze dell'infanzia (CAE)

Atassia parossistica Familiare; Atassia episodica, tipo 2;

NUOVE STRATEGIE DI EDITING GENOMICO PER L'ATASSIA EPISODICA E L'EPILESSIA CON ASSENZA: OTTIMIZZAZIONE DELLE ISOFORME DI SPLICING PER UNA MIGLIORE FUNZIONALITÀ DEI CANALI DEL CALCIO

In questo studio affrontiamo le mutazioni loss-of-function di CACNA1A, responsabili di diverse patologie neurologiche, tra cui l'atassia episodica di tipo 2 e l'epilessia con assenza, modulando l'espressione delle varianti di splicing del gene correlato CACNA1B. Dimostriamo l'efficacia di questa strategia sia nei neuroni derivati da iPSC umane che in topi deficienti di Cacna1a. La perdita di CACNA1A, che codifica per il canale del calcio di tipo P/Q CaV2.1, porta a un aumento dell'espressione di CACNA1B, che codifica per il canale del calcio di tipo N CaV2.2. Tuttavia, nonostante questa compensazione, i sintomi neurologici associati alla perdita di funzione di CaV2.1 persistono, in parte perché CaV2.2 è meno efficiente nel supportare la comunicazione neuronale rispetto a CaV2.1. La nostra ricerca ha dimostrato che la capacità di questi canali di facilitare la comunicazione neuronale è regolata da un evento di splicing conservato che genera due principali isoforme, EFa ed EFb, per entrambi i canali. In particolare, nel cervello, solo CaV2.1 mantiene livelli sufficientemente elevati dell'isoforma più efficace, EFa, per un funzionamento neuronale ottimale. Abbiamo ipotizzato che l'aumento dei livelli dell'isoforma EFa di CaV2.2 potesse compensare la carenza di CaV2.1. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo sviluppato una strategia di editing genetico basata su CRISPR/Cas9 per regolare l'espressione di queste varianti di splicing. I nostri risultati dimostrano che l'incremento dei livelli dell'isoforma EFa di CaV2.2 corregge i difetti elettrofisiologici nei neuroni derivati da iPSC umane con mutazioni in CACNA1A, ripristina la comunicazione neuronale, corregge i deficit motori e risolve l'epilessia con assenza nei topi deficienti di CaV2.1. È importante sottolineare che, concentrandosi sull'upregolazione di CaV2.2, la nostra strategia ha il potenziale per contrastare gli effetti di un'ampia gamma di mutazioni di CaV2.1.

61

Genetic neurological disorder

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE)

IN VIVO INVESTIGATION OF NEW DISEASE-CAUSING VARIANTS AND PATHOGENIC MECHANISMS UNDERLYING A RECENTLY IDENTIFIED NEURODEVELOPMENTAL DISEASE CAUSED BY IMPAIRED GOLGI DYNAMICS (GOLGIPATHY)

Lauri Antonella Lauri[1], **"G. Fasano**[1]**, C. Pedalino**[1]**, M. Tartaglia**[1]

[1]*Rome, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS"*

Project: GMR23T1168; Lauri Antonella

Rare encephalopathies affect brain development and function in a variable manner, showing different types of brain malformations, often associated to refractory epilepsy and a different level of cognitive impairment. Despite patients sequencing rapidly identifies candidate disease genes and variants, functional analysis and investigation of the disease mechanisms is fundamental to obtain accurate diagnosis, classify correctly these conditions and offer precise consuling. Recently, by combining clinical data and in vivo zebrafish investigation, we addressed the impact of rare de novo mutations affecting the small GTPase ARF3 of the RAS superfamily and causing a new form of encephalopathy with microcephaly, epilepsy and skeletal abnormalities in severe cases. So far, our pilot study demonstrated a differential impact of ARF3 gene variants on Golgi architecture and vesicle assembly, predicting microcephaly onset and severity. Here, we show preliminary results of our recently funded Telethon project "ZErareBRAL" with respect to: 1. expanding in vivo functional validation of new ARF3 variants, supporting a key role of dominant mutations in the disease etiology and expanding the genotype-phenotype correlation; 2. early impact of the most severe microcephaly-associated ARF mutations causing Golgi disruption in terms of regionalization and differentiation defects during brain development. In addition, 3. our work correlates the morphological defects to an altered susceptibility to epileptogenic discharges, assessed by functional behavioral assays and 4. start to unravel potential molecular biomarkers. Altogether, the data provide the first evidence of direct neurofunctional impact of Golgi insult and dysregulated trafficking caused by disease-causing ARF mutant proteins on brain formation and circuits in vivo.

Disordini genetici neurologici

Encefalopatia epilettica e dello sviluppo

INDAGINE IN VIVO DI NUOVE VARIANTI E DEL MECCANISMO PATOGENETICO ALLA BASE DI UNA MALATTIA DEL NEUROSVILUPPO CAUSATA DA ALTERAZIONI DEL GOLGI (GOLGIPATIA) RECENTEMENTE IDENTIFICATA

Sebbene il sequenziamento genetico dei pazienti abbia rivoluzionato la diagnosi di malformazioni cerebrali con caratteristiche cliniche variabili (da microcefalia con epilessia a deficit cognitivo) e permetta ora di identificare rapidamente geni e varianti candidate, l'analisi funzionale delle varianti e lo studio dei meccanismi patologici, preferibilmente in un modello in vivo, sono fondamentali per ottenere una diagnosi accurata e classificare correttamente queste condizioni, stratificando i pazienti. Recentemente, grazie ad un approccio interdisciplinare e l'impiego funzionale del modello zebrafish, il nostro team ha identificato mutazioni nel nuovo "gene malattia" ARF3, che codifica una piccola GTPasi del Golgi della superfamiglia RAS, come causative di una nuova forma di encefalopatia che presenta microcefalia ed epilessia nelle forme più gravi. Finora,lo studio ha dimostrato un impatto differenziale delle varianti sull' integrità del Golgi e l' assemblaggio delle vescicole, prevedendo l'insorgenza e la gravità della microcefalia. Lo studio ha gettato le basi per un'analisi di correlazione genotipo-fenotipo

che serve a migliorare la diagnosi differenziale e la consulenza genetica. Qui presentiamo i risultati preliminari del progetto Telethon "ZErareBRAL" nel modello malattia zebrafish, riguardanti: 1. l'approfondimento della validazione funzionale in vivo di nuove varianti non pubblicate, che supporta il ruolo chiave delle mutazioni dominanti nell'eziologia della malattia ed espande la correlazione genotipo-fenotipo; 2. l'impatto precoce delle mutazioni più gravi sullo sviluppo cerebrale; 3. la correlazione tra i difetti morfologici e una maggiore suscettibilità ad eventi epilettici, e 4. Indagini molecolari pilota verso l'identificazione di biomarcatori molecolari. I dati raccolti finora forniscono la prima evidenza dell' impatto neurofunzionale causato dal danno al Golgi e del traffico cellulare dovuto a mutazioni in ARF3.

62

Genetic neurological disorder

FOXG1 syndrome

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

G. Liuzzi[1], E.S. Maftei[1], L. Rigoldi[1], A. Mallamaci[1]

[1]Trieste, Scuola Internazionale Superiore Di Studi Avanzati (Sissa)

Project: GMR22T2018; Mallamaci Antonello

Aim of this project is to develop small RNA-like effectors able to correct neuropathogenic Foxg1/FOXG1 activity levels, by a concerted impact on gene transcription and translation. We tested disiRNA-like analogs of our artificial miRNA.aFoxg1.1690 and .1694, as tools to elicit gentle down- and up-regulation of Foxg1. The tests were run in murine, wild type pallial cultures, as well as in intravenously injected mice, heterozygous for a Foxg1-null mutation. Both molecules elicited the intended mRNA modulation. However, in case of .1694, such outcome did not translate into a consistent protein upregulation, likely due to a negative impact of disiRNA architecture on translation. This suggested us to revert back to genetically encoded variants of these effectors, encoded by lentiviruses and BBB-permeant AAVs. Next, we generated pallial neuro-organoids from human iPSCs/ESCs heterozygous for G224S- or W308X-FOXG1 (acting in murine pallial precursors as gain- and loss-of-functions alleles), and, starting from them, we set 2D-preparations, where we evaluated the impact of the corresponding FOXG1 mutations on neuronogenic progression and electrical neuronal activity. Meanwhile, on "healthy" controls of these preparations, we assayed the capability of g miRNA. aFoxg1.1690 and .1694 to down- and up-regulate FOXG1, respectively. Finally, we tested the capability of small LNAs targeting (1) specific miRNA-REs located in Foxg1/FOXG1-mRNA 3'UTR, as well as (2) the Foxg1/FOXG1-uorf, to increase translation of the main-orf, in primary cultures of murine pallial precursors. We identified a potential hit among the former, currently under specificity assessment. As for the latter, we did not get consistent results. To fix such issue, we replaced our LNA effectors with their morpholino counterparts. Moreover, as a further backup strategy, we are trying to stimulate Foxg1/FOXG1 translation by genetically encoded taRNAs."

Disordini genetici neurologici

Sindrome FOXG1; Encefalopatia epilettica correlata a FOXG1; Encefalopatia epilettica discinetica correlata a FOXG1;

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.

Scopo di questo progetto è lo sviluppo di piccoli effettori ad architettura RNA-simile, capaci di correggere livelli di attività neuropatogenici del gene Foxg1/FOXG1 tramite un impatto concertato su trascrizione e traduzione. Abbiamo testato analoghi tipo disiRNA dei nostri miRNA artificiali aFoxg1.1690 e .1694, quali strumenti per sotto- e sovra-regolare gentilmente Foxg1. Le prove sono state condotte in colture palliali murine e topi eterozigoti per una mutazione Foxg1-null, iniettati per via endovenosa. Entrambe le molecole hanno funzionato come desiderato. Tuttavia, nel caso di .1694, ciò non ha portato ad un consistente incremento della proteina, probabilmente a causa dell'impatto negativo della architettura a disiRNA sulla traduzione, Ciò ci ha suggerito di tornare a varianti geneticamente codificate di tali effettori. Successivamente abbiamo generato neuro-organoidi palliali da iPSCs/ESCs umane eterozigoti per G224S- o W308X-FOXG1 (attivi in precursori palliali murini quali alleli guadagno- e perdita-di-funzione) e, partendo da loro, abbiamo allestito preparazioni 2D. Su queste abbiamo valutato l'impatto delle corrispondenti mutazioni su neuronogenesi e attività neuronale. Su controlli "sani" di tali preparazioni abbiamo altresì valutato la capacità di miRNA.aFoxg1.1690 e .1694 di sotto- e sovra-regolare FOXG1. Infine, in colture primarie di precursori palliali murini, abbiamo valutato l'abilità di piccoli LNA, diretti contro (1) miRNA-RE situati nel 3'UTR di Foxg1-mRNA o (2) contro la sua uorf, di promuovere la traduzione della orf principale. Abbiamo trovato un candidato promettente fra i primi, al momento in corso di validazione per specificità. I secondi non ci hanno dato risultati consistenti. Per risolvere questo probelma, abbiamo rimpiazzato i nostri LNA con controparti tipo morfolino. In più, quale ulteriore strategia di supporto, stiamo provando a stimolare la traduzione di Foxg1/FOXG1 con taRNA geneticamente codificati.

63

Genetic neurological disorder

FOXG1 syndrome

NEURONAL ACTIVITY CONTROL BY PRODUCTS OF FOXG1-RESPONSIVE, TDARK RNF GENES

C. Sgherza[1], M.C. Tuccillo[1], A. Mallamaci[1]

[1]Trieste, Scuola Internazionale Superiore Di Studi Avanzati (Sissa)

Project: GJC22062; Mallamaci Antonello

FOXG1 masters telencephalic development and tunes maturation and activity of neocortical neurons. Heterozygosity for a variety of mutations involving this transcription factor gene leads to FOXG1 syndrome, a complex and rare disease including epilepsy, ASD symptoms and severe neurocognitive impairment. Tdark genes include dozens of Rnfs, encoding for presumptive E3 ubiquitin ligases, among which 14 responding to experimental Foxg1 manipulation in neocortical neurons, and 2 encoding for presumptive FOXG1 interactors. Protein products of such Rnf genes interact with transcription factors, ion channels, plasmamembrane receptors and intracellular signal transducers. Their mRNAs often respond in a few hours to experimental stimulation of neocortical neurons. Based on that, we predicted they contribute to mediate the documented interplay between Foxg1 and neuronal activity.

To test this prediction, we (1) individually knocked-down and, alternatively, upregulated all these Tdark genes (as well as Foxg1) in primary cultures of murine pallial precursors, (2) profiled the corresponding proteomes by the SomaScan platform, and (3) we have been comparing the dynamics of activity-linked proteins in these preparations. Next, to corroborate inferences emerging from these comparisons, we are investigating the impact of selected Tdark-Rnf genes on electrical activity of murine pallial neurons, by a pSyn-driven GCaMP6 Ca2+ sensor delivered via lentiviral transgenesis. Finally, to detail key molecular events driven by Tdark-RNF proteins, we are further evaluating the impact of their modulation on the half-life of selected, presumptive targets of their action. We expect that this study may confirm the emerging scenario of a transcription factor (Foxg1) exerting a temporally structured, multilevel control on a number of activity-related genes and suggest novel targets for pharmacological mitigation of FOXG1 syndrome.

Disordini genetici neurologici

Sindrome FOXG1; Encefalopatia epilettica correlata a FOXG1; Encefalopatia epilettica discinetica correlata a FOXG1;

CONTROLLO DELLA ATTIVITÀ NEURONALE DA PARTE DEI PRODOTTI DEI GENI TDARK RNF RESPONSIVI A FOXG1

FOXG1 governa lo sviluppo telencefalico e regola maturazione ed attività dei neuroni neocorticali. Mutazioni a suo carico portano alla sindrome di FOXG1, una complessa malattia rara con epilessia, tratti autistici e severa compromissione cognitiva. Fra i geni Tdark si annoverano decine di Rnf putativamente codificanti per E3 ubiquitina-ligasi, fra i quali 14 responsivi a manipolazione di Foxg1 in neuroni neocorticali e 2 codificanti per interattori presuntivi di FOXG1. I prodotti proteici di tali geni Rnf interagiscono con fattori di trascrizione, canali ionici, recettori di membrna e trasduttori di segnale intracellulari. I loro mRNA spesso rispondono in poche ore alla stimolazione sperimentale dei neuroni neocorticali. Sulla base di ciò, ipotizziamo ch'essi possano co-mediare il documentato e complesso intergioco avente luogo fra Foxg1 ed attività elettrica neuronale. Per testare tale predizione, abbiamo attenuato e, alternativamente, sovraespresso ognuno di tali geni Tdark (come pure Foxg1) in colture primarie di precursori palliali murini, (2) abbiamo profilato con tecnologia SomaScan i corrispondenti proteomi, e (3) stiamo al momento comparando le dinamiche di specifiche proteine connesse all'attività neuronale in tali preparazioni. Inoltre, per corroborare le inferenze emergenti da tali comparazioni, stiamo investigando tramite un sensore GCaMP6 l'impatto di alcuni di tali geni Tdark-Rnf sulla attività elettrica dei neuroni murini neocorticali. Infine, per dettagliare il meccanismo di azione delle proteine Tdark-RNF, stiamo ulteriormente valutando l'impatto della loro modulazione sul tempo di dimezzamento di bersagli presuntivi della loro azione. Ci aspettiamo che tale studio possa confermare lo scenario emergente di un fattore di trascrizione (Foxg1) capace di eseguire un controllo temporalmente strutturato su una molteplicità di geni relati alla attività elettrica, nonchè suggerire nuovi bersagli per la mitigazione farmacologica della sindrome di FOXG1.

64

Genetic neurological disorder

IRF2BPL-related regressive neurodevelopmental disorder-dystonia-seizures syndrome

MECHANISMS AND THERAPEUTIC TARGETS OF NEDAMSS, A NOVEL REGRESSIVE NEURODEVELOPMENTAL SYNDROME

M. Dell'Oca[1], A. Conforti[1] , S. Boggio Bozzo[1], S. Vaglietti[1], C. Marchetti[1], C. Di Luca[2], P. Munarin[2], M. Nicoli[2], R. Indellicato[2], A. Iannielli[2], A. Loffreda[2], V. Berno[2], M. Ghirardi[1], S. Roatta[1], L. Colnaghi[2], F. Fiumara[1]

[1]Torino, Università Di Torino
[2]Milano, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GJC22078; Fiumara Ferdinando, Colnaghi Luca

The genetic basis of >1700 rare neurological disorders is still unclear and the function of many of the genes related to these disorders is not well characterized, which hampers the development of specific therapies. In the spirit of the Cariplo-Telethon Alliance call, this project aims to reduce this knowledge gap by focusing on NEDAMSS a rare, regressive neurodevelopmental disorder characterized by motor impairment, speech loss, and seizures, to define its molecular mechanisms and identify therapeutic targets. The disease is caused by mutations in a gene encoding the IRF2BPL protein, whose structure, function, and regulation are still not well characterized. Moreover, the mechanisms by which mutations in this gene cause disease are still unclear. This research, through a combination of multiple molecular and cellular approaches, including the use of human neurons carrying NEDAMSS mutations derived from stem cells, has two main aims. First, it aims at clarifying the structure and function of the IRF2BPL protein, identifying regulatory mechanisms of its function related to a process called SUMOylation, which may represent a promising pharmacological target for NEDAMSS. Second, it aims at defining the effects of NEDAMSS-related mutations on the structure and function of the protein, and how SUMOylation-regulating drugs may limit these negative effects. Overall, the results of this research will illuminate the molecular mechanisms underlying IRF2BPL-related NEDAMSS, with the potential to identify novel therapeutic targets and drugs for NEDAMSS, a disease that currently has no effective treatment.

Disordini genetici neurologici

Sindrome da regressione del neurosviluppo, distonia e crisi epilettiche correlata a IRF2BPL; NEDAMSS;

MECCANISMI E BERSAGLI TERAPEUTICI DI NEDAMSS, UNA SINDROME DEL NEUROSVILUPPO CON REGRESSIONE

La base genetica di >1700 malattie neurologiche rare è ancora poco chiara e la funzione di molti dei geni correlati a questi disturbi non è ben caratterizzata, il che ostacola lo sviluppo di terapie specifiche. Nello spirito del bando Cariplo-Telethon Alliance, questo progetto mira a colmare questa lacuna nelle nostre conoscenze concentrandosi sul NEDAMSS, un disturbo dello sviluppo neurologico regressivo raro. caratterizzato da compromissione motoria, perdita del linguaggio e convulsioni, allo scopo di definirne meccanismi molecolari e identificare bersagli terapeutici. La malattia è causata da mutazioni in un gene che codifica per la proteina IRF2BPL, la cui struttura, funzione e regolazione non sono ancora ben caratterizzate. Inoltre, non sono ancora chiari i meccanismi attraverso i quali le mutazioni in questo gene causano la malattia. Questa ricerca, attraverso una combinazione di molteplici approcci molecolari e cellulari, incluso l'impiego di neuroni umani recanti mutazioni NEDAMSS derivati da cellule staminali, ha due obiettivi principali. In primo luogo, mira a chiarire la struttura e la funzione della proteina IRF2BPL, identificando i meccanismi regolatori della sua funzione legati a un processo chiamato SUMOilazione, che potrebbe rappresentare un promettente bersaglio farmacologico per NEDAMSS. In secondo luogo, mira a definire gli effetti delle mutazioni correlate a NEDAMSS sulla struttura e sulla funzione della proteina, e di come molecole in grado di regolare la SUMOilaazione possano limitare questi effetti negativi. Nel complesso, i risultati

di questa ricerca illumineranno i meccanismi molecolari alla base del NEDAMSS correlato a IRF2BPL, portando potenzialmente a identificare nuovi bersagli terapeutici e composti farmacologici utili per NEDAMSS, una malattia che attualmente non ha alcun trattamento efficace.

65

Genetic neurological disorder

Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome

MODELING PIGA DEFICIENCY IN ZEBRAFISH

Gnutti Barbara[1], **D. Finazzi**[1]

[1] *Brescia, Università Degli Studi Di Brescia*

Project: GSA23A001; Finazzi Dario

Germline mutations in the Phosphatidyl Inositol Glycan A (PIGA) gene, encoding a protein crucial for the first step of GPI moiety synthesis, result in a severe neurodevelopmental disorder known as Multiple Congenital Anomalies-Hypotonia-seizures Syndrome 2 (MCAHS2), characterized by delayed psychomotor development, epilepsy, dysmorphism and congenital anomalies. To investigate the molecular determinants of MCAHS2 during embryonic development and adulthood, we generated zebrafish models with piga deficiency. Analysis of piga gene expression in wild-type embryos, using qRT-PCR, revealed the presence of the gene transcript from 4 hours post-fertilization (hpf). The phenotypic analysis of embryos and larvae with genome editing-induced abrogation of piga gene (crispants) showed a significant increase in mortality rate, reduction in piga transcript, and developmental delay compared to control. Crispants displayed morphological alteration, including reduced body length, jaw protrusion, eye and heart defects. Some morphological features (e.g., mandibular protrusion and ocular defects) recapitulate the clinical phenotype. To further assess the effects of piga downregulation, crispants obtained in different transgenic lines were analyzed. The most evident differences were detected in the Tg(neurod1:EGFP) reporter line, where the GFP signal showed distribution differences between controls and crispants, indicative of a perturbation of neuronal precursor cells differentiation/maturation. The characterization of stable piga mutant lines is ongoing, together with the generation of lines carrying humanized mutations, hopefully showing less severe phenotype and longer lifespan.

Disordini genetici neurologici

Sindrome da anomalie congenite multiple, ipotonia, crisi epilettiche; MCAHS;

GENERAZIONE DI UN MODELLO ZEBRAFISH CON DEFICIT DEL GENE PIGA

Le mutazioni germinali nel gene Phosphatidyl Inositol Glycan A (PIGA), che codifica per una proteina essenziale nel primo step della sintesi delle ancore GPI, causano una grave patologia del neurosviluppo nota come Sindrome delle Anomalie Congenite Multiple-Ipotonia-Convulsioni 2 (MCAHS2), caratterizzata da ritardo psicomotorio, epilessia, dismorfismi e anomalie congenite. Per studiare i determinanti molecolari della MCAHS2 durante lo sviluppo embrionale e in età adulta, abbiamo generato modelli di zebrafish con deficit del gene piga. L'analisi dell'espressione genica in animali wild-type, tramite qRT-PCR, ha rivelato la presenza del trascritto già a 4 ore dopo la fecondazione. L'analisi fenotipica di embrioni e larve con mutazioni del gene piga, ottenuta tramite modifica del genoma (crispanti), ha evidenziato aumento della mortalità, riduzione del trascritto di piga e ritardo nello sviluppo rispetto ai controlli. I crispanti hanno mostrato alterazioni morfologiche, tra cui riduzione della lunghezza corporea, protrusione mandibolare, difetti oculari e cardiaci. Alcune caratteristiche (come la protrusione mandibolare e le anomalie oculari) riflettono il fenotipo clinico della sindrome. Per approfondire gli effetti della ridotta espressione di piga, sono state analizzate linee transgeniche con mutazioni del gene piga. Le differenze più evidenti sono state osservate nella linea Tg(neurod1:EGFP), in cui il segnale GFP ha mostrato alterazioni di distribuzione rispetto ai controlli, suggerendo una perturbazione nella differenziazione/maturazione delle cellule progenitrici neuronali. La caratterizzazione di linee mutanti stabili per il gene piga è in corso, così come la generazione di linee con mutazioni umanizzate, che si spera mostrino un fenotipo meno grave e una maggiore sopravvivenza.

66

Genetic neurological disorder

Nasu-Hakola disease

MICROGLIAL NHD TREM2 GENE CONTROLS NEURONAL METABOLISM AND SYNAPSES DURING DEVELOPMENT.

Tagliatti Erica[1]
G. Desiato[1], **S. Mancinelli**[1], **M. Bizzotto**[1], **R. Morini**[1], **S. Lodato**[1], **M. Matteoli**[1]
[1]*Milan, Humanitas Research Hospital*

Project: GGP20030; Matteoli Michela

Nasu–Hakola disease (NHD) is a genetic disorder characterized by progressive presenile dementia and bone cysts. This disease manifests during adolescence with personality changes and is caused by genetic mutations of the Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2), an immunoglobulin-like receptor, which is exclusively expressed by microglia cells in the brain and strongly controls microglia functions. How Trem2 signalling contributes to neuronal development and synaptic maturation, however, is still unknown. Here, we characterized the role of the NHD gene TREM2 in shaping neuronal development. At postnatal day 1, scRNA sequencing and differential gene expression analysis revealed a significant difference in the transcriptional footprints of maturing hippocampal excitatory neurons. Pathways enrichment analysis revealed a pervasive deregulation of mitochondrial metabolism and synaptogenesis processes in neuronal cells committed to specific regional fates. Immunohistochemistry staining and real-time OCR measurements confirmed a reduction in mitochondrial mass and function in Trem2 KO hippocampi, and inferring trajectory topology and pseudotime analysis highlighted a delayed maturation of CA1 TREM2 KO neurons. Analysis of microglia density and morphology indicated that, despite no difference in cell density, P1 Trem2 KO microglia showed a higher number of ramifications and a higher expression of the homeostatic receptor P2yr12 in the CA1 region of the hippocampus. At later developmental stages, mature Trem2 KO CA1 pyramidal neurons maintained structural and functional alterations in mitochondria. These metabolic alterations were also accompanied by morphological alterations of CA1 synapses, as well as an increase in CA1 network activity. Taken together, these results indicate that, during early developmental windows, the NHD

causative gene Trem2 plays a critical role in controlling key events in neuronal maturation in a region-specific manner.

Disordini genetici neurologici

Malattia di Nasu-Hakola; NHD; Osteodisplasia lipomembranosa policistica con leucoencefalopatia sclerosante; PLOSL; PLO-SL;

IL GENE MICROGLIALE TREM2 ASSOCIATO AL NASU-HAKOLA DISEASE CONTROLLA IL METABOLISMO NEURONALE E LA SINAPTOGENESI DURANTE IL NEUROSVILUPPO

La malattia di Nasu-Hakola (NHD) è un disturbo genetico caratterizzato da demenza presenile progressiva e cisti ossee. Questa malattia si manifesta durante l'adolescenza con cambiamenti di personalità ed è causata da mutazioni genetiche del recettore Triggering espresso sulle cellule mieloidi 2 (TREM2), un recettore simile alle immunoglobuline, che è espresso esclusivamente dalle cellule della microglia nel cervello e controlla fortemente le funzioni della microglia. Tuttavia, non è ancora noto come la segnalazione di Trem2 contribuisca allo sviluppo neuronale e alla maturazione sinaptica. Qui, abbiamo caratterizzato il ruolo del gene NHD TREM2 nel modellare lo sviluppo neuronale. Al giorno 1 postnatale, il sequenziamento di scRNA e l'analisi dell'espressione genica differenziale hanno rivelato una differenza significativa nelle impronte trascrizionali dei neuroni eccitatori ippocampali in maturazione. L'analisi trascrizionale ha rivelato una deregolamentazione pervasiva del metabolismo mitocondriale e dei processi di sinaptogenesi nelle cellule neuronali impegnate in specifici destini regionali. L'analisi della morfologia della microglia ha indicato che, la microglia postnatale Trem2 KO mostra un numero maggiore di ramificazioni e una maggiore espressione del recettore omeostatico P2yr12 nella regione CA1 dell'ippocampo. Nelle fasi di sviluppo successive, i neuroni piramidali maturi Trem2 KO della regione CA1 dell'ippocampo mantengono alterazioni strutturali e funzionali nei mitocondri. Queste alterazioni metaboliche sono anche accompagnate da alterazioni morfologiche delle sinapsi CA1, nonché da un aumento dell'attività della rete del CA1. Presi insieme, questi risultati indicano che, durante le prime finestre di sviluppo, il gene causativo NHD Trem2 svolge un ruolo critico nel controllo di eventi chiave nella maturazione neuronale di regioni specifiche dell'ippocampo.

67

Genetic neurological disorder

Neuroocular syndrome

DISSECTING THE FUNCTION OF PRR12 AND ITS ROLE IN NEUROOCULAR SYNDROME THROUGH A MULTI-OMIC APPROACH

M. Santulli[1], A. Meschiari[1], F. Piccinini[1], E. Bacchelli[1], E. Maestrini[1],G. Milazzo[1], F. Chemello[1], G. Perini[1]

[1] Bologna, Università di Bologna

Project: GJC23067; Perini Giovanni

Neuroocular syndrome-1 (NOC1) is a rare genetic disorder identified in about 30 patients, characterized by neurodevelopmental impairments, often accompanied by variable structural eye defects. It is caused by heterozygous mutations in the PRR12 gene, which encodes a putative DNA-binding protein enriched in proline-rich regions. Although little is known about PRR12, recent findings suggest its involvement in cohesin complex regulation and genome integrity. This project aims to investigate the molecular mechanisms of PRR12 and its clinical relevance. We are studying how loss-of-function variants affect PRR12 expression and exploring genotype-phenotype correlations, particularly given the marked clinical heterogeneity in NOC1 patients. To support this effort, we have established collaborations with seven clinical centers providing patient data and, when available, blood samples. Since PRR12 is expressed in early brain development, neuronal tumor cell lines offer a relevant in vitro model. Among those tested, neuroblastoma cells showed the highest PRR12 expression at both RNA and protein levels. Using CRISPR/Cas9 genome editing, we introduced random frameshift mutations at different sites within the PRR12 coding sequence, generating heterozygous and homozygous knockout SK-N-AS neuroblastoma cells. Preliminary results indicate that PRR12-deficient cells exhibit reduced survival, altered morphology, and disrupted cell cycle progression. To develop a more physiologically relevant system, we will use human induced pluripotent stem cells carrying PRR12 patient mutations. These cells will be differentiated into neuronal lineages and studied alongside neuroblastoma cells to better understand PRR12's role in neuronal development. This integrated approach, combining clinical data with advanced in vitro models, is expected to provide crucial insights into NOC1 pathology and may open new avenues for targeted therapeutic interventions.

Disordini genetici neurologici

Sindrome neuro-oculare

DISSEZIONE FUNZIONALE DEL GENE PRR12 E DEL SUO RUOLO NELLA SINDROME NEUROOCULARE MEDIANTE UN APPROCCIO MULTIOMICO

La sindrome neuro-oculare di tipo 1 (NOC1) è una rara malattia genetica descritta in circa 30 pazienti. È caratterizzata da disturbi dello sviluppo neurologico e difetti oculari di gravità variabile. È causata da mutazioni dominanti nel gene PRR12, che codifica una proteina potenzialmente in grado di legare il DNA, ricca di regioni proline-rich. PRR12 è poco studiato ed è per questo classificato come "T-dark", sebbene recenti ricerche suggeriscono un suo ruolo nella stabilità genomica e nella funzione delle coesine. Il progetto studia i meccanismi molecolari di PRR12 e la sua relazione con NOC1, analizzando l'impatto delle mutazioni e correlando le varianti genetiche ai sintomi clinici, viste le diverse manifestazioni nei pazienti. Il progetto è anche arricchito dalla collaborazione con sette centri clinici che ci forniscono dati e campioni di sangue da pazienti affetti dalla malattia. Poiché PRR12 è attivo nelle prime fasi dello sviluppo cerebrale, abbiamo scelto, come primo approccio, cellule tumorali neuronali che esprimono PRR12. Tra le linee testate, solo quelle di neuroblastoma mostrano elevata espressione di PRR12. Con CRISPR/Cas9 abbiamo introdotto mutazioni nel gene, generando cellule knockout sia eterozigoti e sia omozigoti. I primi risultati mostrano che tali cellule hanno ridotta sopravvivenza, alterazioni morfologiche e problemi nel ciclo cellulare. Per un modello più vicino alla realtà clinica, useremo cellule staminali pluripotenti indotte con mutazioni PRR12, differenziandole in cellule neuronali. Questo ci aiuterà a comprendere meglio il ruolo di PRR12 nello sviluppo neuronale e il suo impatto sulla malattia, aprendo nuove prospettive per future terapie.

68

Genetic neurological disorder

Neuroocular syndrome

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

Andreazzoli Massimiliano[1], A. Muscò[2], I. Cutei[1], D. Martini[1], M. Digregorio[1], V. Broccoli[3]

[1]Pisa, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa
[2]Milano, IRCCS Ospedale San Raffaele, 20132 Milano
[3]Pisa, IRCCS Ospedale San Raffaele, 20132 Milano; CNR-Institute of Neuroscience, Milano

Project: GJC21065; Broccoli Vania, Andreazzoli Massimiliano

PRR12 is a recently identified gene whose haploinsufficiency leads to a syndrome characterized by developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorder (ASD), and eye abnormalities. To investigate the molecular mechanisms underlying PRR12 haploinsufficiency, we generated a conditional Prr12 knockout mouse model by inserting loxP sites flanking exon 6. These mice were crossed with strains expressing Cre ubiquitously or specifically in the central nervous system. Full Prr12 knockout is perinatally lethal, highlighting its essential role in tissue function. We are currently analyzing the cellular defects caused by Prr12 loss in these models. However, heterozygous Prr12 mice do not exhibit the brain and ocular abnormalities observed in humans, indicating species-specific differences. To bridge this gap, we inactivated one or both Prr12 alleles in human iPSCs by gene editing, generating isogenic cell lines for comparative studies. Interestingly, Prr12-mutant neural progenitor cells exhibit increased proliferation alongside impaired neuronal differentiation and maturation. In particular, mutant neurons display abnormal morphology, including defective neurite growth. Ongoing molecular and genomic studies aim to uncover the mechanisms underlying these deficits. In parallel, we are addressing the role of the two zebrafish PRR12 co-orthologs, prr12a and prr12b. Morphometric analysis revealed that mutant prr12a and prr12b embryos exhibit a bilateral reduction of eye size, accompanied by perturbed brain morphology. In situ hybridizations and immunohistochemistry reveal a significant reduction of sox2 in the brain and eyes of prr12a and prr12b mutants (48-72 hpf). Monoallelic prr12a mutation disrupts neural retina layering, shortening rod cells and reducing Pax6+ precursor density. Open field tests in adult zebrafish heterozygous mutants highlight the presence of repetitive behaviors reminiscent of the ASD phenotype.

Disordini genetici neurologici

Sindrome neuro-oculare

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

PRR12 è un gene recentemente identificato, la cui aploinsufficienza causa ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva, disturbi dello spettro autistico (ASD) e anomalie oculari. Per studiarne i meccanismi molecolari, abbiamo generato un modello murino knockout condizionale con siti loxP fiancheggianti l'esone 6. Questi topi sono stati incrociati con ceppi Cre-positivi ubiquitari o specifici per il sistema nervoso centrale. Il knockout completo di Prr12 è letale, evidenziando il ruolo essenziale di questo gene. Tuttavia, i topi eterozigoti non mostrano anomalie cerebrali e oculari simili a quelle umane, suggerendo differenze specie-specifiche. Abbiamo quindi deciso di inattivare uno o entrambi gli alleli di Prr12 in cellule iPSC umane tramite gene editing, creando linee isogeniche per studi comparativi. Le cellule progenitrici neurali mutanti mostrano iperproliferazione e difetti nel differenziamento neuronale, con neuroni morfologicamente alterati e ridotta crescita dei neuriti. Le analisi attualmente in corso sono volte ad indagare i meccanismi alla base di questi difetti. Parallelamente, stiamo analizzando il ruolo dei due co-ortologhi di Prr12 in zebrafish, prr12a e prr12b. Gli embrioni mutanti per questi geni mostrano riduzione bilaterale della dimensione dell'occhio e alterazioni cerebrali. Esperimenti di ibridazione in situ e immunoistochimica evidenziano una riduzione di sox2 nel cervello e negli occhi (48-72 hpf). La mutazione monoallelica di prr12a altera la stratificazione della retina neurale, accorciando i bastoncelli e riducendo la densità dei precursori che esprimono Pax6. Infine, i test di "open field" nei mutanti eterozigoti adulti di zebrafish evidenziano comportamenti ripetitivi analoghi a quelli osservati nei pazienti con ASD.

69

Genetic neurological disorder

Allan Herndon Dudley syndrome (MCT8)

RECOVERING MCT8 MUTANTS BY CFTR CORRECTORS TO TREAT ALLAN HERNDON DUDLEY SYNDROME

Scano Martina[1], A. Benetollo[1], M. Carotti[1], F. Dalla Barba[1], D. Sandonà[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GSA22H002; Sandonà Dorianna

Allan-Herndon-Dudley Syndrome (AHDS) is a severe X-linked recessive disorder caused by mutations in the SLC16A2 gene, which encodes the monocarboxylate transporter 8 (MCT8), a specific thyroid hormone transporter. Various genetic defects disrupt either the synthesis, activity, folding or localization of MCT8, resulting in impaired thyroid hormone signaling at both central and peripheral levels, leading to severe neurological and developmental deficits. Current therapeutic approaches, such as thyroid hormone analogs, chemical chaperones, and gene therapy, are still under investigation. In this context, we proposed the novel use of CFTR correctors, small molecules designed to rescue folding-defective proteins. We hypothesized that CFTR correctors could target those MCT8 mutants that, similarly to type II CFTR mutants and most sarcoglycanopathy mutants, are folding defective and prematurely degraded or trapped intracellularly. Our results showed that treatments with CFTR correctors, especially corrector C17, led to the re-localization of several MCT8 mutants (e.g., L568P, S290F, L291R and P321L) to the plasma membrane of MDCK cells, where they retained their ability to transport the thyroid hormones, as demonstrated by cellular uptake of 125I-T3. Our main aim now is to further validate C17 efficacy, which we have demonstrated to have a good blood brain barrier permeability, both in vitro and in vivo, using different AHDS models. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from AHDS patients will replicate patient-specific conditions and will be differentiated into brain organoids to validate C17 in a model mimicking neural development. In vivo validation will be performed using a new AHDS mouse model carrying the P253L-MCT8 mutation, equivalent to the human P321L mutation. Altogether, our data highlight the potential of CFTR correctors in the treatment of AHDS and the validation of C17 in more models could open the way for a novel therapeutic strategy for AHDS.

Disordini genetici neurologici

Sindrome di Allan Herndon Dudley (MCT8)

RECUPERO DEI MUTANTI MCT8 TRAMITE CORRETTORI CFTR PER TRATTARE LA SINDROME DI ALLAN HERNDON DUDLEY

La Sindrome di Allan-Herndon-Dudley (AHDS) è un grave disturbo recessivo legato al cromosoma X causato da mutazioni nel gene SLC16A2, che codifica per il trasportatore monocarbossilato 8 (MCT8), un trasportatore specifico degli ormoni tiroidei. Diverse mutazioni genetiche alterano sintesi, attività o localizzazione dell'MCT8, compromettendo la segnalazione degli ormoni tiroidei sia a livello centrale che periferico e provocando quindi gravi deficit neurologici. Gli approcci terapeutici attuali, come gli analoghi degli ormoni tiroidei, i chaperoni chimici e la terapia genica, sono in fase di studio. In questo contesto, proponiamo quindi l'uso dei correttori del CFTR, molecole progettate per correggere proteine difettose nel ripiegamento. La nostra ipotesi è che i correttori del CFTR possano quindi agire sui mutanti di MCT8 simili ai mutanti di tipo II del CFTR e a molti mutanti di sarcoglicanopatia, difettosi nel ripiegamento e degradati precocemente, o trattenuti intracellularmente. I nostri risultati hanno mostrato che il trattamento con il correttore C17 ha portato alla rilocalizzazione di diversi mutanti di MCT8 (L568P, S290F, L291R, P321L) sulla membrana plasmatica delle cellule MDCK, dove hanno mantenuto anche la capacità di trasportare gli ormoni tiroidei, come evidenziato dall'assorbimento cellulare di 125I-T3. Il nostro obiettivo è quello di validare ulteriormente il C17, che ha mostrato buona permeabilità della barriera ematoencefalica, in modelli in vitro e in vivo di AHDS. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) derivate da pazienti AHDS, saranno differenziate in organoidi cerebrali per validare il C17 in un modello di sviluppo neurale. In vivo, utilizzeremo un modello murino di AHDS con la mutazione P253L-MCT8, equivalente alla mutazione umana P321L. I nostri dati suggeriscono il potenziale dei correttori del CFTR nel trattamento dell'AHDS e la validazione del C17 potrebbe aprire nuove opportunità terapeutiche.

70

Genetic neurological disorder

Congenital Central Hypoventilation Syndrome

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

Benfante Roberta[1], S. Di Lascio[2], A.L. Cuadros Gamboa[2], M. Bertocchi[2], F. Chiesa[2], P. Pelucchi[3], E. Mosca[3], D.M.M. Fornasari [2]

[1]Vedano al Lambro (MB), CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Segrate (MI), Università Degli Studi Di Milano Statale
[3]Segrate (MI), CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GMR22T1041; Fornasari Diego Maria Michele

Congenital Central Hypoventilation Syndrome (CCHS) is a rare life-long threatening genetic disorder with an incidence of 1/148'000 to 1/200'000 live births. It is characterized by autonomic nervous system (ANS) dysfunctions, most importantly a deficient control of autonomic ventilation that leads to hypoventilation during sleep. Since no pharmacological treatment has been identified, CCHS patients rely on mechanical ventilation for life support. 95% of CCHS cases are due to heterozygous polyalanine expansion mutations in PHOX2B, a master transcription factor of the ANS. Recent bioinformatic analyses revealed the presence of a natural antisense lncRNA (PHOX2B-AS1), transcribed in the opposite direction and partially complementary to the PHOX2B gene transcript. Interestingly, our preliminary data suggest that it acts at favoring PHOX2B translation, thus a modulation of its expression could be used as a new therapeutic strategy aimed at reducing the expression of mutant PHOX2B proteins. To overcome the unavailability of suitable models, we have generated autonomic sympathetic neurons using induced pluripotent stem cells derived from different CCHS patients, of which two carrying the same genotype (20/25 Ala), but presenting different onset of the disease (late-onset and early-onset). By single cell RNA seq analysis, we proved that the early-onset CCHS line (but not the late onset) has an ectopic expression of PHOX2B and PHOX2B-AS1 already at the undifferentiated level, suggesting that dysregulation at earlier developmental stages may be involved in CCHS pathogenesis. This ectopic expression may represent a key difference between LO-CHS and CCHS. Moreover, the differentiation process revealed a delayed expression of PHOX2B-AS1 and neuronal maturation defects, resembling the expression profile of undifferentiated neuroblastomas, rather than mature neurons. Overall, our data show both early and late differentiation defects in CCHS-derived neurons.

Disordini genetici neurologici

Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita)

L'RNA LUNGO NON CODIFICANTE (LNCRNA) ANTISENSO 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 autonomica. 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. Poiché esso è in grado di promuovere la produzione della proteina PHOX2B, modularne l'espressione potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per diminuire i livelli della proteina mutata.
Come modello sperimentale abbiamo generato neuroni simpatici autonomici partendo da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) derivate da due pazienti CCHS con la medesima mutazione, ma diverso esordio della patologia (precoce vs tardivo). Rispetto al controllo, questi neuroni hanno mostrato difetti nell'espressione di PHOX2B-AS1 e di maturazione. Inoltre, con analisi dell'RNA a singola cellula, abbiamo osservato che solo le iPSC derivate dal paziente con esordio precoce esprimono PHOX2B.
Ciò suggerisce la presenza di difetti già nei primi stadi dello sviluppo oltre a quelli che abbiamo riscontrato durante il differenziamento neuronale.

71

Genetic neurological disorder

Episodic mitochondrial myopathy with or without optic atrophy and reversible leukoencephalopathy (MEOAL)

A NOVEL MUTATION IN FDX2 PROVIDES INSIGHTS INTO THE PATHOGENESIS OF MEOAL MITOCHONDRIAL MYOPATHY

Costantini Paola[1], D. Doni[1], D. Grifagni[2], F. Cavion[1], B. Buchignani[3] R. Battini[3], E. Baschiera[1], M.A. Desbats[1], E. De Pascale[1], A. Boarolo[1], G. Sartori[1], O. Stehling, R. Lill[4], F.M. Santorelli[3], L. Salviati[1], S. Ciofi-Baffoni[2]

[1]Padova, Università Di Padova
[2]Firenze, Università Di Firenze
[3]Pisa, Fondazione IRCCS Stella Maris
[4]Marburg, Germany, Università Di Padova

Project: GJC21056; Costantini Paola, Ciofi Baffoni Simone

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 ferredoxin FDX2, a central component of cellular FeS cluster biogenesis. Two mutations have been described to date: 1) c.1A > T, affecting the start codon of FDX2 and causing myoglobinuria, lactic acidosis and slowly progressive muscle weakness; 2) c.431C > T, 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. To date there are important gaps in understanding the impact of FDX2 mutations in mitochondrial pathophysiology and in MEOAL patients. In this work we report a study of a pediatric patient with a diagnosis of neuromuscular disorder, with multiorgan involvement, associated with a novel homozygous mutation in FDX2, i.e. c.200+4 A>G. We found that: i) the mutation alters the splicing of the gene transcript, giving rise to a mRNA in which exon 2 is replaced by a portion of intron 2 due to the activation of a cryptic splicing site; ii) patient's cells have an impaired mitochondrial respiration and low levels of mutant FDX2, which is structured and likely functional; iii) patient's cultured cells show enhanced mitochondrial iron accumulation and ROS production; iv) the levels of the mitochondrial SOD2 mRNA and protein are significantly diminished in patient's cells. Our hypothesis is that iron accumulation and oxidative stress enhanced by SOD2 decrease in cells with mutations in FDX2 could be crucial, even though secondary events, in the pathogenesis of MEOAL and in the pathway leading to mitochondrial bioenergetic failure afflicting patients' cells.

Disordini genetici neurologici

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

UNA NUOVA MUTAZIONE IN FDX2 SUGGERISCE INDICAZIONI SULLA PATOGENESI DELLA MIOPATIA MITOCONDRIALE MEOAL

La miopatia mitocondriale episodica con o senza atrofia ottica e leucoencefalopatia reversibile (MEOAL) è un disordine neuromuscolare ereditario ultra-raro, ad esordio infantile, caratterizzato da debolezza muscolare progressiva e intolleranza all'esercizio e, in alcuni casi, atrofia ottica e polineuropatia sensitivo-motoria. MEOAL è causata da mutazioni di FDX2, una proteina che ha un ruolo essenziale nella funzione dei mitocondri, le "centrali elettriche delle cellule". Ci sono ancora diverse lacune nella comprensione del ruolo di FDX2 nella fisiopatologia mitocondriale e delle conseguenze delle sue mutazioni nei pazienti. In questo lavoro abbiamo studiato gli effetti di una nuova mutazione di FDX2 nelle cellule di una paziente pediatrica affetta da disordine neuromuscolare con coinvolgimento multiorgano. Abbiamo scoperto che i) le cellule producono a livelli molto bassi una proteina FDX2 "chimera" ma ancora funzionale; ii) i mitocondri sono meno attivi e accumulano ferro e radicali dell'ossigeno, potenzialmente pericolosi; iii) le cellule hanno livelli molto bassi della proteina SOD2, importante proprio per la protezione dallo stress ossidativo. Queste alterazioni potrebbero essere eventi chiave nella patogenesi di MEOAL e nella disfunzione mitocondriale che affligge le cellule di pazienti.

72

Genetic neurological disorder

Jamuar Syndrome, UGDH

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE)

DEVELOPING PRECLINICAL MODELS FOR INVESTIGATING NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS IN JAMUAR SYNDROME

Cabibbo Annachiara[1], E. Cappellozza[1], F. Ciarpella[1], I. Decimo[1](Co-author), E. Bottani[1], G. Colasante[2]

[1]Verona, Università Di Verona
[2]Milan, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget

Project: GSA23F002; Bottani Emanuela

Jamuar Syndrome (JS) is a rare genetic disorder characterized by developmental delay, epilepsy, dysmorphism, and motor impairments. It is caused by mutations in the UGDH gene, encoding UDP-glucose 6-dehydrogenase, an enzyme crucial for the synthesis of UDP-glucuronic acid, a key component of glycosaminoglycans and proteoglycans which constitute the extracellular matrix (ECM). Given the importance of ECM in brain development, we hypothesize that mutations in the UGDH may alter ECM composition, disrupting brain homeostasis. This work aims to establish preclinical models for studying neurodevelopmental disorders in JS. To this end, we planned to investigate the disease mechanisms in vitro and in vivo, through a 3D murine cerebral organoid and a novel JS mouse model. Ugdh-/- brain organoids were generated from neural stem cells (NSCs) derived from Ugdhflox/flox embryos. NSCs were transduced with a lentiviral vector carrying the Cre-recombinase gene, GFP, and puromycin resistance for selection. For the generation of the mouse model, a mouse embryonic stem cell (mESC) line was developed using CRISPR/Cas9 to introduce the point mutation (NC_000071.7:p.Arg317Gln). mESCs were electroporated, selected, and clones were analyzed for the presence of the mutation by restriction digestion and deep sequencing. This analysis allowed the identification of a heterozygous clone carrying the desired mutation. Molecular biology analyses confirmed the UGDH gene KO in Ugdh-/- organoids throughout maturation. These organoids were smaller with irregular morphology compared to controls. Moreover, immunofluorescence analysis showed impaired differentiation in Ugdh-/- organoids, with reduced expression of GFAP, TUBB3, and MAP2. These results can suggest the involvement of UGDH in neurogenesis. The Ugdh-/- organoid model offers a valuable in vitro system for

studying JS pathology and testing therapeutic strategies, while the KI mouse model will enable in vivo exploration of the disease."

Disordini genetici neurologici

Sindrome di Jamuar, UGDH

Encefalopatia epilettica e dello sviluppo

SVILUPPO DI MODELLI PRECLINICI PER INVESTIGARE I DISTURBI DEL NEUROSVILUPPO NELLA SINDROME DI JAMUAR

La sindrome di Jamuar (JS) è una malattia genetica rara caratterizzata da ritardo nello sviluppo, epilessia, dismorfismo e deficit motori, causata da mutazioni del gene UGDH, che codifica per l'UDP-glucosio 6-deidrogenasi. Questo enzima è essenziale per la sintesi dell'acido UDP-glucuronico, componente dei glicosamminoglicani e proteoglicani nella matrice extracellulare (ECM), fondamentale per lo sviluppo neurale. L'ipotesi è che le mutazioni in UGDH alterino la composizione dell'ECM, minando l'omeostasi cerebrale. Questo lavoro intende ottenere modelli preclinici per analizzare i disturbi del neurosviluppo nella JS sia in vitro che in vivo, attraverso un modello 3D di organoide cerebrale murino e un nuovo modello murino di JS. A questo scopo, gli organoidi cerebrali Ugdh-/- sono stati generati da cellule staminali neurali (NSC) derivate da embrioni Ugdhflox/flox. Le NSC sono state trasdotte con un vettore lentivirale contenente il gene per la Cre-ricombinasi, GFP e resistenza alla puromicina per la selezione. Per la generazione del modello murino, abbiamo sviluppato una linea KI di cellule staminali embrionali (mESC) mediante CRISPR/Cas9, introducendo la mutazione puntiforme (NC_000071.7:p.Arg317Gln). Le mESC sono state elettroporate, selezionate e analizzate mediante digestione con enzima di restrizione e sequenziamento, identificando un clone eterozigote con la mutazione desiderata. Analisi di biologia molecolare hanno confermato il KO del gene UGDH negli organoidi Ugdh-/- durante la loro maturazione. Questi organoidi risultano più piccoli e di forma irregolare rispetto ai controlli. Inoltre, analisi di immunofluorescenza hanno rivelato un alterato differenziamento, con ridotta espressione di GFAP, TUBB3 e MAP2. Ciò suggerirebbe il ruolo di UGDH nel neurosviluppo. Il modello di organoide Ugdh-/- rappresenta un valido sistema in vitro per studiare la JS e testare strategie terapeutiche, mentre il modello murino KI consentirà l'analisi in vivo della patologia.

73

Genetic neurological disorder

Novel neurodevelopmental syndrome

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF FSD1L, A T-DARK PROTEIN ASSOCIATED TO A NOVEL NEURODEVELOPMENTAL DISORDER

Orsi alessia[1], V. Serpieri[1], S. Perazzi[1], E.M. Valente[2]

[1]Pavia, Università Di Pavia
[2] Pavia, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino - IRCCS

Project: GJC21046; Valente Enza Maria

FSD1L is a T-dark gene highly expressed in the brain. It shares 3 domains (CC-COS, FnIII and B30.2/SPRY) and an intrinsically disordered region, with its paralog FSD1, encoding for a centrosomal protein, involved in several centrosome-related functions. Through whole exome sequencing, we identified biallelic FSD1L pathogenic variants in two siblings with a neurodevelopmental syndrome characterized by corpus callosum hypoplasia, periventricular white matter reduction and mild hydrocephalus. Additional 8 patients from 4 unrelated families with similar phenotype and distinct FSD1L variants were ascertained through GeneMatcher. Our preliminary studies demostrated FSD1L involvement in ciliogenesis and mitotic spindle assembly. Moreover, our study on patients' derived neurons demonstrated an impairment of neuronal differentiation and migration abilities, consistent with RNAseq data on patient neural progenitors, that showed a massive downregulation of several genes encoding transcription factors essential for neuronal differentiation. Next, we aimed at characterizing the subcellular localization and function of FSD1L in different cell types and cell cycle phases. FSD1L localization first was assessed through immunofluorescence in a knock-in HA-tagged iPSCs line generated by nucleofection, and subsequently differentiated in neural progenitor cells (NPCs). In both iPSCs and NPCs, FSD1L had a diffuse cytoplasmic punctate staining and it showed colocalization with microtubules along all phases of mitosis. In iPSCs, no centrosomal signal was observed, whereas in neural progenitor cells, a centrosomal localization emerged at all stages of the cell cycle. Additional experiments are in progress to characterize the function of FSD1L which still remains largely unknown. Our preliminary data suggest that this protein may play distinct roles depending on its subcellular localization, which varies across cell types and cell cycle phases.

Disordini genetici neurologici

Nuova sindrome del neurosviluppo

LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DI FSD1L, UNA PROTEINA T-DARK ASSOCIATA A UN NUOVO DISORDINE DEL NEUROSVILUPPO

FSD1L è un gene T-dark altamente espresso nel cervello. Condivide 3 domini (CC-COS, FnIII e B30.2/SPRY) e una regione intrinsecamente disordinata con il suo paralogo FSD1, codificante per una proteina centrosomiale. Attraverso il sequenziamento dell'esoma, abbiamo identificato varianti patogenetiche bialleliche di FSD1L in due fratelli con una sindrome del neurosviluppo caratterizzata da ipoplasia del corpo calloso, riduzione della sostanza bianca periventricolare e idrocefalo. Altri 8 pazienti di 4 famiglie con fenotipo simile e varianti in FSD1L, sono stati identificati tramite GeneMatcher. I nostri studi preliminari hanno dimostrato il coinvolgimento di FSD1L nella ciliogenesi e nell'assemblaggio del fuso mitotico. Inoltre, il nostro studio sui neuroni derivati dai pazienti, ha dimostrato un'alterazione delle capacità di differenziamento e migrazione neuronale, coerentemente con i dati di RNAseq sui progenitori neurali dei pazienti, che hanno mostrato una downregolazione di geni codificanti fattori di trascrizione essenziali per il differenziamento neuronale. Abbiamo cercato di caratterizzare la localizzazione subcellulare e la funzione di FSD1L in diversi tipi cellulari e fasi del ciclo cellulare. La localizzazione di FSD1L è stata valutata mediante immunofluorescenza in una linea di iPSCs knock-in HA-tagged generata mediante nucleofezione, successivamente differenziata in progenitori neuronali (NPCs). Sia nelle iPSCs che nelle NPCs, FSD1L presentava un pattern citoplasmatico diffuso e mostrava una colocalizzazione con i microtubuli in tutte le fasi della mitosi. Inoltre, solo nelle NPCs, è emersa una localizzazione centrosomiale in tutte le fasi del ciclo cellulare. Sono in corso ulteriori esperimenti per caratterizzare la funzione di FSD1L, tuttora sconosciuta. I nostri dati preliminari suggeriscono che questa proteina possa svolgere ruoli distinti a seconda della localizzazione subcellulare, diversa in base al tipo cellulare e alla fase del ciclo cellulare.

74

Genetic neurological disorder

Optic nerve hypoplasia and abnormalities of the Central Nervous System

CRISPR-CAS9-BASED FUNCTIONAL INVESTIGATION OF THE "DARK GENOME" IN SEARCH OF PUTATIVE DOWNSTREAM EFFECTORS OF SOX2 IN NEURODEVELOPMENTAL DISEASE

G. Pozzolini[1], R. Baldi[1], A. Cascio[1], C. Marenco[1], D. Morciano[1], G. Antoniazzi[1], E. Zakirova[1], T. Lahoud[1], P.C. Esk[2], V. Krenn[1], S.K. Nicolis[1]

[1]Milano, Università Di Milano Bicocca
[2]Innsbruck, University of Innsbruck

Project: GJC21176; Nicolis Silvia Kirsten

Mutations in the SOX2 gene lead to defects in the development of multiple brain regions, causing blindness, intellectual disabilities, and seizures. SOX2 is a transcription factor that regulates many genes, some of which, when mutated, are involved in other neurodevelopmental disorders (NDDs). Using RNA sequencing, we identified over a thousand genes that are downregulated following Sox2 deletion in neural stem cells derived from the developing mouse brain. Many of them have human homologs, and many belong to the "T-Dark" gene category, a group of genes of mostly unknown function. We focused on 122 human T-Dark genes, whose expression is most reduced in Sox2-deleted mouse brain-derived neural stem cells. To explore their role in neurodevelopment, we applied a screening strategy based on growing in vitro human brain organoids derived from a previously established human embryonic stem cell line. This screening uses the CRISPR Lineage Tracing at Cellular Resolution in Heterogeneous Tissue (LICHT) technique, combining CRISPR-Cas9 mutagenesis and a dual barcode method. This approach allows us to identify mutated genes in underrepresented cell clones within brain organoids through genomic sequencing. We designed and cloned a T-Dark guideRNAs library, and a control library that includes SOX2 and some of its known NDD-related targets. The libraries were then used to transduce the stem cells, from which brain organoids were differentiated. Afterwards, the organoids were dissociated to single cells, and DNA was extracted and prepared for sequencing, presently ongoing. In parallel, we worked on optimizing this technique to make it more accessible and efficient for other laboratories. We hypothesize that these T-Dark genes may act as functional effectors of SOX2. Identifying their neurodevelopmental roles will provide new insights into the SOX2-dependent regulatory network, not only in SOX2-related pathologies but also in other NDDs, with potential therapeutic perspective.

Disordini genetici neurologici

Ipoplasia del nervo ottico e anomalie del Sistema Nervoso Centrale

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. 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 122 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 stabilita. 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.

75

Genetic neurological disorder

Orphan rare neurodevelopmental disease

PILOT STUDY FOR UNVEILING ZNF865 ROLE IN UNDIAGNOSED RARE NEURODEVELOPMENTAL DISEASE (PUZZLE)

Soldo Caterina[1], M. Orefice[1], M. Bartolomei[1], J. Marcadier[2], M. Ori[1]

[1]Pisa, Università Di Pisa
[2]Calgary, Dept. of Medical Genetics, ACH, Calgary, AB, Canada

Project: GJC23050; Ori Michela

Zinc finger protein 865 (ZNF865) is a zinc finger-type transcription factor encoded by the ZNF865 gene located on human chromosome 19 (NM_001195605). ZNF865 is a t-dark gene and its putative function is transcriptional regulation. Prof. Julien Marcadier by exome sequencing and then by an international call, identified 13 unrelated individuals from Canada, South America and Europe with de novo mutations in the coding region of ZNF865, leading to the formation of a premature stop codon, thus suggesting a loss-of-function pathogenetic mechanism. Patients are characterized by global developmental delay, intellectual disability, speech delay, hypotonia, craniofacial dysmorphism, feeding difficulties, autism spectrum disorder features, sporadic epilepsy and scoliosis. This pathological condition represents an undiagnosed rare disease so every new piece of information about the role of this gene can be of key importance to shed light on the pathology and to raise the awareness on this genetic condition. By taking advantage of the zebrafish model, where znf865 is present as single gene, we aim to deepen the knowledge of its pathological and physiological role during development. After studying the

expression of znf865 during zebrafish embryogenesis, we transiently silenced its expression using the CRISPR/Cas13d system, which induced the degradation of the znf865 mRNA in zebrafish embryos. We observed alterations in craniofacial structures, scoliosis and altered locomotor activity of crispants embryos compared to controls. To better evaluate these aspects, we are characterizing a znf865 mutant line (znf865sa23453) in zebrafish. These promising preliminary data represent the first in vivo link between znf865 loss of function and patient symptoms, which we hope will help to characterize this undiagnosed rare disease and envisage therapeutic indications for the future."

Disordini genetici neurologici

Malattia genetica rara orfana del neurosviluppo

STUDIO PILOTA PER LA CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL GENE ZNF865 ASSOCIATO AD UNA PATOLOGIA ORFANA CON ANOMALIE DEL NEUROSVILUPPO

ZNF865 è un fattore di trascrizione di tipo zinc finger codificato dal gene ZNF865 situato sul cromosoma 19 umano (NM_001195605). ZNF865 è un gene "t-dark" il cui ruolo funzionale non è noto ma dalla sua struttura si può predire una funzione putativa nella regolazione trascrizionale. Il Prof. Julien Marcadier ha identificato, attraverso il sequenziamento dell'esoma e poi con una call internazionale, 13 individui, non imparentati tra loro, con mutazioni de novo nella regione codificante di ZNF865, che causano la formazione di un codone di stop prematuro, suggerendo un meccanismo patogenetico di perdita di funzione genica. I pazienti presentano ritardo dello sviluppo, disabilità intellettiva, ritardo nel linguaggio, ipotonia, dismorfismo craniofacciale, difficoltà nell' alimentazione, caratteristiche dello spettro autistico e scoliosi. Questa condizione patologica è una malattia rara orfana, per cui ogni nuova informazione può essere di fondamentale importanza per aumentare le conoscenze e la consapevolezza su questa condizione genetica. Sfruttando il modello zebrafish, in cui znf865 è presente come singolo gene, stiamo studiando il suo ruolo fisiologico e patologico durante lo sviluppo embrionale. Dopo aver studiato l'espressione di znf865 durante l'embriogenesi in zebrafish, abbiamo silenziato la sua espressione utilizzando il sistema CRISPR/Cas13d, inducendo la degradazione dell'mRNA di znf865 in embrioni di zebrafish. In questi abbiamo osservato alterazioni nelle cartilagini craniofacciali, scoliosi e attività locomotoria alterata. Per valutare meglio questi aspetti, stiamo caratterizzando anche una linea mutante znf865 (znf865sa23453) in zebrafish. Questi promettenti dati preliminari rappresentano il primo collegamento in vivo tra la perdita di funzione di znf865 e dei fenotipi simili a quelli riscontrati i nei pazienti, che speriamo possano aiutare a caratterizzare questa malattia rara non diagnosticata e a prevedere indicazioni terapeutiche per il futuro.

76

Genetic neurological disorder

Paroxysmal kinesigenic dyskinesia

Benign familial infantile epilepsy

TMEM151A, A NEW CAUSATIVE GENE FOR PAROXYSMAL KINESIGENIC DYSKINESIA

L. Morinelli[1], M. Muià[1], M. Bartolucci[2], M. Servetti[3], L. Ferrera[2], B. Corradi[3], P. Arnaldi[4], K. Cortese[1], A. Ludovico[1], L. Muzzi[1], L. Maragliano[5], L. Petretto[2], F. Zara[1], B. Sterlini[1], A. Corradi[1]

[1]Genova, Università Di Genova
[2]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS
[3]Genova, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)
[4]Genova, Ospedale Policlinico San Martino - IRCCS
[5]Ancona, Università Politecnica Delle Marche

Project: GJC22066; Corradi Anna Margherita, Zara Federico

TMEM151A, an almost unknown gene, has been recently associated to Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia (PKD), an autosomal dominant movement disorder. Our project aims to identify the role of TMEM151A in the brain from both a physiological and pathological point of view through a multi-level approach. We studied the topology of TMEM151A and showed that it is a membrane protein with two membrane-spanning helices and a large cytosolic domain with alpha-helix and beta-sheet structures. We explored TMEM151A expression from macro-areas of the brain down to the cellular level by real-time PCR experiments and showed that it is enriched in the cerebral cortex, hippocampus and spinal cord. In primary neuronal cultures TMEM51A is developmentally regulated with a peak of expression between 14 and 21 days in vitro, a time of intense synaptogenesis. Overexpression experiments showed an enrichment in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. To go in depth about the role of TMEM151A in the disease, we investigated the effects of some pathological mutations by in vitro assays. We show that some of them cause alteration in the protein expression, suggesting a possible loss of function mechanism. Therefore, to mimic the pathology, we generated induced pluripotent stem cells (IPSC) carrying a null mutation in TMEM151A. IPSC TMEM151A KO and isogenic controls were differentiated to glutamatergic excitatory neurons and functional characterization is ongoing. To define the molecular interactome of TMEM151A in mouse brain, we used a pull down-based proteomic approach and identified several potential interacting proteins involved in membrane trafficking processes. We are validating these potential candidates by biochemical approaches. Our results may help to understand the physio-pathological mechanisms at the basis of these paroxysmal disorders and to get a step forward for the identification of new targeted therapeutic strategies.
(1) Morinelli et al. JMB 2024"

Disordini genetici neurologici

Discinesia chinesigenica parossistica; PKD; Coreatetosi chinesigenica parossistica; Discinesia chinesigenica parossistica familiare; PKD familiare

Epilessia infantile familiare benigna; BFIE; BFIS; Convulsioni infantili familiari Benigne; Crisi infantili famiiari benigne;

TMEM151A UN NUOVO GENE CAUSA DI DISCINESIA PAROSSISTICA CHINESIGENICA

TMEM151A, un gene poco noto, è stato recentemente associato alla Discinesia Chinesigenica Parossistica (PKD), un disturbo del movimento autosomico dominante. Il progetto mira a identificare il ruolo fisiologico e patologico di TMEM151A nel cervello attraverso un approccio multidisciplinare. Abbiamo studiato la topologia di TMEM151A e dimostrato che si tratta di una proteina a membrana con due eliche transmembrana e un grande dominio citosolico con strutture ad alfa-elica e beta-foglietto. Abbiamo esplorato l'espressione di TMEM151A con esperimenti di RT-PCR e dimostrato che è arricchito nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo e nel midollo spinale. Nelle colture neuronali primarie TMEM51A è regolato durante lo sviluppo con un picco di espressione tra 14 e 21

giorni in vitro, un periodo di intensa sinaptogenesi. Gli esperimenti di sovraespressione hanno mostrato un arricchimento nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi. Per approfondire il ruolo di TMEM151A nella patogenesi della PKD, abbiamo studiato gli effetti di alcune mutazioni patogeniche con saggi in vitro. Abbiamo dimostrato che alcune mutazioni causano alterazione nell'espressione di TMEM151A, suggerendo una possibile meccanismo di perdita di funzione. Quindi, per studiare un modello della patologia, abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte (IPSC) che portano una mutazione nulla in TMEM151A. IPSC TMEM151A KO e controlli isogenici sono stati differenziati in neuroni eccitatori glutamatergici di cui è in corso la caratterizzazione funzionale. Per definire l'interattoma molecolare di TMEM151A nel cervello, abbiamo usato un approccio di proteomica basato sul pull down ed abbiamo identificato numerosi potenziali interattori coinvolti nei processi di traffico intracellulare. I nostri risultati contribuiscono alla comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base di questi disturbi parossistici e all'identificazione di nuove strategie terapeutiche mirate.

77

Genetic neurological disorder

Prader-Willi syndrome

NPAP1: THE ROLE OF ANCIENT GENE VARIANTS IN PRADER-WILLI SYNDROME PATHOPHYSIOLOGY

A. Polito[1], A. Serani[1], H. Tsushima[1], A. Melloni[1], G. Como[1], A. Petretto[2], V. Tucci[1]

[1]Genoa, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)
[2]Genoa, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS

Project: GMR22T1039; Tucci Valter

Prader-Willi Syndrome (PWS) is a rare neurodevelopmental disorder caused by imprinting defects within the 15q11-q13 locus. Loss of expression of paternally inherited genes causes severe symptoms, including developmental delays, hyperphagia, obesity, and sleep abnormalities. Our study unveils a novel evolutionary mechanism involving the human-specific nuclear pore complex-associated protein 1 (NPAP1) and its role in lipid accumulation and circadian rhythm alteration in PWS. By investigating the modern and ancestral variants of NPAP1 in mouse cells lacking paternal Snord116, we found that the two haplotypes influence adipogenesis, lipid uptake pathways, and circadian gene oscillation differently. 3D protein modeling suggests that conformational changes between the two variants may affect their interaction with other molecules. This prediction was confirmed by analyzing the impact of NPAP1 variants on total cell RNA expression and examining the molecular partners involved in the protein complexes using high-throughput techniques. Co-immunoprecipitation and mass spectrometry reveal that NPAP1 is primarily involved in transcription regulatory complexes. In particular, we found that NPAP1 is possibly involved in pathways mediated by the transcription factors FOXO1 and HMGA1. To summarize the physiological role of this protein in vivo, we generated a novel mouse model that expresses NPAP1 in the orthologous region of the human genome. This model replicated the human tissue distribution of NPAP1 expression, including the brain and adipose tissue. Interestingly, preliminary sleep EEG analyses suggested a role of NPAP1 in sleep homeostasis. Further studies on the role of NPAP1 in our animal models may enhance the understanding of PWS pathology, identifying a potential gene-based stratification of the PWS population and advancing the development of precision medicine.

Disordini genetici neurologici

Sindrome di Prader-Willi; PWS;

NPAP1: IL RUOLO DELLE VARIANTI GENETICHE ANTICHE NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DI PRADER-WILLI

La sindrome di Prader-Willi (PWS) è un raro disturbo dello sviluppo neurologico causato da difetti nel locus 15q11-q13. I sintomi più comuni sono ritardi nello sviluppo, iperfagia, obesità e disturbi del ritmo sonno-veglia. Recentemente, abbiamo identificato un meccanismo ancestrale che coinvolge la proteina associata al poro nucleare 1 (NPAP1) nell'accumulo di lipidi e nell'alterazione del ritmo circadiano nella PWS. Investigando le varianti moderne e ancestrali di NPAP1 nelle cellule di topo mancanti del gene Snord116, abbiamo scoperto che i due aplotipi influenzano in modo diverso l'adipogenesi, l'assorbimento dei lipidi e l'oscillazione dei geni circadiani. Modelli 3D della struttura della proteina indicano che i cambiamenti conformazionali tra le due varianti possono influenzare la sua interazione con altre molecole. Abbiamo confermato questa previsione analizzando l'effetto, nelle cellule, delle due varianti di NPAP1 sull'espressione genica e la sua interazione in complessi proteici. L'analisi ha rivelato che NPAP1 è principalmente coinvolto nei complessi regolatori della trascrizione. In particolare, abbiamo scoperto che NPAP1 è potenzialmente coinvolto nelle vie mediate dai fattori di trascrizione FOXO1 e HMGA1. Per meglio comprendere questi meccanismi, abbiamo generato un nuovo modello animale caratterizzato dalla presenza del gene umano nel locus omologo del genoma del topo. Questo modello ha ricapitolato fedelmente la distribuzione nei tessuti umani dell'espressione NPAP1, come nel cervello e nel tessuto adiposo. Inoltre, le analisi del sonno del modello di topo hanno suggerito un ruolo di NPAP1 nell' omeostati del sonno. Ulteriori studi sulla funzione di NPAP1 nel nostro modello animale potrebbero ampliare la comprensione della patologia della PWS, caratterizzando il genoma della popolazione PWS e avanzando in precisi sviluppi terapeutici.

78

Genetic neurological disorder

Tuberous Sclerosis Complex

DECONSTRUCTING THE INVOLVEMENT OF ABNORMALLY PROTRACTED CORTICOGENESIS IN THE ETIOLOGY OF CORTICAL DEFECTS IN A POSTNATAL MOUSE MODEL OF TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX

Sansi Ilaria[1], I. Pagano[1], R. Galli[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GMR23T1178; Galli Rossella

Tuberous Sclerosis Complex (TSC) is a rare multisystem genetic disorder, caused by loss-of-function mutations in either Tsc1 or Tsc2. These mutations release the inhibitory break exerted by the Tsc1/2 complex on mTOR signaling, leading to the formation of pathognomonic benign lesions in multiple organs. In the brain, TSC lesions consist of subependymal nodules (SENs), subependymal giant cell astrocytomas (SEGAs), and cortical tubers (CT). CT are focal

areas of mislamination, characterized by the presence of giant cells, dysplastic neurons and astrocytosis, and are responsible for the epileptic phenotype observed in TSC patients, often accompanied by intellectual disability and neuropsychiatric disorders. We previously showed that late postnatal (P10 and P15-17) conditional inactivation of both Tsc1 and Pten in subventricular zone (SVZ) progenitors is required to form full-blown SENs and SEGAs in murine models. Exploiting the same model, we tested whether perinatal (P3) inactivation would lead to similar results. Surprisingly, mutant mice presented with epileptic seizures, associated with defects in cortical layering, interneuron maturation and astrocytosis, thus modelling the cortical defects observed in human patients. In particular, conditional knockout mice analyzed at P20 presented with significantly reduced Cux1+ neurons, ectopic positioning of Tbr1+ neurons in superficial cortical layers and an increase in GFAP+ astrocytes. We also observed a significant reduction in MGE- and CGE-derived interneurons, accompanied by PV+ interneurons exhibiting an immature-like phenotype. Overall, our preliminary data suggest that defects in perinatal SVZ progenitors' proliferation, migration and/or maturation might play a role in the etiology of TSC. This project aims at further dissecting the mechanisms underlying this process, employing Confetti-based lineage tracing and snRNA-seq to track defects in postnatal corticogenesis at different stages of development.

Disordini genetici neurologici

sclerosi Tuberosa; Complesso della Sclerosi tuberosa; ST; TSC; Sindrome di Bourneville;

ANALISI DEI DIFETTI CORTICALI RISCONTRATI IN UN MODELLO MURINO POSTNATALE DI SCLEROSI TUBEROSA

La Sclerosi Tuberosa (ST) è una malattia genetica causata da mutazioni nei geni onco-soppressori Tsc1 o Tsc2, che promuovono la formazione di numerosi tumori benigni in diversi organi. A livello del sistema nervoso centrale si osservano noduli subependimali, astrocitomi subependimali a cellule giganti e i tuberi corticali, ovvero malformazioni a livello corticale. Queste ultime alterazioni rappresentano la principale causa di morbilità e di deterioramento della qualità di vita nei pazienti, in quanto i tuberi corticali sono ritenuti responsabili dello sviluppo di sintomi neurologici, quali epilessia, disabilità intellettiva e difetti cognitivi. Ad oggi non esiste una terapia risolutiva, e per la sua implementazione è fondamentale sviluppare modelli animali che permettano di studiarne la patologia. Nel nostro laboratorio è stato generato un nuovo modello murino, inattivando i geni Tsc1 e Pten a livello delle cellule progenitrici nella zona subventricolare (ZSV) allo stadio postnatale, che ha permesso uno studio più accurato di noduli e astrocitomi subependimali. Sfruttando lo stesso modello, ma inducendo le mutazioni ad uno stadio perinatale, quindi più precoce, abbiamo ottenuto un fenotipo caratterizzato dalla presenza di crisi epilettiche e malformazioni corticali. Nello specifico, abbiamo osservato una eccessiva proliferazione della ZSV, alterazioni della laminazione corticale, difetti nella maturazione dei neuroni inibitori, e un aumento del numero di astrociti, anomalie tipicamente osservate nei tuberi corticali umani. Lo scopo di questo progetto è quindi di utilizzare questo modello per comprendere quali meccanismi a carico dei progenitori della ZSV perinatale vengano dirottati dalle mutazioni e come questi contribuiscano allo sviluppo della patologia. Queste nuove conoscenze potranno poi aiutare nell'identificazione di nuovi bersagli farmacologici, volti allo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche.

79

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Angelman syndrome

THE IMPACT OF NEURONAL SUMOYLATION IN THE PATHOGENESIS OF THE ANGELMAN SYNDROME

Baronchelli Federica[1], M. Biagioni[1], M. Fini[1], C. Peirone[2], V. Alari[3], S. Perego[3], L. Iannotta[4], A. Botto[5], C. De Cesari[5], M. Leonzino[1], S. Russo[3], L. McDonnell[5], A. Folci[1], M. Fossati[1]

[1]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Pieve Emanuele, Humanitas University
[3]Cusano Milanino, Istituto Auxologico Italiano - IRCCS
[4]Rozzano, Humanitas Research Hospital
[5]San Giuliano Terme, Fondazione Pisana Per La Scienza Onlus

Project: GGP20127; Fossati Matteo

The Angelman Syndrome (AS) is a rare neurodevelopmental disorder caused by the loss of the maternally expressed UBE3A gene, which encodes an E3 ubiquitin ligase. Although considerable efforts have been put to dissect UBE3A function in the brain, the pathogenic mechanisms remain largely unknown and effective treatments are not available yet. Being an E3 ubiquitin ligase, defective ubiquitination, which may occur in either nuclear or cytosolic compartments, is thought to be a primary mechanism underlying synaptic dysfunction in AS. Increasing evidence indicates a tight functional interplay between ubiquitination and other post-translational modifications (PTM), including SUMOylation, an ubiquitin-related PTM consisting in the covalent conjugation of 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 and critical especially during development. In this project, we test the hypothesis that altered ubiquitination might lead to aberrant SUMOylation, thus contributing to AS pathogenesis. To explore this possibility, we are currently evaluating SUMOylation of nuclear and cytosolic fractions obtained from cortices of AS and wild type mice throughout neurodevelopment. Using the same experimental approach, we are also investigating SUMOylation in human cortical neurons obtained from patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs). Strikingly, preliminary data indicate that both SUMO1- and SUMO2/3 conjugation is impaired at different developmental stages in the nucleus and in the cytosol of AS cortices. These results are further confirmed by proteomic analysis of the same samples. Taken together, all these data might unveil a novel pathogenic mechanism of AS and provide the rationale to develop new therapeutic strategies to treat AS patients.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Angelman; AS;

L'IMPATTO DELLA SUMOILAZIONE NEURONALE NELLA PATOGENESI DELLA SINDROME DI ANGELMAN

Le malattie psichiatriche e del neurosviluppo colpiscono milioni di persone nel mondo e hanno un drammatico impatto socio-economico sulla società. Nonostante siano stati compiuti recentemente grandi progressi 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.

Il presente programma di ricerca si ripropone di studiare la sindrome di Angelman (AS), un disordine del neurosviluppo causato da difetti genetici del gene UBE3A e caratterizzato da ritardo nello sviluppo, deficit motori, disabilità intellettuale, difficoltà nella comunicazione verbale ed iperattività. 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. 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 offrire nuove prospettive terapeutiche per questa terribile malattia.

80

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Cornelia de Lange syndrome

MAU2 IS REQUIRED FOR ZEBRAFISH NEURODEVELOPMENT

Palermo Sara[1], M. Tricco[1], M. Betti[1], M. Spreafico[1], C. Gervasini[1] V. Massa[1], A. Fantin[1]

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GJC22043; Massa Valentina, Fantin Alessandro

Cohesin is a multisubunit protein complex involved in chromatin dynamics, with significant roles in sister chromatid cohesion, transcriptional regulation, and chromatin organization. Key for cohesin's functionality is the NIPBL-MAU2 heterodimer, known as the cohesin loader complex. Pathogenetic variants in NIPBL lead to Cornelia de Lange syndrome (CdLS), a cohesinopathy characterized by a spectrum of clinical features, including developmental delays, craniofacial abnormalities, intellectual disability, and limb anomalies. Recent findings suggest that MAU2 variants could also cause CdLS, indicating a shared pathogenic mechanism involving impaired cohesion-loader function. However, very little is known about MAU2 function and impact on embryonic morphogenesis. In this study we aimed at elucidating the role of MAU2 in neural and craniofacial development and CdLS insurgence by exploiting the zebrafish model. Gene expression analysis showed robust mau2 transcripts detection during zebrafish embryo development, which appeared enriched in the central nervous system especially in the cephalic region. We then exploited a knockdown (KD) strategy by combining two different antisense morpholinos (MOs) to hamper Mau2 protein synthesis in zebrafish embryos. After validating KD efficiency, assessment of motor reactivity at different timepoints through touch- and light-evoked response analyses showed a significant delay of response and locomotor behaviour, respectively, in MO-injected embryos, reminiscent of the canonical psychomotor retardation and intellectual disability present in CdLS patients. Impairments in muscle development was excluded through birefringence microscopy. Our results suggest that Mau2 KD in zebrafish could represent a good model to study MAU2 role in CdLS insurgence. Future analyses will be focused on better characterize Mau2 KD phenotype, including craniofacial morphogenesis, and its rescue with human wildtype or pathological MAU2 variants.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Corneia de Lange; CDLS; Sindrome di Brachmann-de Lange;

MAU2 È NECESSARIO PER IL NEUROSVILUPPO NELLO ZEBRAFISH

La coesina è un complesso proteico coinvolto nella dinamica della cromatina, tra cui la coesione dei cromatidi, la regolazione trascrizionale e l'organizzazione della cromatina. Un elemento chiave per la funzionalità della coesina è l'eterodimero NIPBL-MAU2. Varianti patogenetiche in NIPBL inducono la sindrome di Cornelia de Lange (CdLS), coesinopatia caratterizzata da uno spettro di manifestazioni cliniche, tra cui ritardo nello sviluppo, anomalie craniofacciali, disabilità intellettiva e anomalie degli arti. Risultati recenti suggeriscono che anche varianti in MAU2 possano causare CdLS, indicando come meccanismo patogenetico condiviso la disfunzione dell'eterodimero. Tuttavia, è poco nota la funzione e l'impatto di MAU2 sulla morfogenesi embrionale. L'obiettivo di questo studio è chiarire il ruolo di MAU2 nello sviluppo neurale e craniofacciale e nell'insorgenza di CdLS, utilizzando il modello zebrafish. L'analisi dell'espressione genica ha mostrato espressione costante di mau2 durante lo sviluppo embrionale nel modello, arricchita nella regione cefalica. Abbiamo adottato una strategia di knockdown (KD) combinando due morfolini (MO) antisenso per inibire la sintesi proteica di Mau2 negli embrioni di zebrafish. Dopo aver validato l'efficienza del KD, la valutazione della reattività motoria a stimoli tattili e luminosi ha mostrato un ritardo significativo nella risposta e nel comportamento locomotorio negli embrioni trattati con MO, simile al tipico ritardo psicomotorio e disabilità intellettiva osservata nei pazienti con CdLS. Le alterazioni nello sviluppo muscolare sono state escluse tramite microscopia a birifrangenza. I nostri risultati suggeriscono che il KD di Mau2 negli zebrafish potrebbe rappresentare un buon modello per studiare il ruolo di MAU2 nell'insorgenza di CdLS. Le analisi future saranno focalizzate sulla caratterizzazione del fenotipo del KD, inclusa la morfogenesi craniofacciale, e sul suo recupero con varianti umane di MAU2 normali o patologiche.

81

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Fragile X Syndrome

ROLE OF NEGR1 SIGNALING DYSREGULATION IN FRAGILE X AND OTHER RARE SYNDROMIC FORMS OF AUTISM

Chellali Mariam Marie[1], A. Fumagalli[1], O. Shevtsova[1], G. Piccoli[2], L. Cancedda[1]

[1]Genova, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)
[2]Trento, Università Di Trento

Project: GMR23T1197; Cancedda Laura

Autism spectrum disorders (ASDs) are a group of medical conditions with different etiologies that originate during neurodevelopment. Although hundreds of diverse gene variants have been implicated in the pathogenesis of ASD, all ASDs share two hallmark symptoms: social impairment and repetitive behaviors. Finding a convergent pathway disrupted in diverse ASDs may explain how the wide variety of ASD genetic variants eventually converge into a consistent core group of impaired processes. In this study, we describe a cleavable cell-adhesion molecule

(Negr1) as causative of core ASD behaviors when over-expressed in Wild type (WT) animals, and we indicate Negr1 as a potential convergent molecule dysregulated in ASD. Supporting the relevance of the latter finding, we also found that Negr1 is up-regulated in the prefrontal cortex (PFC) of five diverse mouse models of genetic ASD and in postmortem PFC samples of people with ASD and Fragile X. Indeed, up-regulation of Negr1 in the prefrontal cortex (PFC) was sufficient to induce ASD core behaviors in WT mice and brain morphological deficits. These results highlight a causal link between Negr1 upregulation and core ASD behaviors in mice and reveal a consistent dysregulation of Negr1 across various ASD models. This provides a potential explanation for how numerous ASD-related genetic variants converge to disrupt common developmental processes in the brain, leading to similar behavioral phenotypes. Moreover, our findings identify the regulation of the Negr1 as a promising target for the development of future therapeutic strategies.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome dell'X Fragile; Sindrome di Martin-Bell; FXS; Sindrome FRAXA; Sindrome FraX;

RUOLO DELLA DISREGOLAZIONE DI NEGR1 NELLA SINDROME DELLA X FRAGILE E ALTRE RARE FORME SINDROMICHE DI AUTISMO.

I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono un gruppo di condizioni mediche con cause diverse che hanno origine nei primi anni di vita. Nonostante il fatto che centinaia di mutazioni genetiche diverse possano causare ASD, tutti gli ASD presentano sintomi comuni (deficit sociali/comunicativi, comportamento ripetitivo). Trovare meccanismi molecolari comuni alla base dei diversi ASD potrebbe spiegare come l'ampia varietà di mutazioni genetiche negli ASD alla fine converga sugli stessi defetti comportamentali. In questo studio, descriviamo una proteina di adesione chiamata Negr1 come causativa dei diffetti principali legati all'autismo quando essa è sovra-espressa in topi wild-type (WT), ed indichiamo che Negr1 può essere una molecola potenzialmente convergente nell'autismo. In linea con ciò, abbiamo anche trovato che Negr1 è aumentata nella corteccia prefrontale (PFC) di 5 diversi modelli murini genetici di autismo e nella PFC di campioni postmortem di persone con autismo o sindrome dell'X Fragile. Infatti, l'aumento di Negr1 nella PFC è sufficiente per indurre comportamenti autistici e diffetti anatomici nei topi WT. Questi risultati evidenziano un legame causale tra l'aumento di Negr1 e i comportamenti autistici nei topi e svela una consistente disregolazione di Negr1 attraverso vari modelli murini di autismo. Questo fornisce una potenziale spiegazione di come numerose forme genetiche di autismo convergano comunemente in diffetti anatomici cerebrali che portano a fenotipi comportamentali simili. Inoltre, questi risultati identificano Negr1 come target promettente per lo sviluppo di strategie terapeutiche future.

82

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Fragile X Syndrome

UNRAVELING FMR1 EXPRESSION DYNAMICS AND CELL-TYPE-SPECIFIC PROTEOME ALTERATIONS IN A NOVEL 3D HUMAN BRAIN ORGANOID MODEL OF FRAGILE X SYNDROME

D'Ercole Martina[1], E. Cesare[1], C. Laterza[1], A. Gesualdo[1], M.G. La Barbera[1], S. Angiolillo[1], R. Frison[1], O. Gagliano[1] R. Polli[2] A. Murgia[3], N. Elvassore[1], C. Ribecco[1]

[1]Padova, Università Di Padova
[2]Padova, Istituto Di Ricerca Pediatrica Città Della Speranza (Irp)
[3]Padova, Istituto Di Ricerca Pediatrica Città Della Speranza (Irp)

Project: GGP20105; Elvassore Nicola

Fragile X Syndrome (FXS) is the main form of inherited intellectual disability. The disease is caused by fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene loss of function due to expansion and hypermethylation of CGG repeats in FMR1 promoter. whose underlying mechanisms are still under investigation. Analysis on chorionic villi have shown active expression of the full mutated (FM) FMR1 gene during the first trimester of gestation, however, the exact time and silencing process in the developing brain are unclear. To address this, we developed a novel human neurodevelopmental model using naïve pluripotent stem cells (PSCs) differentiated into brain organoids. Unlike primed iPSCs, naïve iPSCs exhibit a globally demethylated genome, allowing us to reprogram methylated FM fibroblasts into naïve iPSCs with unmethylated FMR1. This enabled us to track FMR1 silencing during neurodifferentiation up to day 90, which we observed as early as day 12, significantly earlier than previously reported. Compared to healthy controls, patient-derived organoids displayed dysregulation of FMR1 mRNA and protein levels. Proteomic analysis revealed time-specific differentially expressed proteins, particularly those involved in neuronal maturation and autism-related pathways, including synaptic function and dendritic spine morphology at day 90. Single-cell analysis further linked these changes to specific mature neuronal types, such as GABAergic neurons, microglia-like cells, astrocytes, and oligodendrocytes. To dissect cell-type-specific contributions to FXS pathogenesis, we employed a metabolic non-canonical amino acid (ncAA) tagging approach. We generated transgenic FXS-derived naïve hiPSCs expressing MetRSL274G under neuronal (SYN1) or astrocytic (GFAP) promoters, enabling targeted protein labeling via click chemistry. In conclusion, our system provides new insights into the FMR1 silencing mechanism and allows the identification of cell-type-specific molecular targets for potential therapies.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome dell'X Fragile; Sindrome di Martin-Bell; FXS; Sindrome FRAXA; Sindrome FraX;

SVILUPPO DI UN MODELLO INNOVATIVO PER LO STUDIO DEL SILENZIAMENTO DI FMR1 E DELLE ALTERAZIONI CELLULARI SPECIFICHE NELLA SINDROME DELL'X FRAGILE

La Sindrome dell'X Fragile (FXS) è la principale forma di autismo ereditario, causato dal silenziamento del gene FMR1 a seguito dell'espansione e metilazione delle ripetizioni CGG nel suo promotore. Nonostante l'espressione attiva di FMR1 nel primo trimestre di gestazione, il processo di silenziamento nel cervello in via di sviluppo non è ancora chiaro. Pertanto, abbiamo sviluppato un nuovo modello umano di neurosviluppo usando cellule staminali pluripotenti naïve differenziate in organoidi cerebrali. L'uso di iPSCs naive permette la riattivazione di FMR1 dopo il reprogramming di fibroblasti derivati da pazienti. Con il seguente differenziamento in organoidi è stato possibile seguire il suo silenziamento fino al giorno 90, accaduto molto prima di quanto riportato da studi su villi coriali (D12). Rispetto ai controlli sani, gli organoidi derivati da pazienti hanno mostrato disregolazione nell'espressione di FMR1. Inoltre, abbiamo osservato proteine differenzialmente espresse specifiche dello stadio di sviluppo, principalmente legate alla maturazione neuronale e all'autismo a timepoints più tardivi. E' stato poi possibile collegare questi cambiamenti a specifici tipi di

neuroni maturi, come neuroni GABAergici, microglia, astrociti e oligodendrociti. Inoltre, abbiamo utilizzato un approccio di labeling con aminoacidi non canonici (ncAA) per distinguere i contributi cellulari alla patogenesi. Nello specifico, abbiamo generato linee trasgeniche MetRSL274G sotto i promotori neuronali (SYN1) o di astrociti (GFAP), permettendo il labeling mirato delle proteine tramite click-chemistry. In conclusione, il nostro sistema fornisce nuove prospettive sul meccanismo di silenziamento di FMR1 e consente l'identificazione di target molecolari specifici per tipi cellulati per potenziali terapie.

83

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Fragile X Syndrome

A NEW RNA-BASED THERAPY FOR THE FRAGILE X SYNDROME

E. Rosina[1], G. Pedini[1], G. Cecchetti[1], E. Rosina[1], G. Cencelli[1], V. Mercaldo[2], L. Pacini[3], M. Regoli[1], T. Achsel[2], M. Zimmer[4], P. G. V. Martini[4], C. Bagni[1]

[1]Rome, Università Di Roma Tor Vergata
[2]Lausanne, University of Lausanne
[3]Rome, UniCamillus, Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences
[4]Cambridge, Moderna, Inc.

Project: GGP20137; Bagni Claudia

The Fragile X Syndrome (FXS) is the most common form of monogenic intellectual disability and autism, caused by the absence of the Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 (FMRP). Currently, no cure is available for FXS. Recently, mRNA therapeutics arise as a novel approach with a potential application in drug development. Preclinical studies have successfully explored mRNA therapy in different human conditions, including genetic disorders, and current clinical efforts are corroborating these findings. mRNA therapeutics could be used in a wide range of diseases. Here, we explored mRNA-based therapy as a new category of compounds for FXS. We demonstrated a successfully delivery of FMR1 mRNA in mouse and human brain cells, leading to the efficient and correct FMRP synthesis. Moreover, the delivery of FMR1 mRNA rescued those cellular and molecular deficits that are considered hallmarks of FXS in both mouse primary neurons and in fibroblasts derived from Fragile X individuals. Fibroblasts are a valuable human cellular model that strengthens the translational potential of our findings. Together, these results shed light on a strong potential for the development of an innovative therapeutic intervention for FXS, based on the reintroduction of FMR1-mRNA in brain cells, with an immediate translational outcome.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome dell'X Fragile; Sindrome di Martin-Bell; FXS; Sindrome FRAXA; Sindrome FraX;

UN NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO PER LA SINDROME DELL'X FRAGILE BASATO SULL'RNA

La Sindrome dell'X Fragile (FXS) è la forma più comune di disabilità intellettiva monogenica e autismo, causata dall'assenza della proteina Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 (FMRP). Ad oggi non esiste una cura per la FXS. Recentemente, le terapie a base di RNA messaggero (mRNA) stanno emergendo come un nuovo approccio con un potenziale utilizzo nello sviluppo di farmaci. Studi preclinici hanno esplorato con successo la terapia con mRNA in diverse condizioni umane, comprese le malattie genetiche, ed attuali studi clinici stanno confermando questi risultati. Le terapie a base di mRNA potrebbero essere utilizzate in un'ampia gamma di patologie. In questo studio, abbiamo esplorato la terapia basata sull'utilizzo dell'mRNA come una nuova potenziale categoria di farmaci per la FXS. Abbiamo dimostrato il successo del trattamento con l'mRNA di FMR1 in cellule neuronali derivate dal modello animale e in cellule umane, portando a una sintesi efficiente e corretta della proteina FMRP. Inoltre, la somministrazione dell'mRNA di FMR1 ha permesso di migliorare quei difetti cellulari e molecolari che sono considerati caratteristiche distintive della FXS, sia nei neuroni primari di topo che nei fibroblasti derivati da individui con FXS. I fibroblasti rappresentano un prezioso modello cellulare umano che rafforza il potenziale traslazionale dei nostri risultati. Nel complesso, questi risultati evidenziano un forte potenziale per lo sviluppo di un'innovativa terapia per la FXS, basata sulla reintroduzione dell'mRNA di FMR1 nelle cellule neuronali, con un impatto traslazionale immediato.

84

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Multiple congenital anomalies/dysmorphic syndrome-intellectual disability

Non-syndromic intellectual disability

STRUCTURE-FUNCTION CHARACTERIZATION OF TANC2, A NOVEL POSTSYNAPTIC CANDIDATE ASSOCIATED TO NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS.

de Curtis Ivan [1], S. Surini[1]

[1]Milano, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GJC22031; de Curtis Ivan

Genetic/clinical evidence supports a role of poorly characterized scaffold TANC2 in excitatory postsynaptic development, with several mutations associated to neuropsychiatric disorders. Our goal is to explore the pathogenetic mechanisms underlying the diseases associated to TANC2. We identified TANC2 as substrate of a kinase targeting a protein network involved in motility and synaptic function. Based on prediction, TANC2 includes two intrinsically disordered regions (IDRs) at the N- and C-terminus, IDR-N and IDR-C, respectively. We hypothesize that TANC2 undergoes liquid-liquid phase separation (LLPS) with important functional consequences. By transfection of non-neuronal cells, we have shown that TANC2 and the isolated IDRs induce cytoplasmic biomolecular condensates expected to be driven by LLPS. On the other hand, deletion of either IDR-N or IDR-C differentially affects the formation of intracellular condensates. To address the biophysical properties of TANC2-induced condensates, we have used fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) on condensates formed by different TANC2 constructs, revealing that condensates formed by f.l. TANC2 and by IDR-C show liquid-like behavior, with preliminary data suggesting an effect of a patient's mutation in the IDR-C on the biophysical properties of condensates. In contrast, condensates by IDR-N have a solid-like behavior, suggesting a distinct contribution of the two IDRs on the structural/functional properties of TANC2. To address the functional consequences of interfering with TANC2 structural

properties on the formation of synapses we are addressing the role of TANC2 IDRs in postsynaptic assembly, by testing the effects on the recruitment of the binding partner PSD-95, both by a heterologous non-neuronal system, as well as in excitatory synapses in primary neurons, an experimental setup applied also to the analysis of specific patients-derived mutations.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome genetica da anomalie/dismorfismi congeniti multipli e disabilità intellettiva; Sindrome genetica da anomalie congenite multiple e disabilità intellettiva con o senza dismorfismi;

Disabilità intellettiva non sindromica

Caratterizzazione strutturale e funzionale di TANC2, un nuovo candidato postsinaptico associato a disordini neuropsichiatrici.

Evidenze cliniche e genetiche sostengono il ruolo di TANC2, una proteina poco studiata, nello sviluppo del terminale postsinaptico eccitatorio, con mutazioni associate a disordini neuropsichiatrici. L'obiettivo è quello di esplorare i meccanismi patogenetici all'origine delle malattie associate a TANC2. Abbiamo identificato TANC2 come substrato di una chinasi che fosforila un network di proteine coinvolte nella motilità cellulare e nella funzione sinaptica. TANC2 include due regioni intrinsecamente disordinate (IDR) all'N- e al C-terminale, IDR-N e IDR-C. Ipotizziamo che TANC2 vada incontro a separazione di fase liquido-liquido (LLPS) con importanti conseguenze funzionali. Trasfettando cellule non neuronali, abbiamo mostrato che sia TANC2 che le IDR isolate inducono condensati biomolecolari citoplasmatici che ci aspettiamo derivino da LLPS. D'altra parte, la delezione di IDR-N o di IDR-C ha effetti distinti sulla formazione dei condensati. Abbiamo utilizzato la FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) per caratterizzare le proprietà biofisiche dei condensati indotti da TANC2, scoprendo che i condensati formati dalla proteina intera o da IDR-C mostrano proprietà caratteristiche di un liquido; dati preliminari suggeriscono anche un effetto di una mutazione da paziente sulle proprietà biofisiche dei condensati. In contrasto, i condensati formati da IDR-N si comportano come solidi, suggerendo un contributo differente delle due IDR sulle proprietà strutturali e funzionali di TANC2. Per studiare le conseguenze di cambiamenti delle proprietà strutturali di TANC2 sulla formazione delle sinapsi, stiamo analizzando il ruolo delle IDR di TANC2 sulla costruzione del terminale postsinaptico, esaminando gli effetti sul reclutamento del partner PSD-95, sia in un sistema eterologo di cellule non neuronali, che nelle sinapsi eccitatorie di culture primarie di neuroni, un sistema sperimentale applicato anche all'analisi di specifiche mutazioni derivate da patienti.

85

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Non-specific syndromic intellectual disability

CLCN4-related X-linked intellectual disability syndrome

85INVESTIGATION OF NOVEL ACCESSORY PROTEINS OF NEURONAL ENDOSOMAL CLC-3 AND CLC-4 ANTIPORTERS INVOLVED IN NEURODEVELOPMENTAL DISORDERS

Pusch Michael[1], "M.A. Coppola[1], A. Tettey-Matey [1], A. Giusto[1], E. Rubino[1], I. Mazza[1], E. Gatta[2], C. Picco[1], R. Barbieri[1], A. Picollo[1] P. Gavazzo[1], F. Sbrana[1], E. Angeli[1], M. Festa[1]

[1]Genova, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Genova, Università Di Genova

Project: GMR24T1046; Pusch Michael

Variants in the related CLCN3 and CLCN4 genes cause developmental delay with highly variable symptoms and gravity. The genes encode CLC-3 and CLC-4, respectively, neuronal Cl/H(+) antiporters localized in endosomal membranes that play a role in endosomal ion homeostasis. While for some CLCs accessory proteins have been identified, no such subunits are known for CLC-3/-4. In preliminary experiments, we identified TMEM9 and TMEM9B, membrane proteins of unknown function, to interact strongly with CLC-3 and CLC-4. Co-expression reduced transporter mediated currents and altered properties of CLC-3 mediated currents. These completely novel interactors are likely to be highly relevant for the function of CLC-3 and CLC-4 and the investigation of the interaction could be crucial for understanding and treating CLCN3-4-conditions. In the present project we first intend to consolidate the interaction of CLC-3/-4 with TMEM9(B) in vitro using functional electrophysiological recordings as well as a quantitative protein-protein interaction assay using Förster Resonance Energy Transfer measurements based on fluorescence lifetime imaging (FLIM-FRET). Importantly, we also intend to test whether TMEM9(B) interacts with CLC-3 in vivo using co-localization and coimmunoprecipitation experiments in mouse neurons. Finally, we intend to test whether already studied and novel disease associated CLCN3/-4 variants that exhibit WT like characteristics in functional assays, affect transporter function by altering interaction with TMEM9(B) proteins, which could be a novel mechanism underlying CLCN3- 4-related conditions. The project tackles a novel discovery for CLCN3/-4 related conditions opening potentially new avenues for the development of care options and possible therapies.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Disabilità intelletttiva aspecifica sindromica

Disabilità intellettiva legata all'X correlata a CLCN4

STUDIO DI NUOVE PROTEINE ACCESSORIE DEGLI ANTIPORTER ENDOSOMIALI NEURONALI CLC-3 E CLC-4 COINVOLTI IN MALATTIE DELLO SVILUPPO NEURONALE

Più di mille geni differenti sono coinvolti in varie forme di disabilità intellettiva, ritardo nello sviluppo neurologico, neurodegenerazione ed altre patologie neurologiche che interessano pazienti pediatrici. Tra questi sono inclusi alcuni membri della famiglia genica CLC, CLCN3 e CLCN4, che codificano per proteine che trasportano anioni e sono importanti per il funzionamento delle strutture intracellulari dei neuroni, quali gli endosomi ed i lisosomi. Mutazioni di CLCN3 e CLCN4 sono state individuate in un numero crescente di azienti, che per lo più mostrano sintomi patologici subito dopo la nascita. Generalmente le proteine agiscono in concerto con altre proteine accessorie: tuttavia al momento non è stata individuata nessuna proteina che interagiscano con CLCN3 e CLCN4. Recentemente alcuni esperimenti preliminari ci hanno suggerito che TMEM9 e TMEM9B, due proteine di funzione ignota , interagiscano con CLCN3 e CLCN4. Infatti la loro coespressione riduce l'attività di CLCN3 e CLCN4 ed altera le proprietà di CLCN3.Questa scoperta è potenzialmente molto importante per comprendere i meccanismi molecolari alla base delle patologie causate da mutazioni di CLCN3 e CLCN4. In questo progetto ci proponiamo di caratterizzare in dettaglio l'interazione CLCN3/4-TMEM9/9B e verificarne la rilevanza in ambito patologico. In particolare valuteremo se questa interazione avviene realmente nei neuroni e se le varianti patologiche individuate la modificano provocando la malattia. L'individuazione di questi nuovi attori molecolari può ampliare le frontiere della ricerca sulle patologie

causate da mutazioni di CLCN3 e CLCN4 e fornire nuove strategie per la cura e la terapia dei pazienti.

86

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Non-specific syndromic intellectual disability

REGULATION OF DENDRITE AND DENDRITIC SPINE FORMATION BY TCF20

Sala Carlo[1], S. Beretta[1], V. Colombo[1], A. Zippo[1], C. Verpelli[1]

[1]Vedano al Lambro, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GMR22T1061; Sala Carlo

Mutations in the Transcription Factor 20 (TCF20) have been identified in patients with autism spectrum disorders (ASDs), intellectual disabilities (IDs), and other neurological issues. Recently, a new syndrome called TCF20-associated neurodevelopmental disorders (TAND) has been described, with specific clinical features. While TCF20's role in the neurogenesis of mouse embryos has been reported, little is known about its molecular function in neurons. In this study, we demonstrate that TCF20 is expressed in all analyzed brain regions in mice, and its expression increases during brain development but decreases in muscle tissue. Our findings suggest that TCF20 plays a central role in dendritic arborization and dendritic spine formation processes. RNA sequencing analysis revealed a downregulation of pre- and postsynaptic pathways in TCF20 knockdown neurons. We also found decreased levels of GABRA1, BDNF, PSD-95, and c-Fos in total homogenates and in synaptosomal preparations of knockdown TCF20 rat cortical cultures. Furthermore, synaptosomal preparations of knockdown TCF20 rat cortical cultures showed significant downregulation of GluN2B and GABRA5, while GluA2 was significantly upregulated. Overall, our data suggest that TCF20 plays an essential role in neuronal development and function by modulating the expression of proteins involved in dendrite and synapse formation and function.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Disabilità intelletttiva aspecifica sindromica

REGOLAZIONE DELLA FORMAZIONE DI DENDRITI E SPINE DENDRITICHE MEDIATA DA TCF20

"Le mutazioni nel fattore di trascrizione 20 (TCF20) sono state identificate in pazienti con disturbi dello spettro autistico (ASD), disabilità intellettive (ID) e altre problematiche neurologiche. Recentemente è stata descritta una nuova sindrome chiamata disturbi dello sviluppo neurologico associati a TCF20 (TAND), caratterizzata da specifici tratti clinici. Sebbene il ruolo di TCF20 nella neurogenesi degli embrioni di topo sia stato riportato, poco si sa sulla sua funzione molecolare nei neuroni.

In questo studio dimostriamo che TCF20 è espresso in tutte le regioni cerebrali analizzate nei topi e che la sua espressione aumenta durante lo sviluppo cerebrale, ma diminuisce nei tessuti muscolari. I nostri risultati suggeriscono che TCF20 svolge un ruolo centrale nei processi di arborizzazione dendritica e formazione delle spine dendritiche. L'analisi di sequenziamento dell'RNA ha rivelato una riduzione delle vie pre- e postsinaptiche nei neuroni con ridotta espressione di TCF20. Abbiamo inoltre osservato una diminuzione dei livelli di GABRA1, BDNF, PSD-95 e c-Fos negli omogeneati totali e nelle preparazioni sinaptosomiali delle colture corticali di ratto con knockdown di TCF20. Nelle stesse preparazioni sinaptosomiali si è riscontrata una significativa riduzione di GluN2B e GABRA5, mentre GluA2 risultava significativamente sovraregolata. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che TCF20 svolge un ruolo essenziale nello sviluppo e nella funzione neuronale, modulando l'espressione di proteine coinvolte nella formazione e nel funzionamento di dendriti e sinapsi."

87

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Non-syndromic intellectual disability

87UNRAVELLING WASHC4 BRAIN-SPECIFIC FUNCTION TO UNCOVER ITS IMPLICATION IN INTELLECTUAL DISABILITY

F.C. Guarnier[1], L. Murru[1], G. Casati[2], P. D'Adamo[2]

[1]Vedano al Lambro, Italy, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Milano, Italy, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GJC22011; D'Adamo Patrizia, Guarnieri Fabrizia Claudia

Genetic variants in the human WASHC4 gene are rare and cause Autosomal Recessive Intellectual Disability (ARID) and other neurodevelopmental disorders. The WASHC4 protein, also known as SWIP, is part of the WASH (Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homology) protein complex, which plays an important role in actin dynamics and endosomal trafficking in non-neuronal cells. However, the function of WASHC4 in neurons is poorly characterized. A recent study revealed that a missense mutation (p.Pro1019Arg) in WASHC4 perturbs the abundance of several endosomal and post-synaptic proteins in knock-in mouse (SWIPP1019R) brains, and a limited behavioural assessment in mice revealed cognitive and movement impairments. Our major interest is to understand how mutations affecting WASHC4 function may alter synaptic structure, composition and function through a perturbation of intracellular vesicular trafficking and sorting of synaptic proteins. To do so, we are characterizing the SWIPP1019R knock-in mouse model in terms of molecular, electrophysiological and behavioural phenotypes. Preliminary results obtained with patch-clamp recording of hippocampal dentate gyrus granule cells showed significant alterations in neuronal excitability and spontaneous synaptic activity in knock-in mice as compared to controls. Our results are expected to provide new insights in the role of WASHC4 in neuronal cell biology, brain development and cognition.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Disabilità intellettiva non sindromica

SCOPRIRE LA FUNZIONE CEREBRALE SPECIFICA DI WASHC4 PER SCOPRIRE LA SUA IMPLICAZIONE NELLA DISABILITÀ INTELLETTIVA

"Le varianti genetiche del gene umano WASHC4 sono rare e causano la disabilità intellettiva autosomica recessiva (ARID) e altri disturbi del neurosviluppo. La proteina WASHC4, nota anche come SWIP, fa parte del complesso proteico WASH (Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homology), che svolge un ruolo importante nella dinamica dell'actina e nel traffico endosomiale nelle cellule

non neuronali. Tuttavia, la funzione di WASHC4 nei neuroni è scarsamente caratterizzata. Uno studio recente ha rivelato che una mutazione missense (p.Pro1019Arg) in WASHC4 altera la quantità totale di diverse proteine endosomiche e post-sinaptiche in cervelli di topi knock-in (SWIPP1019R). Inoltre, una valutazione comportamentale ha rivelato disturbi cognitivi e del movimento. Il nostro interesse principale è capire come le mutazioni che influenzano la funzione di WASHC4 possano alterare la struttura, la composizione e la funzione sinaptica attraverso una perturbazione del traffico vescicolare intracellulare e dello smistamento delle proteine sinaptiche. A tal fine, stiamo caratterizzando il modello murino knock-in SWIPP1019R in termini di fenotipi molecolari, elettrofisiologici e comportamentali. I risultati preliminari ottenuti con la registrazione in patch-clamp delle cellule granulari del giro dentato dell'ippocampo hanno mostrato alterazioni significative dell'eccitabilità neuronale e dell'attività sinaptica spontanea nei topi knock-in rispetto ai controlli. I nostri risultati dovrebbero fornire nuove conoscenze sul ruolo di WASHC4 nella biologia delle cellule neuronali, nello sviluppo cerebrale e nella cognizione."

88

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Intellectual developmental disorder, X-linked, OPHN1

IMPACT OF OPHN1 MUTATION ON BEHAVIOUR AND BRAIN NETWORK DYNAMICS

Lodovichi Claudia[1], A. di Soccio[1], M. Brondi[1], M. Albanese[2], P. Billuart[3]

[1]Pisa, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche"
[2]Padova, Istituto Veneto Di Medicina Molecolare (VIMM)
[3]Paris, INSERM

Project: GMR23T1055; Lodovichi Claudia

Intellectual Disability-Autism Spectrum Disorder (ID-ASD) are complex neurodevelopmental diseases characterized by a wide spectrum of deficits in cognitive, social, and adaptive functions. Among the X-linked gene associated with ASD-ID, Oligophrenin1 (OPHN1) encodes a Rho GTPase-activating protein (Rho-GAP) expressed in neurons and non-neuronal cells, during development and in adulthood, in brain areas with a high degree of plasticity, such as the cortex, the hippocampus, and the olfactory bulb (OB). Evidence indicates that part of the ID-ASD pathology can be ascribed to defects in synaptic morphology and function3-5. Most of these studies have been conducted in vitro, leaving the impact of OPHN1 mutation at systems level unaddressed. Here, we analyzed the role of OPHN1 on olfactory behavior and network dynamics, in OPHN1-/y mice. Olfaction offers a suitable brain area to address these questions, not only because OPHN1 is here highly expressed, but also because it allows to investigate sensory and cognitive functions, both affected in ID-ASD. We found that OPHN1 exhibited impairments in olfactory tasks, with social and non-social odors. Electrophysiological recordings in the OB of freely behaving OPHN1-/y mice revealed power alterations in beta and gamma bands with respect to WT controls. To analyze the organization and dynamics of the neuronal population of OPHN1-/y mice, we performed two-photon Ca2+ imaging. Single-cell activity and network organization were severely impaired in OPHN1-/y with respect to controls. We performed dual recordings in the OB and the prefrontal cortex (PFC) to dissect the neuronal basis of cognitive defects. Spectral analysis of electrophysiological signal and coherence between OB and PFC showed significant alterations in local circuits and communication between brain areas.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Disabilità intellettiva dello sviluppo, OPHN1

IMPATTO DI OPHN1 SUL COMPORTAMENTO E SULLA ATTIVITÀ DEI CIRCUITI NEURONALI

Disabilità intellettiva e autismo (DI-A) sono complesse patologie del neurosviluppo caratterizzate da un ampio spettro di alterazioni cognitive e sociali, con diverso grado severità. Tra i geni associati a DI-A, Oligofrenin1 (OPHN1) codifica per una proteina che attiva le Rho GTPase. OPHN1 è espressa in cellule neuronali e non, sia durante lo sviluppo che in età adulta, in aree cerebrali con un alto livello di plasticità quali la corteccia, l'ippocampo e il bulbo olfattivo. Molte evidenze indicano che DI-A possono essere in gran parte ascritte a difetti di morfologia e funzione della sinapsi. La maggior parte degli studi è stata condotta in vitro, lasciando aperta la domanda dell'impatto delle mutazioni di OPHN1 sul cervello, in vivo. Qui abbiamo analizzato l'impatto di OPHN1 sul comportamento olfattivo e sull'attività neuronale, in topi mutati, non esprimenti OPHN1. Il sistema olfattivo è particolarmente indicato per questi studi, in quanto permette di analizzare sia le funzioni sensoriali sia le funzioni cognitive, entrambe affette in ID-A. Abbiamo trovato che i topi mutati OPHN1 esibivano difetti in test di discriminazione tra odori sociali verso odori privi di valenza sociale. Registrazioni elettrofisiologiche nel bulbo olfattivo nei topi mutati hanno mostrato alterazioni nelle oscillazioni cerebrali, in particolare beta e gamma. Registrazioni di attività neuronale al microscopio a due fotoni hanno evidenziato alterazioni nelle risposte delle singole cellule, e nella attività e organizzazione funzionale dei circuiti neuronali. Le basi neuronali dei difetti cognitivi sono state investigate con doppie registrazioni, nel bulbo olfattivo e in corteccia prefrontale, una regione importante per le funzioni cognitive. I risultati mostrano difetti nelle singole aree e nella comunicazioni tra le due aree, fattori chiave nella codifica delle funzioni sensoriali e cognitive.

89

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Rett syndrome

SPHINGOLIPID METABOLIC IMBALANCE IN MURINE AND HIPSC RTT MODELS: DEVELOPMENT OF A DRUG REPURPOSING-BASED THERAPY

S. Fioriniello[1], A. Asaro[2], I. Donnarumma[1], A. Aquino[1], L. Capolupo[2], D. Marano[1], G. Pepe[3] ,V. Alari[4], S. Perego[4], L. Pisapia[1], A. Barra[1], L. Mele[1], V. Maglione[3], S. Russo[4], G. D'Angelo[2], F. Della Ragione[1]

[1]Naples, Naples, Institute of Genetics and Biophysics "A.Buzzati-Traverso", National Research Council of Italy, Naples, Italy
[2]Lausanne, Interfaculty Institute of Bioengineering, École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), Switzerland
[3]Isernia, Istituto Neurologico Mediterraneo Neuromed - IRCCS
[4]Milan, Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italy - IRCCS

Project: GMR23T2182; Della Ragione Floriana

Rett syndrome (RTT, OMIM 312750) is a severe neurodevelopmental disease affecting primarily girls, characterized by severe intellectual and motor disabilities, mostly caused by mutations in the MECP2 gene, encoding an epigenetic factor crucial for brain functioning. The RTT pathogenic mechanism is still unclear and no definitive cure is available. We found that MeCP2 dysfunctions lead to altered sphingolipid (SL) content in the brain of Mecp2-/y male and Mecp2-/+ female mice, possibly, through deregulation of genes encoding factors implicated in SL metabolism. We confirmed perturbations of SL metabolism in murine neurons carrying the two most common MeCP2 mutations T158M and R306C and induced-pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons from RTT patients. Ongoing experiments are suggestive of impaired SL metabolism also in brain of Mecp2R306C/y mice. These data support a novel role of MeCP2 in the regulation of SL metabolism and identify the SL metabolism as a novel druggable pathway that, when altered, might contribute to RTT pathogenesis. Thus, a pharmacological treatment aimed at correcting SL metabolism might mitigate RTT symptomatology. The treatment of Mecp2-/y mice with Fingolimod, a sphingosine 1-phosfate (S1P) analog crossing the blood-brain barrier and approved for the treatment of Multiple Sclerosis, prolonged the lifespan, decreased the RTT phenotypic score, preserved Mecp2-/y mice from the weight loss, and seems to retrieve SL metabolic defects in brain. Moreover, a treatment of Mecp2-/y mice with Ozanimod, a next-generation more selective and approved S1P analog, which displays milder adverse events, highlighted an attenuation of RTT-like phenotype. A pilot in vitro study suggests the ability of this drug to target SL metabolism. This evidence pinpoints Ozanimod as the ideal therapeutic candidate to correct alterations of SL metabolism and attenuate RTT symptoms, and pave the way for the design of therapeutic protocols for RTT patients."

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Rett; RTT, RTS

SBILANCIAMENTO DEL METABOLISMO DEGLI SFINGOLIPIDI IN MODELLI MURINI E HIPSC RTT: SVILUPPO DI UNA TERAPIA BASATA SUL RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI.

La sindrome di Rett è una malattia del neurosviluppo che colpisce principalmente le bambine, caratterizzata da disabilità intellettive e motorie. Il meccanismo patogenetico RTT è ancora poco chiaro e non esiste una cura definitiva. La RTT è causata principalmente da mutazioni nel fattore epigenetico MeCP2, una proteina chiave per il funzionamento del cervello. Abbiamo scoperto che le disfunzioni di MeCP2 portano a un contenuto alterato degli sfingolipidi (SL) nel cervello di topi Mecp2-/y maschi e Mecp2-/+ femmine, probabilmente a causa dell'alterata espressione di geni implicati nel metabolismo degli SL. Tali alterazioni sono state confermate in neuroni murini portatori di due mutazioni RTT comuni, T158M e R306C, e in neuroni derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) da pazienti. Esperimenti in corso suggeriscono un metabolismo alterato degli SL anche in topi Mecp2R306C/y. Questi dati supportano un nuovo ruolo di MeCP2 nella regolazione del metabolismo degli SL e identificano quest'ultimo come un nuovo bersaglio farmacologico che, se alterato, potrebbe contribuire alla patogenesi della RTT. Pertanto, un trattamento farmacologico mirato a correggere il metabolismo degli SL potrebbe mitigare la sintomatologia RTT. Il trattamento di topi Mecp2-/y con Fingolimod, un analogo della sfingosina 1-fosfato (S1P) che attraversa la barriera ematoencefalica, approvato per il trattamento della sclerosi multipla, attenua la sintomatologia RTT e sembra correggere i difetti degli SL. Inoltre, un trattamento di topi Mecp2-/y con Ozanimod, un analogo della S1P di nuova generazione più selettivo e approvato, associato a lievi eventi avversi, ha evidenziato la mitigazione del fenotipo RTT. Studi in vitro suggeriscono la capacità dell'Ozanimod di modulare il metabolismo degli SL. Queste evidenze identificano l'Ozanimod come il candidato terapeutico ideale per correggere le alterazioni degli SL e attenuare i sintomi RTT, aprendo la strada a nuovi protocolli terapeutici.

90

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Rett syndrome

90ANALYSIS OF MECP2 INTERACTION WITH THE SPLICING FACTOR PRPF40B AND POTENTIAL IMPLICATIONS FOR RETT SYNDROME PATHOGENESIS

S. Gasparini[1], L. Giordano[2], S. Croci[3], S. Pastore[4],I. Meloni[4], C. Mannironi[1]

[1]Roma, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Roma, Università Di Roma La Sapienza
[3]Siena, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese - Policlinico Le Scotte
[4]Siena, Università Di Siena

Project: GJC22071; Mannironi Cecilia, Meloni Ilaria

Rett syndrome (RTT, OMIM #312750) is a rare X-linked neurodevelopmental disorder caused in over 95% of cases by mutations in the Methyl-CpG-binding Protein 2 (MECP2) gene. MECP2 encodes a multifunctional protein implicated in gene transcription, chromatin organization, and RNA splicing. However, MeCP2 functions and the molecular mechanisms that mediate RTT neuropathology are still partially unknown. Little attention has been given so far to the role of MeCP2 in RNA maturation and to the contribution of alternative splicing dysregulation to RTT pathophysiology. The present study aims to characterize the binding complex between MeCP2 and PRPF40B, a pre-mRNA processing factor implicated in alternative splicing regulation. By co-immunoprecipitation, we demonstrate the binding of MeCP2 to PRPF40B in HEK-293 and SH-SY5Y human cell lines. By analyzing WT and RTT-causing MECP2 mutant constructs, we show that the large C-terminal truncating mutation (p.R168X) abolishes the binding to PRPF40B. To go deeper into the functional meaning of MeCP2/PRPF40B interaction, ribonucleoprotein (RNP) complexes will be isolated from SH-SY5Y neuroblastoma cells and the bound RNA characterized. As a final goal, we aim to characterize gene expression and alternative splicing profiles associated with MECP2 p.R168X mutation in RTT patients. Accordingly, we differentiate iPSCs derived from two patients with the p.R168X mutation into neurons. A comprehensive transcriptomic analysis of p.R168X and isogenic WT neurons will enable the identification of differentially expressed and differentially spliced genes associated with the MECP2 mutation. In parallel, PRPF40B knock-down in WT and p.R168X neurons will allow us to elucidate its role in MeCP2-mediated splicing regulation. Bioinformatic analyses will infer key genes and pathways related to the disease, highlighting potential targets for developing new therapies.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Rett; RTT, RTS

ANALISI DELL'INTERAZIONE DI MECP2 CON IL FATTORE DI SPLICING

PRPF40B E POTENZIALI IMPLICAZIONI PER LA PATOGENESI DELLA SINDROME DI RETT

La sindrome di Rett (RTT, OMIM #312750) è una patologia rara del neurosviluppo, associata al cromosoma X e causata in oltre il 95% dei casi da mutazioni del gene MECP2 (Methyl-CpG-binding Protein 2). MeCP2 è una proteina multifunzionale implicata nella trascrizione genica, nell'organizzazione della cromatina e nello splicing dell'RNA. Tuttavia le funzioni di MeCP2 ed i meccanismi molecolari che mediano la neuropatologia della RTT sono ancora in parte sconosciuti. Limitate sono le conoscenze del ruolo di MeCP2 nella maturazione dell'RNA e sul contributo di difetti nello splicing alla fisiopatologia della RTT. Il presente studio è volto alla caratterizzazione del legame tra MeCP2 e PRPF40B, un fattore di processamento del pre-mRNA, implicato nella regolazione dello splicing. Mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione abbiamo dimostrato l'interazione tra MeCP2 e PRPF40B nelle linee cellulari umane HEK-293 e SH-SY5Y. Mediante l'analisi di costrutti per l'espressione di MECP2 WT e di suoi mutanti associati alla RTT, abbiamo dimostrato che una mutazione che causa una delezione del C-terminale (p.R168X) determina perdita dell'attività di legame con PRPF40B. Per approfondire il significato funzionale dell'interazione MeCP2/PRPF40B, l'RNA verrà isolato dai complessi ribonucleoproteici in cellule SH-SY5Y e caratterizzato tramite sequenziamento. Come obiettivo ultimo ci proponiamo di definire il profilo di espressione genica e di splicing alternativo associato alla mutazione MECP2 p.R168X nei pazienti RTT. A questo scopo stiamo differenziando cellule staminali pluripotenti (iPSC) derivate da due pazienti con la mutazione p.R168X in neuroni. Parallelamente, il silenziamento di PRPF40B nei neuroni WT e p.R168X e successiva analisi trascrittomica ci consentirà di chiarire il suo ruolo nella regolazione dello splicing mediata da MeCP2. Infine, geni con splicing alterato e pathway ad essi associati potrebbero rappresentare potenziali target per lo sviluppo di nuove terapie.

91

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Rett syndrome

THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF ATM INHIBITION IN RETT SYNDROME: INSIGHTS FROM BEHAVIORAL AND MOLECULAR STUDIES

Selimi Anna[1], C. Cambria[1], S. Briguglio[1], M. V. Zavaglia[1] F. Antonucci[1]

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GSA22F003; Antonucci Flavia

Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) is primarily involved in DNA repair, but recent studies have revealed a novel function in regulating KCC2, a potassium chloride co-transporter essential for the excitatory-to-inhibitory "GABA switch", fundamental during GABAergic system maturation. In Rett Syndrome (RTT), a severe X-linked neurodevelopmental disorder affecting females and caused by MeCP2 mutations, ATM is abnormally upregulated in the hippocampus. This contributes to the reduced KCC2 expression and delay of the GABA switch, ultimately disrupting the excitatory/inhibitory (E/I) balance, involved in RTT's socio-cognitive, motor, and respiratory impairments. Based on promising in vitro results, we explored ATM inhibition as a therapeutic strategy by administering KU-55933 (KU), a selective ATM kinase inhibitor, intranasally to Mecp2y/- (KO) mouse model of RTT. Behavioral tests (Y-maze, Novel Object Recognition, Three-chamber, Rotarod, and Plethysmography) revealed that KU improved hippocampal cognition and reduced apnea frequency, a critical RTT symptom, though it did not improve motor deficits. Biochemical analysis of hippocampal tissue showed that KU preserved KCC2 expression and normalized elevated vGAT levels, a marker of inhibitory synapses. These findings suggest a partial restoration of the delayed GABA switch and correction of the E/I imbalance. However, the therapeutic effects were transient, as most symptoms reappeared after the washout period, highlighting the need for continuous administration. Notably, the beneficial effect on apneas was more evident post-washout. In conclusion, ATM inhibition via KU represents a promising therapeutic approach to mitigate RTT's symptoms by targeting the underlying molecular dysfunctions. However, further research is needed to understand its specific role in preventing apnea worsening, investigating its influence on the respiratory centers, as well as its effects in female models.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Rett; RTT, RTS

IL POTENZIALE TERAPEUTICO DELL'INIBIZIONE DI ATM NELLA SINDROME DI RETT: EVIDENZE DA STUDI COMPORTAMENTALI E MOLECOLARI

La proteina ATM, nota per il suo ruolo nel riparo del DNA, regola anche KCC2, un trasportatore di potassio e cloro necessario per il "GABA switch", processo fondamentale per rendere il GABA un neurotrasmettitore inibitorio e permettere così la maturazione del sistema nervoso. La Sindrome di Rett (RTT) è una grave patologia del neurosviluppo che colpisce principalmente le bambine ed è causata da mutazioni nel gene MeCP2. In questa condizione, i livelli di ATM risultano elevati nell'ippocampo, contribuendo così a ridurre l'espressione di KCC2 e ritardando il "GABA switch". Questo contribuisce ai problemi cognitivi, motori e respiratori tipici della malattia. Basandosi sui risultati promettenti ottenuti in laboratorio, abbiamo testato la somministrazione intranasale del composto KU-55933 (KU), un inibitore specifico di ATM, a un modello murino di RTT, come possibile terapia. I test comportamentali condotti hanno mostrato che KU migliora le funzioni cognitive ippocampali e riduce la frequenza delle apnee, sintomo critico della patologia, senza influire sui deficit motori. Le analisi dei tessuti ippocampali hanno rivelato che KU preserva i livelli di KCC2 e normalizza quelli di vGAT, un marcatore delle sinapsi inibitorie. Possiamo così dedurre che KU porti a un parziale recupero del ritardato "GABA switch". Tuttavia, gli effetti terapeutici risultano temporanei, poiché la maggior parte dei sintomi ricompare dopo l'interruzione del trattamento, sottolineando la necessità di una somministrazione continua. Tuttavia, il miglioramento delle apnee è stato più evidente dopo la sospensione del trattamento. In conclusione, l'inibizione di ATM potrebbe rappresentare una strategia promettente per alleviare i sintomi della RTT, agendo direttamente sui meccanismi molecolari alla base della malattia. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio il suo ruolo nella regolazione delle apnee e la sua efficacia nei modelli femminili della malattia.

92

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Rett syndrome

EVIDENCE-BASED APPROACH TO TREAT HYPEREXCITABILITY IN RETT SYNDROME THROUGH SPLICING MODULATION

Paplekaj Arteda[1], C. Forastieri[2], A. Antoniazzi[1], E. Codini[1], E. Toffolo[1], F. Rusconi[1], E. Battaglioli[1]

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Stockholm, Department of Neuroscience, Karolinska Institute

Project: GGP20016; Battaglioli Elena

Rett syndrome is a severe X-linked neurodevelopmental disorder primarily caused by Mecp2 mutations, sharing traits with the autistic spectrum. Affected girls exhibit stereotypies, loss of behavioral milestones such as language and movement, and drug-resistant epileptic crises. Recent studies unveiled increased spontaneous glutamate release and glutamate-related excitotoxicity which contribute to hyperexcitability and maladaptive neural wiring, potentially contributing to Rett syndrome pathological features. Our lab identified an epigenetic mechanism regulating glutamatergic homeostasis, likely evolved to prevent excessive excitation in the mammalian brain. This system relies on alternative splicing of the transcriptional corepressor LSD1, which suppresses excitatory neuroplastic genes, including Immediate Early Genes and key post-synaptic actors like SAP proteins, AMPA receptors, and PSD95, limiting neuronal excitability. In the brain, LSD1 activity is hampered by the inclusion of microexon E8a, which disrupts its co-repressive function. Upon neuronal activation, mature transcripts exclude E8a, favoring LSD1-mediated repression to maintain homeostasis. Our project demonstrated that genetically enhancing LSD1 activity in MeCP2Y/- mice reduces seizure susceptibility and doubles survival rate after chemoconvulsant treatment. We are now exploring a pharmacological approach using an exon-E8a-skipping antisense oligonucleotide (ASO-E8a) to enhance corepressive LSD1 activity in the mouse hippocampus, a key epileptic region. Based on preliminary genetic evidence, we believe this strategy could effectively increase the excitatory threshold, reducing brain hyperexcitability as a primary outcome in Rett syndrome. Our initial findings, following a single-dose administration of ASO-E8a into the central hippocampus of MeCP2Y/- mice, suggest an improvement in locomotor activity, gait, and overall health of the model.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Rett; RTT, RTS

STRATEGIA EVIDENCE-BASED PER TRATTARE L'IPER-ECCITABILITÀ NELLA SINDROME DI RETT ATTRAVERSO LA MODULAZIONE DELLO SPLICING.

La sindrome di Rett è un grave disturbo del neurosviluppo X-linked causato da mutazioni di Mecp2, con tratti condivisi con lo spettro autistico. Le pazienti mostrano stereotipie, regressione del linguaggio e del movimento e crisi epilettiche resistenti ai farmaci. Studi recenti hanno evidenziato un aumento del rilascio spontaneo di glutammato e un'eccitotossicità glutammato-mediata, fattori che contribuiscono all'iper-eccitabilità e a un'alterata connettività neuronale. Il nostro laboratorio ha identificato un meccanismo epigenetico che regola il rilascio di glutammato, probabilmente evolutosi per limitare l'eccessiva eccitazione cerebrale. Questo sistema si basa sullo splicing alternativo del corepressore LSD1, che sopprime geni neuroplastici eccitatori, tra cui Immediate Early Genes e proteine sinaptiche chiave come SAP, recettori AMPA e PSD95, riducendo così l'eccitabilità neuronale. L'attività di LSD1 è inibita dall'inclusione del microesone E8a, che ne compromette la funzione corepressiva. Dopo l'attivazione neuronale, i trascritti maturi escludono E8a, favorendo la repressione mediata da LSD1 per mantenere l'omeostasi. Il nostro studio ha dimostrato che un aumento genetico dell'attività di LSD1 nei topi MeCP2Y/- riduce la suscettibilità alle crisi epilettiche e raddoppia la sopravvivenza dopo trattamento chemoconvulsivante. Stiamo ora esplorando un approccio farmacologico con un oligonucleotide antisenso (ASO-E8a) per mascherare l'esone E8a e potenziare l'attività corepressiva di LSD1 nell'ippocampo murino, una regione cruciale per l'epilessia. Sulla base di dati genetici preliminari, riteniamo che questa strategia possa aumentare la soglia di eccitazione e ridurre l'iper-eccitabilità cerebrale, aspetto chiave della sindrome di Rett. I primi risultati, ottenuti con una singola somministrazione di ASO-E8a nell'ippocampo centrale di topi MeCP2Y/-, indicano un miglioramento della locomozione, dell'andatura e dello stato generale del modello.

93

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

Rett syndrome

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

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

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Milano, Humanitas University

Project: GJC21044; Landsberger Nicoletta, Pozzi Davide

To dissect the contribution and timing of HPCAL4 to neurodevelopment and Rett syndrome (RTT), we developed a three-sided spatio-temporal approach aimed at revealing: 1) Hpcal4 protein expression in WT and RTT mice and neurons; 2) endogenous Hpcal4 subcellular localization and 3) Hpcal4-downregulation effects on calcium homeostasis in resting and depolarized neurons. We found that Hpcal4 protein level increases during cortical and hippocampal maturation, while it decreases in cerebellum and brainstem of WT mice. In P20 Mecp2 KO male brains, Hpcal4 protein level was unaffected compared to WT, despite a general downregulation at P40 and P60, being more prominent in the cerebellum at P40. Consistently with this, Hpcal4 protein expression increased in maturing WT cortical neurons and decreased starting from DIV19 in KO. Endogenous Hpcal4 is localized in the cytoplasm of the soma, dendrites and spines in cultured neurons in resting condition, while upon depolarization, it appears to be more associated with the plasma membrane. Colocalization with presynaptic markers revealed no preferential localization neither in the inhibitory, nor in the excitatory presynaptic compartment, but the portion of the excitatory presynaptic markers colocalizing with Hpcal4 increased with neuronal maturation. We infected neurons with a shRNA to mimick the downregulation of Hpcal4 seen in RTT, to monitor its effect on network activity. We observed an increase in the global mean firing rate in Hpcal4-downregulated neurons , with no alterations in neuronal excitability. The basal calcium level was reduced, while an increased glutamatergic and a slightly reduced GABAergic

neurotransmission resulted in higher E/I ratio. These data indicate that Hpcal4 regulates global network activity by setting the basal Ca2+ level in neurons, which influences the E/I synaptic ratio. Lastly, a proteomic study led to the identification of three Hpcal4 targets, confirming its function at the synaptic level.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Sindrome di Rett; RTT, RTS

STUDIO DI HPCAL E DELLA SUA INTERAZIONE CON MECP2: IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI UN NUOVO POSSIBILE BERSAGLIO TERAPEUTICO PER IL TRATTAMENTO DELLA SINDROME DI RETT

"Per studiare il contributo di Hpcal nella sindrome di Rett, abbiamo sviluppato un triplice approccio con l'obiettivo di analizzare: 1) i livelli di espressione di Hpcal4 in neuroni e topi WT e Rett (RTT); 2) la localizzazione subcellulare di Hpcal4 e 3) l'effetto della sua downregolazione sull'omeostasi del calcio in neuroni in vitro. L'espressione di Hpcal4 aumenta durante lo sviluppo della corteccia e dell'ippocampo, mentre diminuiscono nel cervelletto e nel tronco encefalico di topi WT. In cervelli di topi maschi Mecp2 KO, i livelli proteici di Hpcal4 rimangono invariati rispetto ai WT, ma si osserva una generale diminuzione a P40 e P60, che risulta più consistente nel cervelletto a P40. In accordo con quanto osservato, i livelli proteici di Hpcal4 aumentano durante la maturazione di neuroni corticali WT e diminuiscono in neuroni KO a partire da DIV19. In condizioni basali, Hpcal4 endogena è solubile e diffusa nel soma, dendriti e spine dendritiche, mentre si associa alla membrana quando i neuroni vengono sottoposti a stimoli depolarizzanti. Le analisi con marker presinaptici non hanno rilevato alcuna localizzazione preferenziale, né con marker inibitori, né con quelli eccitatori, ma la colocalizzazione di Hpcal4 con marker presinaptico eccitatorio aumenta all'aumentare della maturazione neuronale. Per verificare il coinvolgimento di Hpcal4 nell'attività del network corticale, i neuroni sono stati infettati con shRNA per riprodurre in vitro la downregolazione osservata nei campioni RTT. Nei neuroni downregolati per Hpcal4 è stato osservato un aumento generale nel mean firing rate, nonostante non ci sia alcuna alterazione nell'eccitabilità neuronale. I livelli basali di calcio sono ridotti. La neurotrasmissione eccitatoria aumenta mentre quella inibitoria diminuisce con conseguente aumento nella Excitation/Inhibition balance. Attraverso analisi proteomica abbiamo identificato tre bersagli di Hpcal4 che confermerebbero il suo ruolo alla sinapsi."

94

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

X-linked non-syndromic intellectual disability

ASSESSING THE CONSEQUENCES OF AMPARS DEFECTIVE TRANSPORT IN AP4 DEFICIENCY MOUSE MODEL

B. Valentino[1], L. Murru[1], F.C. Guarnieri[1], E. Moretto[1], M. Passafaro[1]

[1]Vedano al Lambro, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GJC21035; Passafaro Maria

Mutations in the genes encoding for adaptor protein complex 4 (AP-4) subunits cause a rare syndrome characterized by severe intellectual disability and progressive spastic paraplegia, known as AP-4 deficiency syndrome. The AP- 4 complex is known to associate with α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors (AMPARs). Our preliminary results revealed a reduction in GluA2 surface levels in hippocampal neurons following knockdown of the AP-4β or AP-4ε subunits. These findings were confirmed and extended to include GluA1 and GluA3 subunits in hippocampi from AP4E1 knockout (KO) mice, using bis (sulfosuccinimidyl)suberate (BS3), a molecule capable of crosslinking proteins exposed at the plasma membrane. Functionally, miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) from CA1 neurons showed increased frequency and amplitude, with decreased decay time in AP4E1 KO mice vs WT mice. These findings may reflect alterations in AMPAR subunit composition, specifically the absence of GluA2.Furthermore, multi-electrode arrays recordings, revealed an alteration in network activity in AP4E1 KO mice, probably due to GluA2 absence. Multi-electrode array recordings revealed altered network activity in KO mice, with increased burst duration and number, suggesting excitatory imbalance from AMPAR changes. Behavioral tests assess anxiety, memory, and sociability. In the open field test, KO mice spent less time in the arena center and groomed more, suggesting anxiety. Further behavioral analysis using Fiber photometry will examine calcium dynamics and brain regions involved in cognitive deficits. Our findings suggest AP-4's critical role in AMPAR subunit regulation. Future studies will elucidate subunit degradation mechanisms and cognitive impact

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Disabilità intellettiva legata all'X non sindromica

ANALISI DELLE CONSEGUENZE DEL TRASPORTO DIFETTIVO DI AMPAR IN UN MODELLO MURINO CON DEFICIT DI AP4

Le mutazioni nei geni che codificano per le subunità del complesso della proteina adattatrice 4 (AP-4) causano una rara sindrome caratterizzata da grave disabilità intellettiva e paraplegia spastica progressiva, nota come sindrome da deficit di AP-4. È noto che il complesso AP-4 si associa ai recettori dell'acido α-amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico (AMPAR). I nostri risultati preliminari hanno rivelato una riduzione dei livelli di GluA2 sulla superficie dei neuroni dell'ippocampo silenziate delle subunità AP-4β o AP-4ε. Questi risultati sono stati confermati negli ippocampi di topi knockout (KO) per AP4E1. A livello funzionale, le correnti spontanee sinaptiche eccitatorie (mEPSC) registrate nei neuroni CA1 hanno mostrato un aumento della frequenza e dell'ampiezza nei topi KO AP4E1 rispetto ai topi WT. Questi risultati potrebbero riflettere alterazioni nella composizione delle subunità di AMPAR, in particolare dell'assenza di GluA2. Inoltre, le registrazioni con multi -elettrodi arrays (MEA) hanno rivelato un'alterazione dell'attività della rete neuronale nei topi KO, probabilmente dovuta all'assenza di GluA2.I test comportamentali hanno mostrato nei topi KO un aumento dell'ansia e difetti nella sociabilità. I nostri risultati suggeriscono un ruolo cruciale di AP-4 nella regolazione delle subunità di AMPAR. Studi futuri chiariranno i meccanismi di degradazione delle subunità e il loro impatto sulle funzioni cognitive.

95

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities

X-linked non-syndromic intellectual disability

LOSS OF THE X-LINKED INTELLECTUAL DISABILITY GENE ARHGEF6

AFFECTS THE PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, MIGRATION AND ELECTRICAL FUNCTIONS OF FOREBRAIN INHIBITORY NEURONS

Merlo Giorgio Roberto[1], C. Liaci[1], B. Savarese[1], L. Prandi[1], E. Ferretti[1], M. Camera[1], G. Catapano[1], E. Hidisoglu[1], G. Chiantia[1], A. Marcantoni[1], M. Giustetto[1], I. Battistella[1], L. Conti[1]

[1]Torino, Università Di Torino

Project: GGP20039; Merlo Giorgio

Intellectual Disability (ID) has been associated with altered neuronal migration, neuritogenesis, synaptogenesis and plasticity leading to excitatory-inhibitory imbalance and impacting neuronal networks. Those processes involve cytoskeleton dynamics and the Small Rho GTPases (e.g. Rac1, RhoA, cdc42). ARHGEF6 codes for a Rac1-specific positive regulator and is mutated in the X-linked nonsyndromic ID MRX46. To gain knowledge on the endophenotype of this ID, we have examined the brain of Arhgef6-/Y mice. Arhgef6 is mainly expressed in the CA3 region of the murine hippocampus and its absence leads to defects in hippocampal interneuron (IN) number, along with an altered number of specific IN subtypes, including PV+ neurons. Electrophysiological recordings in brain slices shows that the loss of Arhgef6 leads to an intrinsic hypoexcitability of hippocampal INs. These results indicate that Arhgef6 is required for the organization and electrical maturation of IN during murine hippocampal development, supporting a link between altered inhibition and the ethiopathology of ID. To investigate the role of ARHGEF6 in human we have derived iPSCs with a null mutation in ARHGEF6, as a model that recapitulates the developmental processes in the pathological condition. Using these, we generated both cortical and basal forebrain organoids: the comparison with the WT isogenic control cells indicates altered progenitor proliferation and differentiation, decreased survival, and migration defects. Specifically, cortical-basal assembloids indicate that basal-derived ARHGEF6-KO INs exhibit altered saltatory migration. This is consistent with the reduced number of INs in the Arhgef6-/Y mice. Collectively, these findings reinforce the link between ID and alterations in the development of the forebrain GABAergic system and further highlight the critical role of the Rac1 GTPase pathway in regulating proliferation, differentiation, and migration of progenitors and interneurons.

Disordini genetici neurologici/Disabilità Intellettive

Disabilità intellettiva legata all'X non sindromica

LA MUTAZIONE DEL GENE ARHGEF6, RESPONSABILE DELLA DISABILITÀ INTELLETTIVA X-LINKED, CAUSA DIFETTI DI PROLIFERAZIONE, MIGRAZIONE E PROPRIETÀ ELETTRICHE DEI NEURONI INIBITORI

La Disabilità Intellettiva (ID) è legata a difetti di migrazione dei neuroni, della crescita e della formazione delle connessioni neurali, causando uno squilibrio tra eccitazione e inibizione e un malfunzionamento delle reti neuronali. Sono coinvolti il citoscheletro e gli enzimi controllori Rho-GTPasi Rac1, RhoA e cdc42. Il gene ARHGEF6 è regolare positivo di Rac1 ed è mutato nella forma X-linked ID nota come MRX46. Per capire questo disturbo abbiamo studiato il cervello di topi senza il gene Arhgef6. La sua assenza provoca difetti nel numero di interneuroni (IN) ippocampali, in particolare del sottotipo PV+. Le registrazioni elettriche mostrano che in assenza di Arhgef6 gli IN sono meno eccitabili. Questi risultati suggeriscono che la funzione di Arhgef6 è richiesta durante la maturazione e l'organizzazione degli IN durante lo sviluppo dell'ippocampo. Per studiare il ruolo di ARHGEF6 nell'uomo abbiamo creato cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) mutanti per ARHGEF6. Queste cellule ci permettono di riprodurre i processi di sviluppo del cervello in condizioni patologiche. Abbiamo generato organoidi basali e corticali, confrontati con gli stessi ottenuti da cellule isogeniche non mutate. Osserviamo difetti di proliferazione e differenziamento, una minore sopravvivenza e difetti nella migrazione. In particolare, utilizzando assembloidi basali-corticali osserviamo che gli IN mutanti dalla regione basale hanno difetti della migrazione saltatoria migrano. Questo è in accordo con la riduzione del numero di IN osservata nei topi Arhgef6 mutanti. Questi risultati rafforzano il legame tra la Disabilità Intellettiva e alterato sviluppo del sistema GABAergico, e evidenziano il ruolo fondamentale del controllo della Rac1 GTPasi per la proliferazione, migrazione e differenziamento dei progenitori e degli IN.

96

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Benign familial infantile epilepsy

Undetermined early-onset epileptic encephalopathy

96UNDERSTANDING THE MECHANISM AND PATHOLOGICAL CONSEQUENCES OF MUTATIONS ON THE DEVELOPMENTALLY REGULATED SCN8A ALTERNATIVE SPLICING OF EXON 5

De Conti Laura[1], C. Chiavelli[1], E. Hernández Imaz[1], C. Nuccetelli[1], M. Khiat[1], M. Baralle[1]

[1]Trieste, International Centre For Genetic Engineering And Biotechnology (ICGEB)

Project: GSA23O002; Baralle Marco

Sodium channels are crucial for transmitting electrical signals in nerves and muscles. Some sodium channel genes (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN5A, SCN8A and SCN9A) are processed differently over time. In newborns, they use one version of a key protein segment (called 5N), but in adults, they switch to another version (5A), which affects how the channels function. Certain genetic changes in SCN1A, SCN2A, SCN3A, and SCN8A are major causes of epilepsy, developmental delays, and autism whilst changes in SCN5A affect heart rhythm and in SCN9A result in pain disorders. In this study, we found out that some of the genetic changes also alter the balance between 5N and 5A forms. This means that, in some cases, the pathology may be caused by a shift in the proportion of the two versions being produced rather than by the change in the protein caused by the genetic mutation. This is one of the main focuses of the study. This observation also opens a potential therapeutic route for the subset of genetic variations that cause this change. For example, by targeting specific SCN8A mRNA responsible for Nav1.6 production, we could adjust the balance between 5N and 5A forms. This could help manage symptoms related to these mutations, offering a potential complementary treatment strategy. To this end, we have also studied how this switch occurs identifying key sequence regions and proteins involved in the process.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Epilessia infantile familiare benigna; BFIE; BFIS; Convulsioni infantili familiari Benigne; Crisi infantili famiiari benigne;

Encefalopatia epilettica a esordio precoce indeterminata;

COMPRENSIONE DEL MECCANISMO E DELLE CONSEGUENZE PATOLOGICHE DELLE MUTAZIONI SULLO SPLICING ALTERNATIVO

DELL'ESONE 5 DI SCN8A, REGOLATO DURANTE LO SVILUPPO

"I canali del sodio sono fondamentali per trasmettere segnali elettrici nei nervi e nei muscoli. Alcuni geni che codificano questi canali (SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN5A, SCN8A e SCN9A) vengono regolati in modo diverso nel corso del tempo. Nei neonati, utilizzano una versione specifica di un segmento chiave della proteina (chiamato 5N), mentre negli adulti passano a un'altra versione (5A), il che cambia il modo in cui i canali funzionano. Alcune mutazioni nei geni SCN1A, SCN2A, SCN3A e SCN8A sono tra le principali cause di epilessia, ritardi nello sviluppo e autismo, mentre le variazioni in SCN5A possono influenzare il ritmo cardiaco e quelle in SCN9A possono causare disturbi del dolore. In questo studio, abbiamo scoperto che alcune mutazioni genetiche alterano anche l'equilibrio tra le forme 5N e 5A. Questo significa che, in alcuni casi, la patologia potrebbe non derivare direttamente dalla mutazione stessa, ma piuttosto da un cambiamento nella proporzione tra le due versioni della proteina prodotte. Questo è uno degli aspetti principali della nostra ricerca. Questa osservazione apre anche una possibile strada terapeutica per alcune di queste mutazioni. Ad esempio, prendendo di mira l'mRNA di SCN8A, responsabile della produzione di Nav1.6, potremmo regolare l'equilibrio tra le forme 5N e 5A. Questo potrebbe aiutare a gestire i sintomi legati a queste mutazioni, offrendo una possibile strategia di trattamento complementare. A questo scopo, abbiamo anche studiato il meccanismo di questo passaggio, identificando le regioni di sequenza e le proteine coinvolte nel processo.

97

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

CDKL5-related epileptic encephalopathy

CDKL5 AND INSYN1: UNMASKING THE "DARK" SIDE OF INHIBITORY INNERVATION IN CELLULAR AND MOUSE MODELS OF CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

Barbiero Isabella[1], G. Valetti[1], S. Baldin[1], C. Kilstrup-Nielsen[1]

[1]Busto Arsizio, Università Dell'insubria

Project: GJC21015; Barbiero Isabella

CDKL5 deficiency disorder (CDD) is a rare genetic disorder caused by mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) gene; it is characterized by early-onset drug-resistant epileptic encephalopathy, motor, cognitive, visual and autonomic deficiencies. 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 characterized the molecular interaction between CDKL5 and InSyn1, a TDark protein that, by interacting with the α-dystroglycan (α-DG) transmembrane-complex controls the formation of cholecystokinin interneurons (CCK+ INs). This interaction seems to be prominent in young mice at the post-natal day 15 (PND15), a critical period for neuronal connection. Of note, we found that the absence of Cdkl5 caused a reduction in the number of CCK+ INs in the hippocampus of PND15 mice, without affecting PND90 innervation. Importantly, the reduction of CCK innervation is accompanied by a concomitant defect in the number and area of α-DG clusters both in Cdkl5-KO neurons and hippocampal slices, thus underlying a closed link between the kinase and InSyn1- α-DG functioning. We further validated the Cas9-mediated homology-independent target integration system for labeling the endogenous InSyn1 with an exogenous tag. This system, which bypasses the lack of reliable antibodies, allowed us to better investigate the behavior of InSyn1 in the absence of CDKL5. Altogether, with this project we are exploring the impact of CDKL5 loss in the inhibitory compartment, a still poorly investigated aspect in the CDD field, which represents an important step forward to better understand the epileptic seizures and cognitive deficits in CDD.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Malattia da deficit di CDKL5; CDD; encefalopatia epilettica da deficit di CDKL5; Encefalopatia epilettica e dello sviluppo di tipo 2; DEE2; encefalopatia epilettica infantile precoce di tipo 2; EIEE2;

CDKL5 E INSYN1: ANALISI DELL'INNERVAZIONE INIBITORIA NEI MODELLI CELLULARI E MURINI DEL DISTURBO DA DEFICIT DI CDKL5

Il disturbo da carenza di CDKL5 (CDD) è un raro disturbo genetico causato da mutazioni nel gene X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5); è caratterizzato da encefalopatia epilettica farmaco-resistente ad esordio precoce, deficit motori, cognitivi, visivi e autonomici. 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 caratterizzato l'interazione molecolare tra CDKL5 e InSyn1, una proteina TDark che, interagendo con il complesso transmembrana α-distroglicano (α-DG) controlla la formazione di interneuroni colecistochinina (CCK+ IN). Questa interazione sembra essere evidente nei topi giovani al 15° giorno postnatale (PND15), un periodo critico per la connessione neuronale. A tal proposito, abbiamo scoperto che l'assenza di Cdkl5 causa una riduzione del numero di CCK+ IN nell'ippocampo dei topi PND15, senza influenzare l'innervazione PND90. È importante notare che la riduzione dell'innervazione CCK è accompagnata da una concomitante alterazione nel numero e nell'area dei cluster α-DG sia nei neuroni Cdkl5-KO che nelle fette ippocampali, sottolineando così un legame chiuso tra la chinasi e il funzionamento di InSyn1-α-DG. Abbiamo ulteriormente convalidato il sistema "homology-independent target integration" mediato da Cas9 per aggiungere un tag esogeno al gene endogeno l'InSyn1. Questo sistema, che aggira la mancanza di anticorpi affidabili, ci ha permesso di studiare meglio il comportamento di InSyn1 in assenza di CDKL5, ampliando le conoscenze sui meccanismi molecolari che regolano il network inibitorio nella CDD.

98

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

CDKL5-related epileptic encephalopathy

98ZEBRAFISH CDKL5 MUTANT MODEL RECAPITULATES KEY FEATURES OF CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

Facchinello Nicola[1], M. Salamanca[2], M. Albanesi[2], M. Dal Maschio[2], S. Andriotto[2], P. Braghetta[2]

[1]Bologna, Università di Bologna

[2]Padova, Università Di Padova

Project: GSA23M005; Facchinello Nicola

Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (CDKL5) is a Serine/Threonine kinase essential for cellular processes. Mutations in CDKL5 cause CDKL5 Deficiency Disorder (CDD), a rare X-linked encephalopathy characterized by severe neurodevelopmental delay, microcephaly, autistic-like behaviors, epilepsy, muscle tone impairment, and sleep disturbances. With no approved therapies, developing animal models is crucial for understanding CDD, identifying molecular targets, and facilitating drug screening. Zebrafish (Danio rerio) is a valuable model for neurodevelopmental diseases due to its genetic similarity to humans, rapid development, and ease of genetic manipulation. Here, we established and characterized a cdkl5 mutant zebrafish line using CRISPR-Cas9 to evaluate its suitability as a CDD model. Cdkl5 mutant zebrafish exhibited significant developmental delays, including reduced body length and brain volume. Despite normal muscular tissue organization confirmed by birefringence analysis, mutant fish displayed reduced swimming distance in a light-dark paradigm, particularly following the light-to-dark transition. Evaluating the visuo-motor integration function using an optomotor response paradigm, we found a reduced tail beat frequency emerging at 6 dpf, accompanied by a decrease in the relative number of bouts. Brain functional recordings at cellular resolution showed a reduced population of neurons encoding whole-field motion direction-tuning and decreased reliability to repeated stimuli. Notably, cdkl5 mutants exposed to an epileptogenic stimulus exhibited fast-darting movements and increased turns, mirroring epileptic phenotypes observed in human CDD patients. This cdkl5 mutant model, the first targeting the catalytic domain, closely replicates key CDD features, offering a valuable tool for studying disease mechanisms and advancing targeted therapies.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Malattia da deficit di CDKL5; CDD; encefalopatia epilettica da deficit di CDKL5; Encefalopatia epilettica e dello sviluppo di tipo 2; DEE2; encefalopatia epilettica infantile precoce di tipo 2; EIEE2;

IL MODELLO MUTANTE CDKL5 NELLO ZEBRAFISH RIPRODUCE LE CARATTERISTICHE CHIAVE DEL DISORDINE DA CARENZA DI CDKL5

“La Chinasi ciclina dipendente 5 (CDKL5) è una chinasi Serina/Treonina essenziale per diversi processi cellulari. Le mutazioni nel gene CDKL5 causano il disordine da carenza di CDKL5 (CDD), caratterizzata da grave ritardo nel neurosviluppo, microcefalia, comportamenti simil-autistici, epilessia, alterazioni del tono muscolare e disturbi del sonno. In assenza di terapie approvate, lo sviluppo di modelli animali è cruciale per comprendere la patologia, identificare target molecolari e favorire lo screening farmacologico. Lo zebrafish è un modello utile per lo studio delle malattie del neurosviluppo grazie alla sua somiglianza genetica con l’uomo, il rapido sviluppo e la facilità di manipolazione genetica. Abbiamo generato e caratterizzato una linea mutante cdkl5 mediante CRISPR-Cas9, valutandone l’idoneità come modello per il CDD. I mutanti cdkl5 hanno mostrato significativi ritardi nello sviluppo, tra cui ridotta lunghezza corporea e minore volume cerebrale. Nonostante una normale organizzazione del tessuto muscolare, confermata dall’analisi di birifrangenza, i pesci mutanti hanno mostrato una riduzione della distanza percorsa nel nuoto libero, soprattutto nella transizione da luce a buio. L’analisi visuo-motoria mediante risposta optomotoria ha evidenziato, a 6 giorni post-fecondazione, una riduzione della frequenza dei movimenti della coda e una diminuzione del numero relativo di episodi motori. Le registrazioni cerebrali ad alta risoluzione hanno rivelato, nei mutanti cdkl5, una minore popolazione di neuroni coinvolti nella codifica del movimento visivo e una minore affidabilità agli stimoli ripetuti. Inoltre, i mutanti esposti a uno stimolo epilettogeno hanno mostrato movimenti rapidi e un aumento delle virate, riproducendo il fenotipo epilettico osservato nei pazienti con CDD. Questo modello mutante cdkl5, riproduce fedelmente le caratteristiche del CDD, fornendo uno strumento prezioso per lo studio dei meccanismi patologici e lo sviluppo di terapie mirate.”

99

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

CDKL5-related epileptic encephalopathy

TARGETING THE GUT TO IMPROVE SEIZURE CONTROL IN CDD-NUTRIENT

Triva Francesca[1], **E. Borghi**[1], **A. Vignoli**[1]

[1]**Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale”**

Project: GSA23G001; Vignoli Aglaia

CDKL5 deficiency disorder (CDD) is a rare genetic developmental and epileptic encephalopathy characterized by severe and drug resistant early-onset seizures. According to literature and our previous Telethon study, seizure profile is associated to gut microbiota (GM) alterations. Hence, we propose to target the CDD gut-brain axis to reduce seizure frequency and improve the quality of life. We planned an interventional study aimed at restoring gut homeostasis and gut community health as follows: a 3-month supplementation period with α-lactalbumin -ALAC-, FOS and inulin (T1, stool and blood collection), 1-month washout (T2, stool collection), 3-month supplementation with ALAC, FOS, inulin and sodium butyrate (T3, stool and blood collection), 1- month washout (T4, stool collection). We will record gastrointestinal issues, seizure frequency, sleep disturbances, diet, neurobehavioural impairment (RTT Behaviour Questionnaire - RSBQ), and motor ability. Analysis of GM composition will be performed by 16S rRNA gene sequencing (Illumina MiSeq platform). Quantification of short chain fatty acids will be assessed by gas chromatography-mass spectrometry. Blood samples will be analysed by mass spectrometry to identify systemic microbial biomarkers. With the support of the "Associazione CDKL5 Insieme verso la cura," we recruited 14 CDD subjects (13 females, mean age 16.4 ± 11.5) and collected stool samples and dried blood spots (T0) before the first planned supplementation. Clinical interviews have been completed, and the database has been updated. Baseline data, expressed as mean and range, are as follows: CDKL5 Developmental Score 2.4 (1–5), CDKL5 severity scale 47.1 (35–58), Motor-Behavioral Assessment scale 58 (31–78), and sleep disturbance scale 52.8 (40–81). Post-supplementation sampling with ALAC, FOS, and inulin is nearly complete, and ongoing analyses include GM composition, metabolite assessments, a diet survey, and further clinical evaluations.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Malattia da deficit di CDKL5; CDD; encefalopatia epilettica da deficit di CDKL5; Encefalopatia epilettica e dello sviluppo di tipo 2; DEE2; encefalopatia epilettica infantile precoce di tipo 2; EIEE2;

MIRARE ALL’INTESTINO PER MIGLIORARE IL CONTROLLO DELLE CRISI NELLA CDD-NUTRIENT

La sindrome da deficit CDKL5 (CDD) è una rara encefalopatia

genetica, evolutiva ed epilettica, con crisi gravi e resistenti ai farmaci, a esordio precoce. Secondo la letteratura e il nostro precedente studio Telethon, il profilo delle crisi è correlato ad alterazioni del microbiota intestinale (GM). Pertanto, proponiamo di intervenire sull'asse intestino-cervello nella CDD per ridurre la frequenza delle crisi e migliorare la qualità della vita. Abbiamo progettato uno studio interventistico volto a ripristinare l'omeostasi intestinale e la salute della comunità intestinale mediante: un periodo di integrazione di 3 mesi con α-lattalbumina (ALAC), FOS e inulina (T1, raccolta di feci e sangue), un mese di washout (T2, raccolta di feci), 3 mesi di integrazione con ALAC, FOS, inulina e butirrato di sodio (T3, raccolta di feci e sangue), e un mese di washout (T4, raccolta di feci). Verranno monitorati problemi gastrointestinali, frequenza delle crisi, disturbi del sonno, dieta, compromissione neurocomportamentale e capacità motorie. La composizione del GM sarà analizzata mediante sequenziamento del gene 16S rRNA (piattaforma Illumina MiSeq). La quantificazione degli acidi grassi a catena corta sarà eseguita tramite gascromatografia-spettrometria di massa. I campioni di sangue saranno analizzati con spettrometria di massa per identificare biomarcatori sistemici microbiologici. Con il supporto dell'"Associazione CDKL5 Insieme verso la cura", sono stati reclutati 14 soggetti CDD (13 femmine, età media 16,4 ± 11,5) e sono stati raccolti campioni di feci e di sangue secco (T0) prima dell'inizio della prima integrazione. I dati di base, espressi come media e range, sono i seguenti: CDKL5 Developmental Score 2,4 (1-5), CDKL5 severity scale 47,1 (35-58), Motor-Behavioral Assessment scale 58 (31-78) e sleep disturbance scale 52,8 (40-81). La raccolta post-integrazione con ALAC, FOS e inulina è completata; sono in corso analisi sulla composizione del GM, metaboliti e dieta.

100

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

CDKL5-related epileptic encephalopathy

GABAA-RECEPTOR DEFECTS AND POSSIBLE THERAPEUTIC TARGETING IN A MOUSE MODEL OF CDKL5 DEFICIENCY DISORDER.

Kilstrup-Nielsen Charlotte[1], C. Lora[1], S. Valastro[1],M. Giustetto[2] A. Marcantoni[2], I. Barbiero[1]

[1]Busto Arsizio, Università Dell'insubria
[2]Torino, Università Di Torino

Project: GGP20024; Kilstrup-Nielsen Charlotte

Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase like 5 gene (CDKL5) cause a severe neurodevelopmental disorder (OMIM300672) referred to as CDKL5 deficiency disorder (CDD). CDD patients are characterised by early-onset drug-resistant epilepsy, intellectual disability, and autistic-like features. No cure exists for CDD patients, and the development of drug-based therapies is still extremely challenging due to the limited knowledge of CDKL5 functions. While CDKL5 has a well-known role in excitatory neurotransmission, its functions in the inhibitory compartment are still poorly characterised. In the past we showed that CDKL5 loss impacts surface expression of synaptic GABAARs in primary hippocampal neurons influencing the frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents. To understand how CDKL5 loss affects inhibitory neurotransmission in vivo, we have used biochemical and electrophysiological approaches to characterise the expression and functioning of synaptic and extrasynaptic GABAARs in hippocampi of Cdkl5-KO mice. We here show that CDKL5 loss impacts both types of GABAARs and present data suggesting that such defects can be restored upon treatment with a synthetic neuroactive steroid that promotes microtubule dynamics. Our results may help elucidating the molecular mechanism of the cognitive features and epilepsy in CDD patients and developing disease-modifying therapies.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Malattia da deficit di CDKL5; CDD; encefalopatia epilettica da deficit di CDKL5; Encefalopatia epilettica e dello sviluppo di tipo 2; DEE2; encefalopatia epilettica infantile precoce di tipo 2; EIEE2

ALTERAZIONE FUNZIONALE DEL RECETTORE GABAA IN UN MODELLO MURINO DEL CDKL5 DEFICIENCY DISORDER

Mutazioni nel gene X-linked cyclin-dependent kinase like 5 (CDKL5) causano un grave disturbo dello sviluppo neurologico (OMIM 300672), noto come disturbo da deficit di CDKL5 (CDD). I pazienti con CDD presentano epilessia precoce resistente ai farmaci, disabilità intellettiva e tratti comportamentali simili a quelli dell'autismo. Ad oggi non esiste una cura per il CDD, e lo sviluppo di terapie farmacologiche rimane una sfida a causa della limitata comprensione delle funzioni di CDKL5. Sebbene il ruolo di CDKL5 nella neurotrasmissione eccitatoria sia ben consolidato, le sue funzioni nel comparto inibitorio restano poco esplorate. In precedenti studi, abbiamo mostrato che la perdita di CDKL5 altera l'espressione di superficie dei recettori GABAA sinaptici nei neuroni primari dell'ippocampo, influenzando la frequenza delle correnti postsinaptiche inibitorie in miniatura. Per comprendere meglio come la carenza di CDKL5 impatti la neurotrasmissione inibitoria in vivo, abbiamo utilizzato approcci biochimici ed elettrofisiologici per caratterizzare l'espressione e il funzionamento dei recettori GABAA sinaptici e extrasinaptici nell'ippocampo di topi knockout per CDKL5 (Cdkl5-KO). I nostri risultati dimostrano che la perdita di CDKL5 interferisce con entrambi i tipi di recettori GABAA e suggeriscono che tali difetti possano essere corretti mediante il trattamento con uno steroide neuroattivo sintetico, in grado di promuovere la dinamicità dei microtubuli. Questi dati potrebbero fornire nuove informazioni sui meccanismi molecolari alla base dei deficit cognitive e dell'epilessia nei pazienti affetti da CDD, aprendo la strada allo sviluppo di terapie modificanti la malattia.

101

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE)

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE)

CONVENTIONAL AND NON CONVENTIONAL TREATMENT OF HCN1 MUTATIONS CAUSING EARLY INFANTILE EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY (EIEE)

Moroni Anna[1], R. Castelli[1]

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GGP20021; Moroni Anna

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE) is a severe brain disorder with poor prognosis and no adequate therapies characterized by recurrent intractable seizures in newborn and infants. EIEE-causing mutations are found in Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel 1 (HCN1), a voltage-gated channel widely expressed in the central nervous system

(CNS). HCN1 mutations faithfully reproduce in mice the epileptic phenotype of the patients, highlighting the urgent need to develop antiepileptic drugs that specifically target HCN1 channels. To this end, we combined our expertise in channel biophysics and structural biology to classify a continuously increasing number of HCN1 mutations into four functional classes, and to explain their phenotypes in terms of altered molecular mechanisms. This precise knowledge of HCN1 dysfunctions and their systematic classification led to the identification of a proper pharmacological treatment for three of the four classes. The identified treatments include peptide tools, nanobodies and small molecules, developed during the project, that are able to correct mutation-induced defects restoring proper channel function. Our work lays the ground for a precision medicine approach for HCN1 epilepsy and provides robust indications and innovative tools to clinicians for the treatment of individual patients.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Encefalopatia epilettica e dello sviluppo

encefalopatia epilettica infantile precoce

TERAPIE CONVENZIONALI E NON PER IL TRATTAMENTO DELLE MUTAZIONI DI HCN1 CHE INDUCONO ENCEFALOPATIA EPILETTICA INFANTILE PRECOCE (EIEE)

L'encefalopatia epilettica infantile precoce (EIEE) è un grave disturbo cerebrale a prognosi infausta e senza terapie adeguate, caratterizzato da crisi ricorrenti intrattabili nei neonati e nei bambini. Le mutazioni che causano l'EIEE si trovano nel canale HCN1, attivato in iperpolarizzazione e controllato dai nucleotidi ciclici, espresso nel sistema nervoso centrale (SNC). Le mutazioni di HCN1 riproducono fedelmente nei topi il fenotipo epilettico dei pazienti, fornendo un modello in vivo per sviluppare e testare farmaci HCN1-specifici. Utilizzando le nostre competenze di biofisica e biologia strutturale dei canali HCN, abbiamo per prima cosa classificato un numero sempre crescente di mutazioni HCN1 identificate nei pazienti, in quattro classi funzionali corrispondenti ad altrettanti meccanismi molecolari alterati. La conoscenza precisa delle disfunzioni del canale HCN1 e la loro classificazione sistematica hanno portato all'identificazione di un trattamento farmacologico adeguato per tre delle quattro classi. I trattamenti identificati comprendono peptidi naturali e sintetici, nanobodies e piccole molecole, sviluppati durante il progetto, che sono in grado di correggere i difetti indotti dalle mutazioni ripristinando la corretta funzione del canale. Il nostro lavoro getta le basi per un approccio di medicina di precisione per l'epilessia HCN1 e fornisce indicazioni solide e strumenti innovativi per il trattamento dei singoli pazienti.

102

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE)

Early Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE)

102NANOBODY-MEDIATED MODULATION OF HCN1 CHANNELS IN EPILEPTIC DISORDERS

Castelli Roberta[1]
G. Fontana[1], **A. Castellini**[1], **A. S. Sharifzadeh**[1], **A. Porro**[1], **A. Saponaro**[1], **A. Moroni**[1]

[1]*Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale*

Project: GGP20021; Moroni Anna

Early Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE) is a severe neurological disorder characterized by seizures that affects newborn children and is often drug-resistant. To date, more than 80 EIEE-causing mutations have been identified in Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotide gated 1 (HCN1) channels, which are widely expressed in the brain where they contribute to the cationic Ih current. By collecting functional and structural data, we assigned HCN1 mutations to four functional classes, one of which is loss-of-function (LOF) and leads to channels that open at more hyperpolarized membrane voltages. We have identified a nanobody, NB6, which binds to wild-type and mutant HCN1 channels and corrects their voltage dependence making it a promising tool for the rescue of LOF mutations. Here we show that NB6 fully reverts the effect of the R548H mutation found in a patient. Notably, the nanobody binds to an extracellular loop of the channel, while the mutation affects an intracellular domain. Furthermore, preliminary results show that NB6 acts on the native Ih current in CA1 pyramidal neurons derived from mouse hippocampal slices, where it depolarizes the resting membrane potential, accelerates the action potential firing rate and reduces the Ih induced voltage sag. These results indicates that NB6 has the potentiality to modulate HCN1 in vivo. Overall, our work highlights the feasibility of employing innovative tools for the treatment of HCN1-related epilepsies.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Encefalopatia epilettica e dello sviluppo

Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce (EIEE)

UTILIZZO DI NANOBODY SPECIFICI PER LA MODULAZIONE DI CANALI HCN1 ASSOCIATI AD EPILESSIA

L'Encefalopatia Epilettica Infantile Precoce (EIEE) è un grave disturbo neurologico caratterizzato da epilessia che colpisce i neonati ed è spesso farmaco resistente. Ad oggi, sono state identificate più di 80 mutazioni nel gene del canale HCN1 (Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotide gated 1). Questi canali sono ampiamente espressi nel cervello dove mediano la corrente cationica Ih. Raccogliendo dati funzionali e strutturali, abbiamo assegnato le mutazioni HCN1 a quattro classi funzionali, una di queste, loss-of-function (LOF), porta a canali che si aprono a un potenziale di membrana più iperpolarizzato. Abbiamo identificato un nanobody, NB6, che lega i canali HCN1 wild type e mutanti e modula la loro voltaggio dipendenza, rendendolo un tool promettente per il recupero di mutazioni LOF. Qui mostriamo che NB6 agisce sulla mutazione R548H trovata in un paziente ripristinando un fenotipo wild type-like. In particolare, NB6 lega una regione extracellulare del canale mentre la mutazione si trova in un dominio citosolico. Inoltre, risultati preliminari mostrano che NB6 agisce sulla corrente Ih nativa in neuroni piramidali della regione ippocampale CA1, dove depolarizza il potenziale di membrana di risoso, accelera il rate di firing dei potenziali d'azione e riduce il sag del potenziale indotto dalla corrente Ih. Questi risultati indicano che NB6 ha la potenzialità di modulare gli HCN1 in vivo. Complessivamente il nostro lavoro evidenzia la possibilità di utilizzare strumenti innovativi per il trattamento di epilessie legate a mutazioni HCN1.

103

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE)

INTERACTION OF TBC1D24 WITH V-ATPASE: PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS AND NOVEL THERAPEUTIC TARGETS FOR RARE TBC1D24 DISEASES

Fassio Anna[1], C. Michetti[1], C. Penzo[1], H. Tsushima Semini[1], S. Tessitore[1], S. Giubbolini[1], G.Parodi[1], M. Servetti[2], B. Sterlini[1], A. Corradi[1], S. Martinoia[1], A. Fassio[1]

[1]Genoa, Università Di Genova
[2]Genoa, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)

Project: GMR24T1085; Fassio Anna

TBC1D24 is mutated in neurodevelopmental disorders with epilepsy. TBC1D24 protein harbors two conserved domains, the TBC and the TLDC, and has been reported to regulate neuronal development and membrane trafficking at synapses. The molecular basis for the insurgence of seizures in TBC1D24 pathology are largely unexplored. TLDC protein family has been recently proposed as regulators of the proton pump v-ATPase. In the brain, v-ATPase acidifies synaptic vesicle and endo-lysosomal organelles, regulating the formation of neurotransmitter quanta as well as the neuronal degradative capacity. Thus, alteration in neuronal proteostasis and/or impairment in synaptic vesicle recycling could lead to hyperexcitability and epileptic seizures. The goal of the project is to counteract the epileptic phenotype associated to TBC1D24 disorders by re-establishing the vacuolar ATPase (v-ATPase)-regulated intraorganellar pH homeostasis. The project is organized in two aims 1) To disclose the interplay between intraorganellar pH and excitability in TBC1D24 preclinical models 2) To restore pH homeostasis and rescue the hyperexcitable phenotypes. The impact of TBC1D24 loss on pH homeostasis and excitability is studied in neurons differentiated from TBC1D24 patients' fibroblasts and Tbc1d24 conditional KO mice, employing live imaging and electrophysiological approaches coupled to evaluation of lysosomal, autophagic and synaptic markers. Small compounds that act on intraorganellar pH will be employed to restore excitation/inhibition balance.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Encefalopatia epilettica e dello sviluppo

INTERAZIONE TRA TBC1D24 E V-ATPASE: RUOLO PATOFISIOLOGICO E BERSAGLIO DI NUOVI PROTOCOLLI TERAPEUTICI PER LE PATOLOGIE RARE ASSOCIATE A VARIANTI IN TBC1D24.

Il gene TBC1D24 è mutato in uno spettro di disordini del neurosviluppo spesso associati ad epilessia ad insorgenza precoce. La proteina TBC1D24 possiede due domini conservati, il dominio TBC e il dominio TLDc, e è stata descirtta come regolatore dello sviluppo neuronale e del traffico di membrana a livello sinaptico. Le proteine che esprimono il dominio TLDc sono state recentemente descritte come nuovi interratori della v-ATPase, la pompa protonica responsabile della acidificazione intracellulare. Nelle cellule neuronali la v-ATPasi acidifica le vescicole sinaptiche e gli organelli della via endolisosomiale regolando sia la formazione dei quanto di neurotrsmettitore sia proteostasis. Sia l' alterazione della proteostasi neuronale che il difetto nella formazione dei quanti possono indurre ipereccitabilità e epilessia. L'obbiettivo del progetto è di contrastare il fenotipo epilettico associato alla perdita di funzione di TBC1D24 ristabilizzando l'omeostasi del pH intracellulare. Il progetto è organizzato in due obbiettivi 1) valutare la associazione tra disregolazione del pH e eccitabilità in due modelli preclinici: neuroni differenziati da cellule staminali pluripotenti ottenute da pazienti e modello murino knockout condizionale per TBC1D24. 2) ristabilizzare la corretta eccitabilità neuronale con l'utilizzo di piccoli composti che correggono il pH nei lisosomi e nelle vescicole sinaptiche.

104

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Dravet syndrome

104TRICKING PROTEIN TRANSLATION: A NOVEL BASE EDITING STRATEGY FOR DRAVET SYNDROME

E. Benvenuto[1], A. Avella[1], M. Luoni[2], S. Giannelli[1], G. Colasante[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele
[2]Milan, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GMR23T2011; Colasante Gaia

Dravet syndrome (DS) is a severe developmental and epileptic encephalopathy caused by haploinsufficiency of SCN1A gene, encoding Nav1.1 sodium channel. Several gene therapies are being developed, with some already in clinical trials, but they require lifelong administration of therapeutic agents. Here we describe a one-time permanent base editing (BE) of 5' untranslated (UTR) regulatory sequences to boost Nav1.1 protein translation. To determine the effect of 5'UTR sequence on Nav1.1 translation and verify the possibility to interfere with this regulation to enhance protein expression, we set a reporter system screening platform. Starting from the wild-type sequence, we cloned in a GFP/mCherry reporter vector 22 variants of Scn1a 5'UTR sequence harboring distinct nucleotide transitions and identified variants able to significantly increase GFP fluorescence intensity over wt sequence. Those variants carried specific A>G mutations in two ATG triplets upstream (uATG) to the main ATG (mATG). By integrating available data of Ribo-sequencing perfomed in brain tissues, we learned that those ATGs are candidate starting codon of upstream open reading frames (uORF) partially overlapping to Scn1a mORF. uORFs are known to inhibit translation by sequestering ribosomes from the CDS; hence uATGs disruption is expected to enhance Scn1a translation. To test this, we installed uATG>GTG mutations in the endogenous Scn1a locus using adenine BEs in both murine and human neurons. Deep sequencing of the amplicon spanning the targeted region revealed that 60% of Scn1a reads carried at least one edited uATG, sufficient to rescue NaV1.1 levels in Dravet neurons. Neglectable editing was reported in predicted sgRNA off-targets. To further assess the therapeutic potential of our strategy, we are delivering the system in vivo in DS mice. uORFs are conserved across other SCN1A paralogs, which may further broaden the applicability of the approach to other diseases.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Sindrome di Dravet; Epilessia mioclonica grave neonatale; Epilessia neonatale grave con crisi miocloniche; SMEI;

INGANNANDO LA TRADUZIONE: UNA NUOVA STRATEGIA DI BASE EDITING PER TRATTARE LA SINDROME DI DRAVE

La sindrome di Dravet (DS) è una grave encefalopatia

epilettica e dello sviluppo causata dall'aploinsufficienza del gene SCN1A, che codifica per il canale del sodio Nav1.1. Sono in via di sviluppo diverse terapie geniche, alcune già in sperimentazione clinica, ma che richiedono trattamenti ripetuti. In questo studio, abbiamo sviluppato una nuova strategia terapeutica basata sull'editing (Base Editing, BE), di regioni regolatrici non tradotte al 5' del mRNA (5' UTR) con l'obiettivo di aumentare la produzione della proteina Nav1.1. Per determinare l'effetto della sequenza 5'UTR sulla traduzione di Nav1.1 e verificare la possibilità di interferire con questa regolazione per aumentare l'espressione proteica, abbiamo creato una piattaforma di screening. Partendo dalla sequenza wild-type, abbiamo clonato in un vettore reporter GFP/mCherry, 22 varianti della sequenza 5'UTR di Scn1a con diverse transizioni nucleotidiche e abbiamo identificato varianti in grado di aumentare l'intensità della GFP rispetto alla sequenza wt. Queste varianti presentavano specifiche mutazioni A>G in due triplette ATG a monte (uATG) del principale ATG (mATG). Integrando dati disponibili di Ribo-seq eseguiti su tessuti cerebrali, abbiamo osservato che questi ATG sono putativi codoni di inizio di upstream open reading frame (uORF) che si sovrappongono parzialmente all'mORF di Scn1a. Gli uORF sono noti per inibire la traduzione sequestrando i ribosomi dalla mORF; pertanto, ci aspettavamo che la mutazione degli uATG aumentasse la traduzione di Scn1a. Per testare cio', abbiamo installato mutazioni uATG>GTG nel locus endogeno Scn1a/SCN1A utilizzando BE sia in neuroni murini che umani. Il deep sequencing di un amplicone sulla regione bersaglio ha rivelato che il 60% delle sequenze presentava almeno un uATG modificato, sufficiente a recuperare i livelli di NaV1.1 nei neuroni Dravet. Per valutare ulteriormente il potenziale terapeutico della nostra strategia, stiamo somministrando il BE tool in topi DS.

105

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Female restricted epilepsy with intellectual disability

105UNRAVELLING THE ROLE OF PROTOCADHERIN-19 (PCDH19) IN GENE EXPRESSION REGULATION

M.T. Lombardo[1], S. Mazzoleni[1], D. D'Aliberti[2], S. Spinelli[2], R.G. Piazza[2], S. Bassani[1]

[1]Milan, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Milan, Università Di Milano Bicocca

Project: GGP20056; Bassani Silvia

Developmental and Epileptic Encephalopathy 9 (DEE9) is a debilitating neurological condition with no effective cure, characterized by early-onset seizures, intellectual disability, and autism. DEE9 is caused by mutations in the X-chromosome gene PCDH19, which encodes for protocadherin-19 (PCDH19), a cell adhesion molecule. We recently reported that PCDH19 undergoes an activity-dependent proteolytic cleavage that generates a cytosolic C-terminal fragment (CTF). PCDH19 CTF translocates into the nucleus and regulates the expression of a subset of immediate early genes (IEGs) in primary hippocampal neurons. The goal of this project is to explore the role of PCDH19 in regulating gene expression ex vivo in the mouse brain. We found that PCDH19 CTF is produced during the first postnatal period of the mouse brain, when synaptogenesis and refinement of neuronal circuits occur. Furthermore, through fractionation and sequential salt extraction assays, we showed that PCDH19 CTF localizes in nuclei and associates with chromatin. To investigate the effect of altered PCDH19 expression on the transcriptome, we exploited the recently characterized conditional knockout mouse model for Pcdh19 (Pcdh19 cKO). Single-nucleus RNA sequencing (snRNA-seq) revealed numerous differentially expressed genes (DEGs) and pathways in hippocampal cells of Pcdh19 cKO mice. Some of these genes and pathways are sex-specific, while others are shared by males and females. Additionally, some are cell-type specific, while others are shared by several cell types. DEGs include genes involved in synaptic transmission, cytoskeleton dynamics, energy metabolism, and neuronal development. Altogether, our data provide a novel key to understanding DEE9 pathological mechanisms and identifying new potential therapeutic targets.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Epilessia limitata alle femmine associata a disabilità intellettiva; EFMR;

IL RUOLO DELLA PROTOCADERINA-19 (PCDH19) NELLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'encefalopatia epilettica dello sviluppo 9 (DEE9) è una condizione neurologica debilitante priva di cura, caratterizzata da crisi epilettiche ad esordio precoce, disabilità intellettiva e autismo. La DEE9 è causata da mutazioni nel gene del cromosoma X PCDH19, che codifica per la molecola di adesione protocaderina-19 (PCDH19). Abbiamo recentemente dimostrato che PCDH19 subisce un taglio proteolitico attività-dipendente nei neuroni primari di ippocampo. Il risultante frammento citosolico C-terminale è in grado di traslocare nel nucleo e regolare l'espressione di alcuni geni importanti per la plasticità sinaptica. L'obiettivo di questo progetto è studiare il ruolo di PCDH19 nella regolazione dell'espressione genica ex vivo nel cervello di topo. Abbiamo osservato che il frammento C-terminale di PCDH19 nel cervello murino è prodotto soprattutto durante il primo periodo postnatale, caratterizzato da intensa sinaptogenesi e rimodellamento dei circuiti neuronali, ed è associato alla cromatina. Per studiare l'effetto dell'alterata espressione di PCDH19 e del suo frammento C-terminale sul trascrittoma, abbiamo sfruttato il modello murino di knockout condizionale per Pcdh19 (Pcdh19 cKO) da noi recentemente caratterizzato. Il sequenziamento dell'RNA dai singoli nuclei ippocampali (snRNA-seq) ha rivelato la presenza numerosi geni differenzialmente espressi nei topi Pcdh19 cKO rispetto ai topi controllo. Alcuni di questi geni sono condivisi da maschi e femmine, mentre altri sono specifici per uno dei due sessi. Tra i geni deregolati vi sono geni coinvolti nella trasmissione sinaptica, nelle dinamiche del citoscheletro, nel metabolismo energetico e nello sviluppo neuronale. Complessivamente, i nostri dati forniscono nuovi spunti per comprendere i meccanismi patologici della DEE9 e identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici.

106

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Female restricted epilepsy with intellectual disability

INVESTIGATING THE ROLE OF PARVALBUMIN POSITIVE INTERNEURONS IN PCDH19-RELATED DEVELOPMENTAL AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY-9 (DEE9)

S. Riccardi[1], A. Zippo[1], D. Laurenti[1], M. Sala[1], L. Cingolani[2] L. Murru[1], M. Passafaro[1]

[1]Vedano al Lambro, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Trieste, Università Di Trieste

Project: GMR23T1153; Passafaro Maria

Mutations in the X-chromosome gene PCDH19 cause Developmental and Epileptic Encephalopathy-9 (DEE9), a rare neurodevelopmental disorder characterized by epilepsy, autism spectrum disorder and cognitive impairment. DEE9 is characterized by a peculiar gender preference, affecting mainly heterozygous females. Recently, it was found that in vivo mosaic expression of Pcdh19 impairs the maturation and migration of neurons and the GABAergic circuitry, leading to defects of excitation/inhibition (E/I) balance. Since the GABAergic parvalbumin interneurons (PVIs) are powerful regulators of pyramidal neuron activity and alteration in their function is deeply related to epilepsy and neurodevelopmental disorders, we generated a novel conditional PV-Cre/Pcdh19 KO mice (cKO) to study the functional consequences of the selective loss of Pcdh19 in PVIs. PV-Cre/Pcdh19 mice displayed defects in sociability, suggestive of an autistic-like behavior. Interestingly, the characterization of the electroencephalographic profile of cKO mice showed a dysfunctional cortical excitability and a strong epileptic susceptibility. Remarkably, pyramidal neurons had a more excitable phenotype, while PVIs were unaltered. Finally, by recording calcium transients using in vivo single cell microendoscopic Ca2+ imaging during social exploration, we showed an altered pattern of activation of single PVIs of prefrontal cortex in response to the interaction stimulus. Altogether these results indicate that the selective deletion of Pcdh19 in PVIs affects social motivation and cortical excitability, suggesting that PVI excitability may contribute to the symptomatology associated with DEE9.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Epilessia limitata alle femmine associata a disabilità intellettiva; EFMR

STUDIO DEL RUOLO DEGLI INTERNEURONI PARVALBUMINA-POSITIVI NELLA PATOGENESI DELL'EPILESSIA LIMITATA ALLE FEMMINE ASSOCIATA A DISABILITÀ INTELLETTIVA INDOTTA DA MUTAZIONI A CARICO DEL GENE PCDH19.

L'epilessia limitata alle femmine associata a disabilità intellettiva (DEE9) è un disturbo dello sviluppo neurologico caratterizzato da epilessia, disturbi cognitivi e difetti comportamentali e psichiatrici. DEE9 è causata da mutazioni nel gene PCDH19, che codifica per la protocaderina-19 (PCDH19), una proteina che promuove la corretta adesione neuronale. Il meccanismo che collega le mutazioni alla malattia è ancora sconosciuto. PCDH19 è presente nei neuroni eccitatori e inibitori e nelle loro sinapsi dove svolge un ruolo importante nella modulazione delle neurotrasmissioni. Nei nostri studi abbiamo visto che se rimoviamo PCDH19 in un tipo specifico di neuroni inibitori, chiamati neuroni parvalbumina, nel cervello di un topo, vediamo un aumento della sua attività corticale (l'attività elettrica che, nel nostro cervello, possiamo misurare con l'ECG). Ma non è tutto: il topo mostra anche difetti nell'interazione sociale e mostra un comportamento di tipo autistico. Queste osservazioni suggeriscono una correlazione tra la mancanza di PCDH19 nei neuroni che esprimono parvalbumina e la comparsa dei segni distintivi della malattia umana nel topo. Pertanto, è molto importante comprendere quali sono le conseguenze dell'assenza di PCDH19 nei neuroni che esprimono parvalbumina sulla struttura e sulla funzione dei neuroni e delle sinapsi nella corteccia. In particolare studieremo la corteccia prefrontale perché è ricca di neuroni che esprimono parvalbumina. La comprensione dell'impatto dell'assenza di PCDH19 sulle funzioni cerebrali svolte dai neuroni positivi per parvalbumina, potrà aprire nuove strade per lo sviluppo di farmaci promettenti per migliorare la qualità della vita delle bambine che sono affette da questa patologia invalidante.

107

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Glucose transporter type 1 (GLUT1) deficiency syndrome

TOWARDS SMALL-MOLECULE THERAPIES FOR GLUT1 DEFICIENCY SYNDROME: HIGH-THROUGHPUT SCREENING AND BIOPHYSICAL APPROACHES TO IDENTIFY GLUT1 ACTIVATORS

C. Arrigoni[1], M. Lolicato[1], Y. Nugraha[1]

[1]Pavia, Università Di Pavia

Project: GMR24T2041; Lolicato Marco Gaetano

GLUT1 Deficiency Syndrome (GLUT1-DS) is a rare genetic disorder caused by dysfunction in the GLUT1 transporter, which is essential for delivering glucose to the brain. This impaired glucose transport leads to a broad spectrum of neurological symptoms, ranging from cognitive impairments and developmental delays to severe movement disorders and epilepsy. Currently, the ketogenic diet is the primary treatment for GLUT1-DS, as it provides an alternative energy source for the brain. However, it is not universally effective, and many patients struggle with long-term adherence due to its restrictive nature. Pharmacological approaches, particularly small molecules, are often a preferred therapeutic strategy. However, to date, no small-molecule drugs have been identified that can effectively enhance glucose uptake through GLUT1 and alleviate symptoms of the disorder. To address this unmet need, we have developed a yeast-based high-throughput screening assay combined with a series of biophysical experiments using purified human GLUT1 protein to identify potential GLUT1 activators. Our approach has led to the discovery of chemical entities that significantly enhance cell growth rates by increasing GLUT1-mediated glucose uptake. Additionally, we have designed and optimized two fluorescence-based glucose uptake assays, which offer a scalable and robust platform for screening larger small-molecule libraries or testing a series of optimized compounds. These assays will facilitate the identification of more potent GLUT1 activators, bringing us closer to developing a viable pharmacological treatment for GLUT1-DS.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Sindrome da deficit di Glut-1; Encefalopatia da deficit di GLUT1; Deficit dei trasportatori del glucosio, tipo 1; Glut1-DS

VERSO NUOVE TERAPIE FARMACOLOGICHE PER LA SINDROME DA DEFICIT DI GLUT1: SCREENING AD ALTO RENDIMENTO E APPROCCI BIOFISICI PER IDENTIFICARE ATTIVATORI DI GLUT1

La Sindrome da Deficit di GLUT1 (GLUT1-DS) è una rara malattia genetica causata da un malfunzionamento del trasportatore GLUT1, essenziale per il trasporto del glucosio nel cervello. Questo deficit compromette l'apporto energetico cerebrale, portando a una vasta gamma di sintomi neurologici, tra cui ritardi cognitivi, disturbi dello sviluppo, gravi disordini del movimento ed epilessia. Attualmente, la dieta chetogenica rappresenta il principale trattamento per la GLUT1-DS, in quanto fornisce un'alternativa energetica per il cervello. Tuttavia, questa terapia non è efficace per tutti i pazienti e può risultare difficile da seguire nel lungo termine a causa delle sue restrizioni alimentari. Le strategie farmacologiche, in particolare basate su piccole molecole, sono generalmente preferite, ma ad oggi non esistono farmaci in grado di aumentare efficacemente l'assorbimento del glucosio attraverso GLUT1 e alleviare i sintomi della malattia. Per rispondere a questa necessità clinica, abbiamo sviluppato

un saggio di screening ad alto rendimento basato su lievito, combinato con una serie di esperimenti biofisici su proteina GLUT1 umana purificata, per identificare potenziali attivatori di GLUT1. Grazie a questo approccio, abbiamo individuato composti chimici in grado di aumentare significativamente la crescita cellulare, migliorando l'assorbimento del glucosio mediato da GLUT1. Inoltre, abbiamo progettato e ottimizzato due saggi di uptake del glucosio basati sulla fluorescenza, che offrono una piattaforma scalabile e affidabile per lo screening di ampie librerie di piccole molecole o per la valutazione di composti ottimizzati. Questi strumenti consentiranno l'identificazione di attivatori di GLUT1 più potenti, avvicinandoci allo sviluppo di un trattamento farmacologico efficace per la GLUT1-DS

108

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Glucose transporter type 1 (GLUT1) deficiency syndrome

PHENOTYPIC HETEROGENEITY IN PATIENTS WITH GLUCOSE TRANSPORTER TYPE 1 DEFICIENCY (GLUT1DS).

De Giorgis Valentina[1], A. Camerini[2], M. Cavallin[3], T. Granata[1] A. Lodi[2], C. Marini[4], F. Operto[5], C.A. Quaranta[6], F. Ragona[1] A. Riva[7], P. Striano[7], C. Varesio[1], P. Veggiotti[8], M. Lolicato[6]

[1]Pavia, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino - IRCCS
[2]Milano, Associazione Italiana Glut1
[3]Firenze, Neuroscience Department, Meyer Children's University Hospital
[4]Ancona, Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Di Ancona
[5]Catanzaro, Università Di Catanzaro "Magna Graecia&quot
[6]Pavia, Università Di Pavia
[7]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS
[8]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GMR24T2041; Lolicato Marco Gaetano

Glucose transporter type 1 deficiency (GLUT1DS) is a rare genetic disorder caused by mutations in the SLC2A1 gene, leading to a wide range of neurological symptoms, including epileptic seizures, movement disorders, psychomotor delays, and ocular abnormalities. The GLUT1 clinical presentation is highly variable, even within the same family, highlighting its phenotypic heterogeneity. Data from the Italian GLUT1 disease registry, which includes so far information on 76 patients, reveals significant variation in symptom onset and severity. The majority of patients (52%) develop symptoms before age 1, and 35% between ages 2 and 5. The most common symptoms include seizures (45 patients), movement disorders (22 patients), and psychomotor delays (7 patients). Age at diagnosis varies widely, from childhood to adulthood, with about 50% diagnosed before age 8. Genetic analysis shows that most patients have missense mutations in the SLC2A1 gene, but the disease's phenotypic expression varies even among patients with the same mutation. For example, 35% of patients with the same mutation experience severe symptoms, including drug-resistant epilepsy and cognitive impairment, while 42% exhibit a moderate phenotype with controllable seizures and mild movement disorders. The remaining 23% have mild symptoms, such as paroxysmal dyskinesias. This intrafamilial diversity is notable, with about 60% of familial cases showing significant differences in seizure frequency, movement disorder severity, and treatment response. For example a father and son with the same mutation: father had dyskinesias, son had drug-resistant epilepsy and cognitive deficits. The variability in clinical expression suggests that epigenetic, environmental, or genetic modifier factors influence disease progression. These findings emphasize the need for personalized treatments based on detailed phenotyping, which can help identify predictive biomarkers and optimize therapeutic strategies for this complex disorder.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Sindrome da deficit di Glut-1; Encefalopatia da deficit di GLUT1; Deficit dei trasportatori del glucosio, tipo 1; Glut1-DS;

L'ETEROGENEITÀ FENOTIPICA NEI PAZIENTI AFFETTI DA DEFICIT DEL TRASPORTATORE DI GLUCOSIO TIPO 1 (GLUT1DS)

Il deficit del trasportatore del glucosio di tipo 1 (GLUT1DS) è una rara malattia genetica causata da mutazioni nel gene SLC2A1, che porta a sintomi neurologici, tra cui crisi epilettiche, disturbi del movimento, ritardo psicomotorio e anomalie oculari. La presentazione clinica di GLUT1 è molto variabile, anche all'interno della stessa famiglia, evidenziando la sua eterogeneità fenotipica. I dati del registro italiano della malattia GLUT1, che finora include informazioni su 76 pazienti, mostrano una notevole variazione nell'insorgenza e nella gravità dei sintomi. La maggior parte dei pazienti (52%) sviluppa i sintomi prima dell'età di 1 anno, e il 35% tra i 2 e i 5 anni. I sintomi più comuni sono crisi (59%), disturbi del movimento (29%) e ritardo psicomotorio (9%). L'età alla diagnosi varia ampiamente, dall'infanzia all'età adulta, con circa il 50% dei pazienti diagnosticati prima degli 8 anni. L'analisi genetica mostra che la maggior parte dei pazienti ha mutazioni nel gene SLC2A1, ma l'espressione fenotipica della malattia varia anche tra pazienti con la stessa mutazione. Ad esempio, il 35% dei pazienti con la stessa mutazione presenta sintomi gravi, tra cui epilessia farmacoresistente e disabilità cognitiva, mentre il 42% ha un quadro moderato, con crisi controllabili e lievi disturbi del movimento. Il restante 23% presenta sintomi lievi, come discinesie parossistiche. Questa diversità all'interno delle famiglie è significativa, con circa il 60% dei casi familiari che mostra differenze sostanziali nella frequenza delle crisi, nella gravità dei disturbi del movimento e nella risposta ai trattamenti. Ad esempio, un padre e un figlio con la stessa mutazione:il padre ha lievi discinesie, mentre il figlio ha epilessia farmacoresistente e deficit cognitivo. Questi risultati evidenziano la necessità di trattamenti personalizzati basati su una fenotipizzazione dettagliata,che possano aiutare a identificare biomarcatori predittivi e ottimizzare le strategie terapeutiche.

109

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Lafora disease

NEUROINFLAMMATION AND MICROGLIAL DYSFUNCTION IN LAFORA DISEASE: INSIGHTS FROM A ZEBRAFISH MODEL

Della Vecchia Stefania[1], D. Damiani[1], V. Naef[1], M. Baggiani[1], S. Doccini[1], M. Paqualetti[2], S. Migliarini[2], M. Marchese[1], F. M. Santorelli[1]

[1]Pisa, Fondazione IRCCS Stella Maris
[2]Pisa, Università Di Pisa

Project: GSA22B005; Della Vecchia Stefania

Lafora disease (LD) is a progressive myoclonic epilepsy characterized by the accumulation of Lafora bodies in different organs and tissues, including the brain. Despite several advancements, it remains an incurable condition. Neuroinflammation has emerged as a key factor in the progression of neurodegenerative diseases, including LD. This study examined the role of neuroinflammation and microglial cells in LD using a previously characterized zebrafish epm2a knock-out (KO) model. The objectives were to: (I) analyze microglial morphology; (II) study microglial Ca2+ signaling; (III) identify molecular pathways involved in the disease at various developmental stages; (IV) find molecules capable of modulating neuroinflammation and improving the pathological phenotype. Microglial cells appear to play an early role in the zebrafish epm2a-KO model. As early as the larval stage, microglia show a more amoeboid and less ramified morphology than controls, typical of activated microglia during neuroinflammatory response. This increased activation is further confirmed by enhanced microglial Ca2+ signaling, which is crucial for several microglial functions, including pro-inflammatory cytokine secretion and phagocytosis. Transcriptomic analysis revealed dysregulation of key molecular pathways related to neurodegeneration and neuroinflammation, with changes over time. Druggability analysis identified potential therapeutic targets. Pharmacological screenings suggest gliflozins as novel promising candidates for therapeutic repositioning in LD.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Malattia di Lafora; LD; Epilessia mioclonica progressiva, tipo2; EPM2; PME, tipo2

NEUROINFIAMMAZIONE E DISFUNZIONE MICROGLIALE NELLA MALATTIA DI LAFORA: EVIDENZE DA UN MODELLO DI ZEBRAFISH

La malattia di Lafora (LD) è un'epilessia mioclonica progressiva caratterizzata dall'accumulo di corpi di Lafora in diversi organi e tessuti, incluso il cervello. Nonostante i progressi, resta ad oggi incurabile. La neuroinfiammazione è emersa come fattore chiave nella progressione delle malattie neurodegenerative, inclusa la LD. Questo studio ha esaminato il ruolo della neuroinfiammazione e delle cellule microgliali nella LD, utilizzando un modello di zebrafish epm2a knock-out (KO) precedentemente caratterizzato. Gli obiettivi erano: (I) analizzare la morfologia microgliale; (II) studiare la segnalazione del Ca2+ microgliale; (III) identificare pathways molecolari coinvolte nella malattia a vari stadi di sviluppo; (IV) individuare molecole in grado di modulare la neuroinfiammazione e migliorare il fenotipo patologico. Le cellule microgliali mostrano un ruolo precoce nel modello zebrafish epm2a-KO. Già nella fase larvale, la microglia appare più ameboide e meno ramificata rispetto ai controlli, come è tipico della microglia attivata nel processo di neuroinfiammazione. Questa maggiore attivazione è confermata anche dall'aumento del signaling del Ca2+ microgliale che è importante per numerose funzioni microgliali come la secrezione di citochine proinfiammatorie e la fagocitosi. L'analisi trascrittomica ha rivelato la disregolazione di importanti pathways molecolari legate a neurodegenerazione e neuroinfiammazione, con variazioni nel tempo. L'analisi di druggability ha identificato potenziali target terapeutici. Gli screening farmacologici suggeriscono le gliflozine come nuovi candidati promettenti per il riposizionamento terapeutico nella LD.

110

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

MERRF

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

Sacchetti Giulia[1], G. Capirossi[1], M. Capristo[1], V. Del Dotto[1], C. Fiorini[1], L. Caporali[1], C. La Morgia[1], A. Pisano[2], C. Giordano[2], G. D'Amati[2], S. Le[3], A. Prigione[3], V. Carelli[1], A. Maresca[1]

[1]Bologna, Istituto Delle Scienze Neurologiche Di Bologna - IRCCS
[2]Roma, Università Di Roma La Sapienza
[3]Dusseldorf, Heinrich Heine University

Project: GGP20115; Carelli Valerio

The MERRF syndrome is a mitochondrial encephalomyopathy mostly caused by the heteroplasmic m.8344A>G mutation in the mt-tRNALys gene. When mutant mtDNA heteroplasmy exceeds the threshold for symptoms manifestation, defective mitochondrial protein synthesis and respiration occur. The aim of this work was to generate relevant patient-derived MERRF neuronal cell models to test potential therapeutic approaches, since animal models for the disease are still lacking. Only low or intermediate-heteroplasmy (2-45%) induced pluripotent stem cell (iPSC) were generated from patients carrying the m.8344A>G variant. Consequently, iPSC-derived MERRF cortical brain organoids (CORs) lacked an overt phenotype and only showed morphologic abnormalities and a decreased astrocytic population. We have set up a protocol based on ethidium bromide-driven mtDNA bottleneck in MERRF iPSCs that yielded clones at 70% m.8344A>G load, which were then leveraged for CORs and neural progenitor cell (NPCs) generation. Long-term and low dosage rapamycin administration was tested in such models. A 30-day rapamycin treatment during organoids development had a cytotoxic effect in MERRF CORs generated from high-heteroplasmy iPSCs, which failed to grow and prematurely died. On the other hand, rapamycin-treated 50% m.8344A>G NPCs did not reveal any differences in mitochondrial respiration compared to the untreated. Overall, these results demonstrate the difficulty in generating MERRF iPSCs at high heteroplasmy from patient cells. However, our ethidium bromide protocol allows to overcome this issue, raising the number of mutant mtDNA molecules and allowing for generation of proper MERRF models. Rapamycin treatment needs to be fine-tuned in these 2D and 3D neuronal models to effectively evaluate its therapeutic potential. Further investigations on high-heteroplasmy NPCs are ongoing, including the testing of other therapeutic approaches.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Epilessia mioclonica con fibre rosse sfilacciate;

CURARE LA SINDROME MERRF: DAI FIBROBLASTI AGLI ORGANOIDI PER ACCELERARE DALLA SCIENZA DI BASE AI TRIAL CLINICI NELLE MALATTIE MITOCONDRIALI

La sindrome MERRF è un'encefalomiopatia mitocondriale causata principalmente dalla mutazione 8344A>G nel DNA mitocondriale (mtDNA) e determina difetti nella sintesi proteica e nella respirazione mitocondriale quando la percentuale di mtDNA mutato nelle cellule (eteroplasmia) supera una determinata soglia. Data la mancanza di modelli animali per la malattia, lo scopo di questo lavoro è quello di generare modelli cellulari neuronali 2D e 3D derivanti da cellule di paziente per testare potenziali approcci terapeutici. Siamo riusciti a generare cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) derivanti da pazienti con la variante m.8344A>G solamente a intermedia-bassa eteroplasmia. Di conseguenza, gli organoidi corticali (CORs) generati da esse non mostravano un evidente fenotipo, ma solamente anormalità morfologiche

e una ridotta popolazione astrocitaria. Perciò, abbiamo settato un protocollo basato sul trattamento con etidio bromuro per cercare di aumentare l'eteroplasmia delle iPSCs. Abbiamo così ottenuto dei cloni al 70% di mutazione che sono stati usati come base per generare organoidi corticali e precursori neuronali (NPCs). Trattamenti con rapamicina a basso dosaggio e a lungo termine sono stati poi testati sui modelli cellulari citati. Il trattamento a 30 giorni ha avuto un effetto citotossico sugli organoidi, i quali non sono cresciuti e sono morti prematuramente. Complessivamente questi risultati mostrano la difficoltà nella generazione di iPSCs MERRF ad alta eteroplasmia derivanti da paziente. Tuttavia, il nostro protocollo basato sull'etidio bromuro ci ha permesso di superare questo limite, consentendoci di generare opportuni modelli cellulari MERRF. I trattamenti con rapamicina devono essere messi a punto su questi modelli cellulari per valutare efficacemente il suo potenziale terapeutico. Ulteriori studi sugli NPCs ad alta eteroplasmia sono in corso, incluso il trattamento con altri approcci terapeutici.

111

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Myoclonic-astastic epilepsy

HDAC INHIBITORS AND A NEW SLC6A1 KNOCKOUT ZEBRAFISH MODEL: A NOVEL STRATEGY TO IDENTIFY POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS FOR MYOCLONIC-ASTATIC EPILEPSY

Tesoriero Chiara[1], E. Cannone[2], F. Greco[1], F. Ghirotto[1], G. Targa[1], E. Santandrea[1], M. Cambiaghi[1], A. Vettori[1]

[1]Verona, Università Di Verona
[2] Brescia, Università Degli Studi Di Brescia

Project: GSA23P011; Vettori Andrea

Myoclonic-astatic epilepsy (MAE) is a pediatric syndrome characterized by several clinical features, including intellectual disability, behavioral disorders, frequent seizures, and resistance to pharmacological treatments. In 2015, MAE was linked to autosomal dominant mutations in the SLC6A1 gene, which encodes the gamma-aminobutyric acid transporter (GAT-1). This transporter is crucial for the reuptake of the inhibitory neurotransmitter GABA into presynaptic terminals and glial cells. Most of the known pathological SLC6A1 variants cause partial or complete loss of GAT-1 function, leading to reduced protein expression, impaired trafficking, misfolding, and aggregation within the endoplasmic reticulum. Despite significant advancements in research, the pathogenetic mechanisms underlying MAE remain unclear. Given these unresolved issues and the critical role of GAT-1 in neuronal function, we generated the first slc6a1 knockout (KO) zebrafish (Danio rerio) line using CRISPR-Cas9 technology. This model, after a comprehensive morphological, behavioral, and neurophysiological characterization, resulted to be viable, fertile, and capable of reproduction. Nevertheless, a 50% reduction in GAT-1 expression led to developmental delays, behavioral alterations, and epileptic-like alterations, both with and without Pentylenetetrazol administration. In parallel experiments, we conducted a target-driven drug screening using histone deacetylase (HDAC) inhibitors to evaluate their potential to enhance Slc6a1 transcription. So far, half of the selected HDAC inhibitors have been tested, yielding promising results. Notably, exposure to Sodium Phenylbutyrate and Panobinostat significantly increased Slc6a1 expression. These findings underscore the utility of our zebrafish model as a powerful tool for identifying novel therapeutic approaches and elucidating the pathological mechanisms associated with SLC6A1-related disorders.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Epilessia mioclono-astatica;Sindrome di Doose; Epilessia con crisi mioclono-astatiche; Epilessia con crisi mioclono-atoniche; Epilessia mioclonica-astatica della prima infanzia; EMAS, MAE

INIBITORI DELLE ISTONI DEACETILASI E UN MODELLO SPERIMENTALE DI ZEBRAFISH: VERSO NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI PER L'EPILESSIA MIOCLONICA-ASTATICA

L'epilessia mioclonica-astatica (MAE) è una patologia pediatrica caratterizzata da diverse manifestazioni cliniche tra cui disabilità intellettiva, disturbi del comportamento, crisi epilettiche frequenti e resistenza ai trattamenti farmacologici. Nel 2015, la MAE è stata collegata a mutazioni autosomiche dominanti nel gene SLC6A1, che codifica per il trasportatore dell'acido gamma-aminobutirrico (GAT-1). Questo trasportatore è cruciale per il riassorbimento del neurotrasmettitore inibitorio GABA nei terminali presinaptici e nelle cellule gliali. Nonostante i significativi progressi nella ricerca, i meccanismi patogenetici alla base della MAE rimangono poco chiari. Per indagare più a fondo il ruolo cruciale di GAT-1 nel mantenere un corretto funzionamento neuronale, abbiamo generato la prima linea di zebrafish knockout (KO) per il gene SLC6A1 utilizzando la tecnologia CRISPR-Cas9. La completa caratterizzazione morfologica, comportamentale e neurofisiologica di questo modello non ha rivelato alterazioni nella fitness, nella fertilità e nella capacita di riprodursi. Tuttavia, una riduzione del 50% dell'espressione di GAT-1 ha determinato ritardi nello sviluppo e alterazioni epilettiformi, sia in condizioni fisiologiche che in seguito a somministrazione di Pentylenetetrazolo. In esperimenti paralleli, abbiamo condotto uno screening farmacologico mirato utilizzando inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC) per valutare la loro capacità di modulare la trascrizione di Slc6a1 in-vivo. Finora, metà degli inibitori HDAC selezionati sono stati testati, producendo risultati promettenti. In particolare, l'esposizione al Fenilbutirrato di Sodio e al Panobinostat ha significativamente aumentato l'espressione di Slc6a1. Questi risultati sottolineano l'utilità del nostro modello di zebrafish come prezioso strumento per identificare nuove strategie terapeutiche ed elucidare i meccanismi patologici associati ai disturbi correlati al gene SLC6A1.

112

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL)

Angelman syndrome

WHY DOES IMPAIRED PROTEIN DEGRADATION LEAD TO NEURONAL HYPEREXCITABILITY AND DISTURBED CORTICAL FUNCTIONS?

Ratto Gian Michele[1], S. Landi[1], M. Santi[1], A. Genovese[1], S Giubbolini[2], T. Garavaldi[3], G. Pasquini[3], G. Nardi[1], M. Marchese[4], H. Tsushima[2], S. Giovedì[2], A. Fassio[5], C. Lodovichi[1],

[1]Pisa, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Genova, Università Di Genova
[3]Pisa, Scuola Normale Superiore
[4]Pisa, Fondazione Stella Maris - IRCCS

[5]Pisa, Università Di Genova

Project: GMR24T1119; Ratto Gian Michele

Several brain disorders are associated with impaired protein degradation and, despite different genetic backgrounds, share some common neurological features such as disruption of sleep/circadian rhythm and epilepsy. Here we propose a unifying hypothesis that suggests a direct causal link between defective protein degradation and hyperexcitability. This link is due to a high concentration of intracellular chloride (Cl) required to compensate for the loss of intracellular pressure due to the permanence of non-degraded protein clusters. During their lifetime, proteins transition from the cytosolic phase, where new-born proteins are dispersed in water, to different states of aggregation as they condense in clusters. Importantly, protein degradation is also preceded by protein clustering. When protein degradation is inhibited by several possible genetic defects, the consequence is an accumulation of non-degraded protein clusters. Recent data show that when proteins condense, they contribute less to osmotic pressure. This would lead to cell shrinkage, which is unacceptable in a complex organ, and thus, the loss of pressure is compensated by the influx of several ions including Cl. The Cl load has an important effect on neurons: it weakens synaptic inhibition, the mechanism that protects the brain from excessive excitation, and that plays an important part in cognitive functions. Our hypothesis suggests a role of intracellular chloride in several heterogeneous brain diseases, suggesting the regulation of chloride fluxes as a druggable target. We are currently verifying this hypothesis in a mouse model for Ceroid Lipofuscinosis 1, a lisosomal disorder characterized by impaired autophagy, where our preliminary observations show hyperexcitability due to high concentration of intracellular Chloride already in presymptomatic phases of the disease. We will extend this study to Ube3A deficient mice (Angelman syndrome), a second pathology characterized by defective proteostasys."

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Ceroidolipofuscinosi neuronale; NCL

Sindrome di Angelman; AS

PERCHÈ DIFETTI DELLA DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE PORTA A IPER-ECCITABILITÀ NEURONALE E A DIFETTI COGNITIVI?

Diverse patologie cerebrali sono associate ad una difettosa degradazione delle proteine e, nonostante il diverso background genetico, condividono alcune caratteristiche neurologiche come i disturbi del sonno e del ritmo circadiano e l'epilessia. Qui proponiamo un'ipotesi unificante che suggerisce un legame causale diretto tra la degradazione proteica difettosa e l'ipereccitabilità neuronale. Ciò è dato dalle alte concentrazioni di cloro intracellulare necessarie per compensare la riduzione di pressione osmotica dovuta ai cluster proteici non degradati. Le proteine passano da essere soluti dispersi nell'ambiente intracellulare ad una fase di aggregazione. È importante sottolineare che la degradazione stessa delle proteine è preceduta da aggregazione. Quando la degradazione delle proteine è inibita/ostacolata da diversi possibili difetti genetici, la conseguenza è un accumulo di aggregati proteici. Un lavoro recente ha dimostrato che quando le proteine sono aggregate, contribuiscono meno alla pressione osmotica. Ciò comporterebbe una contrazione del volume cellulare, inaccettabile in un organo complesso come il cervello, e quindi la perdita di pressione osmotica è compensata dall'afflusso di diversi ioni, incluso il cloro. L'aumento del cloro intracellulare ha un effetto importante sui neuroni: indebolisce l'inibizione sinaptica, il meccanismo che protegge il cervello dall'eccitazione eccessiva e che svolge un ruolo importante nelle funzioni cognitive. La nostra ipotesi suggerisce un ruolo chiave del cloro intracellulare nell'ipereccitabilità delle molteplici forme delle malattie da associate a ridotta degradazione, suggerendo un bersaglio farmacologico comune. In esperimenti preliminari abbiamo dimostrato la correttezza dellanostra ipotesi in un modello per la ceroide lipofuscinosi 1. In seguito estenderemo lo studio in un modello murino per la sindrome di Angelman.

113

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy (ADSHE)

NEURONAL NICOTINIC RECEPTORS CONTAINING THE ?2V287L SUBUNIT, LINKED TO AUTOSOMAL DOMINANT SLEEP-RELATED HYPERMOTOR EPILEPSY (ADSHE), ALTER NEOCORTEX SYNAPTOGENESIS

Cerina Marta[1], A. B. Zeynali[2], F. Gullo[1], A. Amadeo[2], A. Becchetti[1]

[1]Milano, Università Di Milano Bicocca
[2]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GGP12147; Becchetti Andrea

ADSHE is a rare form of focal epilepsy which can be caused by mutations in neuronal nicotinic receptor (nAChR) subunits. Using conditional mouse strains, we found that expression of the gain-of-function β2V287L mutation in layer V of prefrontal cortex (PFC) permanently impairs the glutamatergic input to fast-spiking (FS) parvalbumin (PV)-expressing GABAergic cells. The ensuing deficit of recurrent inhibition of pyramidal excitatory neurons is the likely culprit of lifelong propensity to develop seizures. This effect requires that β2V287L is expressed throughout the two first postnatal weeks, suggesting that β2-containing nAChRs regulate the maturation of glutamatergic synapses on FS neurons.

The latter process is modulated by the NRG/ErbB4 pathway. ErbB4 resides on the somatodendritic compartment of neocortex GABAergic neurons and is stimulated by nAChR activation. Our results suggest β2V287L could alter synaptic balance in two ways. 1) Immunostaining in adult PFC layer V revealed an overall increase of NRG1+ synapses in β2V287L mice, but a selective decrease of the glutamatergic NRG1+ synapses contacting PV+ GABAergic cells. Thus, prolonged engagement of hyperfunctional β2V287L nAChRs may overactivate the NRG/ErbB4 pathway, leading to selective Ca2+-dependent depression of the powerful pyramidal-to-FS synapses. 2) In postnatal mouse cortical cultures, inhibiting ErbB4 around the 7th day in vitro leads to stable potentiation of excitatory input on FS cells. This agrees with the reciprocal evidence that NRG/ErbB4 overexertion by nicotinic stimulus increases local GABA release on pyramidal neurons, in turn leading to long term depression of the latter and defective glutamate release on GABAergic neurons. Hence, overstimulating NRG/ErbB4 in β2V287L mice could lastingly depress pyramidal neurons, because of early GABAergic hyperactivity.

Our study points to potential molecular targets that could counteract the epileptogenic process during synaptic maturation.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Epilessia autosomica dominante correlata al sonno con ipermotricità

(ADSHE)

I RECETTORI NICOTINICI NEURONALI CONTENENTI LA SUBUNITÀ ?2V287L, ASSOCIATI A EPILESSIA AUTOSOMICA DOMINANTE CORRELATA AL SONNO CON IPERMOTRICITÀ (ADSHE), ALTERANO LA SINAPTOGENESI NELLA NEOCORTECCIA

L'ADSHE è una rara forma di epilessia focale che può essere causata da mutazioni nei recettori nicotinici neuronali (nACHRs). Utilizzando ceppi murini condizionali, abbiamo scoperto che l'espressione della mutazione"gain-of-function"β2V287LnellostratoVdella corteccia prefrontale (PFC) compromette l'input glutammatergico sulle cellule GABAergiche fast-spiking (FS) che esprimono parvalbumina (PV), predisponendo allo sviluppo di crisi epilettiche. Questo effetto richiede che β2V287L venga espresso durante le prime due settimane postnatali, suggerendo che i nACHRs contenenti β2 regolino la maturazione delle sinapsi glutammatergiche sui neuroni FS. Quest'ultimo processo è modulato dal pathway NRG/ErbB4.

I nostri risultati suggeriscono che β2V287L potrebbe alterare l'equilibrio sinaptico in due modi. 1) L'immunoistochimica nello strato V della PFC di topi adulti β2V287L ha rivelato un generale aumento delle sinapsi NRG1+, ma una riduzione selettiva delle sinapsi glutammatergiche NRG1+ che contattano le cellule GABAergiche PV+. Pertanto, i recettori nicotinici iperfunzionali β2V287L potrebbero iperattivare la via NRG/ErbB4, portando a una depressione selettiva dipendente dal Ca2+ delle potenti sinapsi piramidali-FS. 2) Nelle colture corticali murine, l'inibizione di ErbB4 intorno al settimo giorno in vitro porta a un potenziamento dell'input eccitatorio sui neuroni FS. Questo è coerente con l'evidenza reciproca che l'iperattivazione della via NRG/ErbB4 da parte dei nAChRs aumenta il rilascio di GABA sui neuroni piramidali, causando una depressione a lungo termine di questi ultimi e un deficit nel rilascio di glutammato sui neuroni GABAergici. Pertanto, l'iperstimolazione della via NRG/ErbB4 nei topi β2V287L potrebbe deprimere permanentemente i neuroni piramidali a causa dell'iperattività GABAergica precoce.

Il nostro studio indica potenziali bersagli molecolari che potrebbero contrastare il processo epilettogeno durante la maturazione sinaptica.

114

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

West syndrome

114Dissecting the molecular function of KLHL17 in the pathophysiology of West Syndrome

Raya Ibrahim[1], C. Ongaro[1], M. Biagioni[1], E. Fraviga[1], D. Pozzi[1], M. Fossati[1]

[1]Pieve Emanuele, Milan, Humanitas University

Project: GJC22059; Fossati Matteo, Matteoli Michela

West syndrome (WS, also known as infantile spasms) is a rare epilepsy syndrome that manifests in infants through epileptic spasms. The aetiology of WS is multifactorial and includes both genetic and non-genetic factors. The underlying pathogenic mechanisms remain unknown, and no effective treatments are currently available. Among genetic factors involved in WS, alterations of the brain-specific Kelch-like 17 (KLHL17) were identified in a cohort of WS patients. Recently, a mutation in KLHL17 was also found in patients with intellectual disability and autism, further reinforcing its role in brain pathophysiology. The function of KLHL17 is largely unknown. A few reports suggested that it interacts with actin cytoskeleton, GluK2 subunit of kainite receptors (KARs) and the E3 ubiquitin ligase CUL3, ultimately promoting GluK2 degradation. To explore the role of KLHL17 in neurodevelopment we are assessing: i) the subcellular distribution of KLHL17 in cortical neurons; ii) the impact of KLHL17 inactivation on key neurodevelopmental processes, such as neuronal migration, synapse development and GABA switch, and iii) on neuronal network activity; and iv) the protein interaction network of KLHL17. Preliminary data show that KLHL17 is enriched at both excitatory and inhibitory synapses, and that it regulates the GABA switch through the modulation of the Potassium Chloride Cotransporter 2 (KCC2) expression. We are currently optimizing an in vivo proximity-dependent biotin identification (iBioID) protocol to identify KLHL17 interactors. Together, this project could yield fundamental information on the role of KLHL17 in neurodevelopment and in the pathophysiology of neurodevelopmental disorders.

Disordini genetici neurologici/Epilessie

sindrome di West; sindrome da spasmi infantili

ANALISI DELLA FUNZIONE DEL GENE KLHL17 NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DI WEST

La sindrome di West (WS) è un raro tipo di epilessia dello sviluppo che causa spasmi infantili. La WS ha un'origina multifattoriale, che include sia fattori genetiche che ambientali, ma i meccanismi patogenetici sono ancora poco compresi e, ad oggi, non esiste una terapia efficace. Alteriazioni del gene KLHL17 sono associate alla WS e, più recentemente, alla disabilità intellettiva e all'autismo. Tuttavia, la sua funzione cellulare e molecolare nello sviluppo dei circuiti nervosi non è nota. In questo progetto, studiamo il ruolo neuronale di KLHL17 e l'impatto della manipolazione della sua espressione e funzione sul neurosviluppo. Risultati preliminari ottenuti in laboratorio indicano che KLHL17 è presente nelle sinapsi eccitatorie ed inibitorie e che regola la trasmissione GABAergica durante il neurosviluppo, un evento fondamentale per I nostri risultati iniziali mostrano la distribuzione precedentemente sconosciuta di KLHL17 nella sinapsi e il suo ruolo nella segnalazione e nella funzione sinaptica. Questo progetto di ricerca potrebbe migliorare la nostra comprensione dei disturbi del neurosviluppo.

115

Genetic neurological disorder/Ataxias

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay

ALTERATIONS OF SACSIN RNA-BINDING PROPERTIES ARE CONNECTED TO THE DEVELOPMENT OF ARSACS.

Giambruno Robertov[1], L. Longov[1], G. Cappelli[1], R. Carrotta[1] M. A. Costa[1], A. Cusimano[1], M. Mangione[1], V. Martorana[1] R. Passantino[1], S. Vilasi[1], R. Giambruno[1]

[1]Palermo, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GSA23L002; Giambruno Roberto

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) is a neurodegenerative disease mainly characterized by cerebellar ataxia, progressive spasticity and peripheral neuropathy. It is a

childhood onset disease caused by point mutations in the SACS gene (13q11) that codifies the protein SACSIN. The loss of SACSIN expression has been reported to affect the proper structure and functions of the neuronal cytoskeleton and mitochondria. However, it is still under debate whether this is a cause or a consequence. SACSIN is a multidomain protein that was suggested to bind to RNAs. However, the RNA-binding properties of SACSIN have never been investigated. Thus, we decided to investigate whether the putative alteration of SACSIN RNA-binding ability can be at the basis of the molecular mechanisms that lead to ARSACS etiology. To this extent, we are currently characterizing the structural and stability properties of SACSIN domains, as well as its RNA-binding ability through in silico, in vitro and in cells strategies. We aim at unveiling key molecular aspects that can eventually be exploited to restore SACSIN altered RNA-binding properties as innovative strategies to treat ARSACS patients.

Disordini genetici neurologici/Atassie

Atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay; ARSACS;

L'ALTERATA CAPACITÀ DI SACSINA DI LEGARE L'RNA È CONNESSA CON LO SVILUPPO DELL'ARSACS.

L'atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS) è una malattia neurodegenerativa principalmente causata da atassia cerebrale, una progressiva spasticità e neuropatia periferica. La malattia è causata da mutazioni a carico del gene SACS (13q11) che alterano l'espressione della proteina SACSINA. La malattia si manifesta in età pediatrica e progredisce rapidamente negli anni. Ad oggi non vi sono trattamenti specifici per i pazienti affetti da ARSACS, principalmente causato dal fatto che non si conoscono ancora le funzioni molecolari della SACSINA. Purtroppo questo è causato dalle gigantesche dimensioni di questa proteina che impediscono lo studio attraverso i canonici esperimenti di biologia molecolare. SACSINA è una proteina con molti domini ed è stata predetta avere la capacità di legare l'RNA. Ad oggi però, l'interazione di SACSINA con gli RNA non è mai stata studiata. Abbiamo dunque deciso di studiare come una possibile alterata capacità di legame all'RNA da parte di SACSINA possa essere la causa di alcuni dei fenotipi osservati nelle cellule di pazienti ARSACS. Stiamo dunque studiando a livello molecolare le proprietà strutturali e di stabilità dei domini di SACSINA, così come la sua capacità di legare l'RNA, con l'obiettivo di identificare specifiche interazioni molecolari, assenti in cellule senza SACSINA, che se ripristinate possano diventare una possibile futura strategia terapeutica per i pazienti ARSACS.

116

Genetic neurological disorder/Ataxias

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay

INVESTIGATING THE ROLE OF NEUROINFLAMMATION AS A CENTRAL NODE TO DRIVE NOVEL RETINAL PHENOTYPE OBSERVED IN ARSACS ZEBRAFISH MODEL

NAEF VALENTINA[1], "M.Giacich[1], S. Della Vecchia[1], M. Battaglini[2], G.Ciofani[2], M.Marchese[1], D.Damiani[1], F.M. Santorelli[1], V. Naef[1]

[1]PISA, Fondazione Stella Maris - IRCCS
2Pontedera, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)

Project: GSA24A001; Naef Valentina

Mutations in the SACS gene have been linked to autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS). This is a clinically and genetically heterogeneous disease characterized by slow progressive cerebellum ataxia, spasticity, sensorimotor neuropathy, and a combination of other manifestations including retinal abnormalities probably due to abnormal retinal development. Sacsin function is exclusively studied on neuronal cells, where it regulates mitochondrial network organization and facilitates the normal polymerization of neuronal intermediate filaments (i.e., neurofilaments and vimentin). However, public transcriptomics data indicated that SACS is also expressed in glial cells, including astrocytes, Müller glia, oligodendrocyte precursor cells, mature oligodendrocytes and microglia suggesting a possible role of glial cells in ARSACS pathogenesis. Microglia, the resident immune cells in the retina and nervous system, makes irreplaceable contributions to the maintenance of normal homeostasis and immune surveillance of these systems. When inflammation becomes chronic, hyperactivated microglia may contribute to the degeneration of neurons and photoreceptors through phagocytosis and exacerbate retinal injury by producing multiple proinflammatory mediators. Sacs-null zebrafish embryos, in addtion to replicating the main features of ARSACS, showed impaired visual function following photoreceptor degeneration. The main goal of this pilot study is to shed light on the role of neuroinflammation on glial cells in leading retinal defects observed in ARSACS zebrafish model. To achieve this we will develop a ''crispant'' model of sacsin in mpeg1.1:GFP transgenic line. We hope to lay the bases for future studies giving new relevant information about ARSACS alterations at a glial level and their contribution to retinal neurodegeneration.

Disordini genetici neurologici/Atassie

Atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay; ARSACS;

STUDIO DEL RUOLO DELLA NEUROINFIAMMAZIONE COME NODO CENTRALE PER GUIDARE IL NUOVO FENOTIPO RETINICO OSSERVATO NEL MODELLO DI PESCE ZEBRA ARSACS

L'atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay (ARSACS) è una rara malattia neurodegenerativa ad esordio precoce. Sebbene la maggior parte degli studi sulla funzione del gene SACS si siano concentrati quasi esclusivamente sui neuroni, il possibile ruolo delle cellule gliali nella patogenesi dell'ARSACS è completamente sconosciuto. È stato chiaramente dimostrato che nel microambiente retinico, la microglia fornisca costantemente ai fotorecettori un supporto neurotrofico esacerbando la neuroinfiammazione e accelerando la morte delle cellule neuronali. Tuttavia, uno stato di neuroinfiammazione incrollato può portare ad eventi di neurodegenerazione. In particolare, i fotorecettori sia per la loro natura, funzione e per la loro costruzione fisiologica, sono particolarmente suscettibili a diverse condizioni di stress, inclusa la neuroinfiammazione cronica. In questo studio pilota, utilizzeremo negli embrioni di pesce zebra la tecnologia CRISPR/Cas9 per indurre una perdita transiente del gene sacs utilizzando una linea transgenica specifica, che ci permetterà di valutare in vivo l'effetto della perdita di funzione del gene sacs a livello della microglia, dandoci maggiori informazioni sullo stato di infiammazione retinica ed il suo potenziale contributo sullo sviluppo del fenotipo retinico osservato nelle larve mutanti per il gene sacs.

117

Genetic neurological disorder/Ataxias

Familial paroxysmal ataxia

Episodic ataxia 2; Epileptic encephalopathy 42

HIPPOCALCIN-LIKE PROTEIN 4 AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET FOR CAV2.1 MUTATIONS IN EPISODIC ATAXIA TYPE 2 AND EPILEPTIC ENCEPHALOPATHY 42

Ragnini Asja[1], F. Jaudon[1], J. Muià[1], A. Maienza[1], L.A. Cingolani[1]

[1]Trieste, Università Di Trieste

Project: GGP19181; Cingolani Lorenzo

Cav2.1 channels are crucial for fast synaptic transmission at central synapses. The CACNA1A gene, encoding the primary α1 subunit of CaV2.1, undergoes extensive alternative splicing, potentially generating thousands of channel isoforms, including Cav2.1[EFa] and CaV2.1[EFb], which are expressed throughout the adult brain. Our previous findings show that Cav2.1[EFa] supports synchronous release and short-term synaptic depression, whereas Cav2.1[EFb] boosts asynchronous release and short-term facilitation, likely due to their distinct nanoscale distribution within the active zone. Mutations in CACNA1A, which result in disrupted splicing and functional abnormalities, are linked to neurological disorders such as episodic ataxia type 2 (EA2) and epileptic encephalopathy type 42 (EE42). Given the complexity of the CACNA1A gene and the CACNA1A-related disorders, the focus on channel dysfunction alone presents challenges in understanding disease mechanisms and therapeutic strategies. Here, we hypothesized that Hippocalcin-like protein 4 (HPCAL4), a neuronal calcium sensor known to positively modulate CaV2.1 channels, may serve as a potential compensatory mechanism for dysfunctional CaV2.1 channels. To test this hypothesis, we examined the expression of four loss-of-function CaV2.1[EFa] mutations (E147K, F1406C, F1491S, and S218L) in primary cortical neurons using super-resolution structured illumination microscopy (SIM). These mutations resulted in significantly reduced puncta number and fluorescence intensity in neurites of cortical neurons, indicating impaired CaV2.1 expression and trafficking. Our ongoing work aims to explore the interaction between Cav2.1 and HPCAL4, assessing their colocalization to evaluate HPCAL4's potential to compensate for dysfunctional CaV2.1 channels."

Disordini genetici neurologici/Atassie

Atassia parossistica Familiare; Atassia episodica, tipo 2;

LA PROTEINA SIMILE ALL'IPPOCALCINA 4 COME POTENZIALE BERSAGLIO TERAPEUTICO PER LE MUTAZIONI DI CAV2.1 NELL'ATASSIA EPISODICA DI TIPO 2 E NELL'ENCEFALOPATIA EPILETTICA 42

I canali CaV2.1 sono cruciali per la trasmissione sinaptica rapida nelle sinapsi centrali. Il gene CACNA1A, che codifica la subunità α1 di CaV2.1, subisce un ampio splicing alternativo, generando numerose isoforme, tra cui CaV2.1[EFa] e CaV2.1[EFb], entrambe espresse nel cervello adulto. CaV2.1[EFa] supporta il rilascio sincrono e la depressione sinaptica a breve termine, mentre CaV2.1[EFb] favorisce il rilascio asincrono e la facilitazione sinaptica, probabilmente per la loro diversa distribuzione su scala nanometrica nei terminali sinaptici. Le mutazioni di CACNA1A, che alterano lo splicing e la funzione del canale, sono associate a disturbi neurologici come l'atassia episodica di tipo 2 (EA2) e l'encefalopatia epilettica 42 (EE42). Data la complessità del gene CACNA1A e dei disturbi correlati, concentrarsi solo sulla disfunzione del canale è una sfida per comprendere i meccanismi patologici e sviluppare terapie mirate. Abbiamo ipotizzato che la proteina 4 simile all'ippocalcina (HPCAL4), un sensore neuronale del calcio che modula positivamente CaV2.1, possa agire come meccanismo compensatorio per i canali disfunzionali. Per testare questa ipotesi, abbiamo analizzato l'espressione di quattro mutazioni a riduzione di funzione di CaV2.1[EFa] (E147K, F1406C, F1491S, S218L) in neuroni corticali primari tramite microscopia a super-risoluzione con illuminazione strutturata (SIM). Queste mutazioni hanno ridotto significativamente il numero di "puncta" e l'intensità di fluorescenza nei neuriti, suggerendo un'espressione e un trasporto alterati di CaV2.1. Il nostro lavoro in corso mira a esplorare l'interazione tra CaV2.1 e HPCAL4, valutandone la colocalizzazione per determinare il potenziale ruolo di HPCAL4 nel compensare la disfunzione dei canali CaV2.1

118

Genetic neurological disorder/Ataxias

Posterior column ataxia-retinitis pigmentosa syndrome

POSTERIOR COLUMN ATAXIA AND RETINITIS PIGMENTOSA: DEVELOPMENT OF AN IPSC DERIVED SENSORY NEURON MODEL OF THE DISEASE

D.I. Zanin Venturini[1], C. Riganti[1], D. Chiabrando[1]

[1]Turin, Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Turin, Turin, Italy

Project: GMR22T1076; Chiabrando Deborah

Posterior Column Ataxia and Retinitis Pigmentosa (PCARP) is a rare genetic disorder with childhood onset, characterized by progressive degeneration of sensory neurons and/or photoreceptors, leading to sensory ataxia, pain insensitivity, and retinitis pigmentosa. This condition results from mutations in the Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor 1 (FLVCR1) gene. FLVCR1 functions as a choline/ethanolamine transporter and as scaffold protein within the IP3R3-VDAC complex, regulating mitochondrial Ca2+ influx at Mitochondria-Associated Membranes (MAMs). However, the mechanisms behind the disease remain unclear, and a therapy is lacking. This study aims to explore novel mechanistic insights of the disease pathogenesis using sensory neurons differentiated from patient-derived iPSCs. Our results show that patient-derived fibroblasts carrying different pathogenic FLVCR1 variants exhibit altered MAMs structure and function, leading to bioenergetic failure. Specifically, fibroblasts display fewer mitochondria-ER contact sites, reduced ER-to-mitochondria Ca2+ transfer, and impaired TCA cycle flux and OXPHOS. To further investigate disease mechanisms, we reprogrammed patient fibroblasts into iPSCs and successfully differentiated them into a pure sensory neuron culture expressing the specific nuclear marker BRN3A. We are currently evaluating whether mutant sensory neurons display alteration in the neurite outgrowth and network formation and in the neurotrophic signaling. Moreover, metabolic parameters and specific enzyme activities are under investigation. Overall, our experimental model provides a valuable tool for studying the disease in vitro. However, further studies are required to fully elucidate the pathogenic mechanisms and identify potential therapeutic strategies.

Disordini genetici neurologici/Atassie

Atassia del cordone posteriore - retinite pigmentosa; Atassia del cordone posteriore - retinite pigmentosa, autosomica recessiva;PCARP;

ATASSIA DELLA COLONNA POSTERIORE E RETINITE PIGMENTOSA: SVILUPPO DI UN MODELLO DELLA MALATTIA BASATO SU NEURONI SENSORIALI DERIVATI DA IPSC

L'Atassia della Colonna Posteriore e Retinite Pigmentosa (PCARP) è una rara patologia genetica a esordio infantile, caratterizzata da una progressiva degenerazione dei neuroni sensoriali e/o dei fotorecettori, con conseguente atassia sensoriale, insensibilità al dolore e retinite pigmentosa. Questa condizione è causata da mutazioni nel gene Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor 1 (FLVCR1). FLVCR1 funziona sia come trasportatore di colina/etanolammina sia come proteina scaffold all'interno del complesso IP3R3-VDAC, regolando l'afflusso di Ca^{2+} mitocondriale a livello delle membrane associate ai mitocondri (MAMs). Tuttavia, i meccanismi alla base della malattia rimangono poco chiari e al momento non esiste una terapia efficace. Questo studio si propone di esplorare nuovi aspetti della patogenesi della malattia utilizzando neuroni sensoriali differenziati da iPSC derivate da pazienti. I nostri risultati mostrano che i fibroblasti di pazienti con diverse varianti patogene di FLVCR1 presentano alterazioni nella struttura e nella funzionalità delle MAMs, portando a un deficit bioenergetico. In particolare, i fibroblasti mostrano una ridotta presenza di siti di contatto mitocondri-ER, un trasferimento di Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri compromesso e una ridotta attività del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Per approfondire i meccanismi della malattia, abbiamo riprogrammato i fibroblasti dei pazienti in iPSC e li abbiamo differenziati con successo in una coltura pura di neuroni sensoriali, esprimente il marcatore nucleare specifico BRN3A. Attualmente stiamo valutando se i neuroni sensoriali mutanti mostrino alterazioni nella crescita e nella formazione del network neuronale, nonché nei segnali neurotrofici. Inoltre, parametri metabolici e attività enzimatiche specifiche sono in fase di analisi. Nel complesso, il nostro modello sperimentale rappresenta uno strumento prezioso per lo studio della malattia in vitro. Tuttavia, saranno necessarie ulte

119

Genetic neurological disorder/Ataxias

Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive

INVESTIGATING VPS13D-MEDIATED MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN AUTOSOMAL RECESSIVE SPINOCEREBELLAR ATAXIA-4 (SCAR4)

Sala Francesca Giulia[1], L. Iannotta[1], M. Zambito[2], P. Colombi[3] M. Leonzino[1]

[1]Rozzano, Milan, Humanitas Research Hospital
[2]Rozzano, Milan, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[3]Pavia, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GJC21115; Leonzino Marianna

Mutations in VPS13D protein have recently been associated with the autosomal recessive neurological disorder SCAR4, characterized by ataxic gait, hyperreflexia and spasticity. VPS13D, a member of the VPS13 family, is known to be a bridge-like protein mediating lipid transfer at membrane contact sites, specifically involved in mitochondrial homeostasis. Indeed, VPS13D knockdown has been linked to the accumulation of enlarged, spherical mitochondria and impaired mitochondrial clearance in various cellular and animal models. Importantly, VPS13D knockout is lethal, underscoring the essential and ubiquitary function of this protein. Despite these findings, the precise cellular processes mediated by VPS13D remain unclear, and the pathogenic mechanisms underlying SCAR4 are still largely unexplored. To investigate mechanistic features of VPS13D's role in SCAR4, we are exploiting two complementary approaches. On one hand, we generated HEK293T cells stably expressing a VPS13D-targeted shRNA that display drastically decreased levels of VPS13D. This approach provides information about how cells respond to long-lasting VPS13D downregulation, uncovering potential compensatory mechanisms that emerge in response to prolonged protein downregulation. On the other hand, we generated a HEK293T line carrying a degron tag within VPS13D sequence, allowing us to achieve a time-controlled, inducible and reversible depletion of VPS13D protein upon addition of an inducer. Using this model, we are analyzing the acute and direct effects of VPS13D downregulation to define its specific function(s) and involvement in SCAR4 pathogenesis. Particularly, we are focusing on mitochondrial morphology and health via assessment of mitochondrial membrane potential and Oxygen Consumption Rate. Together, these combined and complementary approaches are advancing our understanding of SCAR4, clarifying VPS13D's role in mitochondrial biology and the pathogenetic steps leading to disease manifestation.

Disordini genetici neurologici/Atassie

Atassia spinocerebellare, autosomica recessiva

STUDIO DELLE DISFUNZIONI MITOCONDRIALI MEDIATE DA VPS13D NELLA ATASSIA SPINOCEREBELLARE AUTOSOMICA RECESSIVA SCAR4

Mutazioni a carico della proteina VPS13D sono state recentemente associate a SCAR4, una patologia neurologica autosomica recessiva caratterizzata da atassia nella deambulazione, iperreflessia e spasticità. VPS13D, appartenente alla famiglia di VPS13, è stata identificata come un trasportatore di lipidi che opera nei punti di contatto tra organelli, con un ruolo chiave nell'omeostasi mitocondriale. Studi in modelli animali e cellulari hanno dimostrato che la riduzione di VPS13D porta ad accumulo di mitocondri con morfologia alterata e a difetti nella mitofagia. La completa assenza di VPS13D, invece, è letale. L'esatta funzione di VPS13D e i meccanismi patogenetici sottostanti SCAR4 restano però ancora poco chiari. Per approfondire questi aspetti, stiamo adottando due approcci complementari. Abbiamo dapprima generato una linea cellulare di HEK298T con riduzione cronica dei livelli di VPS13D, attraverso l'uso di un shRNA specifico. Questo approccio ci permette di valutare la risposta cellulare a una riduzione prolungata della proteina, identificando eventuali fenomeni compensatori. Inoltre, abbiamo generato una seconda linea cellulare di HEK293T in cui VPS13D è stata modificata con un tag, detto degron, che ci permette di ottenere una diminuzione dei livelli di VPS13D in modo controllato, inducibile e reversibile. Grazie a questo modello stiamo analizzando gli effetti immediati e diretti della riduzione di VPS13D al fine di definirne le funzioni e il ruolo nella patogenesi di SCAR4. In particolare, ci stiamo concentrando sullo studio della morfologia e della salute mitocondriale attraverso l'analisi del potenziale di membrana mitocondriale e il tasso di consumo di ossigeno. L'integrazione di questi due approcci complementari sta migliorando considerevolmente la nostra comprensione dei fenomeni patogenetici alla base della malattia SCAR4, definendo il ruolo di VPS13D nella biologia mitocondriale.

120

Genetic neurological disorder/Hereditary Spastic Paraplegias

Hereditary spastic paraplegia

DEVELOPMENT OF SPASTIN RECOVERY THERAPEUTIC APPROACHES IN SPG4-HSP PRE-CLINICAL MODELS

Rinaldo Cinzia[1], F. Sardina[1], C. Carsetti[1], G. Fattorini[1], G. Cestra[1]

[1]Roma, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GMR23T2157; Rinaldo Cinzia

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a neurodegenerative disease characterised by the progressive spasticity of the lower limbs. The most prevalent form of HSP is due to heterozygous mutations in the SPG4 gene, which encodes spastin. The pathogenic variants associated with SPG4-HSP are predominantly truncating mutations, which result in a reduction in spastin levels. At present, there is no cure available for this disease, but strategies to induce a recovery of spastin levels are emerging as potential therapeutic approaches. Recently, we demonstrate that spastin poly-ubiquitination/degradation is mediated by the cullin4a-Ring-Ligase (CRL4a) complex. Moreover, our findings indicate that is feasible to induce spastin recovery and rescue HSP-related abnormalities by targeting spastin degradation pathway. It is worth noting that we have identified and validated spastin-elevating drugs in Drosophila haploinsufficient models and in patient-derived non-neuronal cells harbouring nonsense truncating mutations. We are now assessing the efficacy of spastin-elevating drugs in preclinical models by employing a cohort of patient-derived cells carrying a broad spectrum of truncating and missense SPG4 mutations. In parallel, we are looking for highly selective spastin-elevating approaches with the aim of identifying the factor that recruits spastin to CRL4a. Ultimately, we intend to utilise drug repurposing strategies to impede this recruitment and assess their therapeutic potential in patient-derived cells and in vivo.

Malattie genetiche neurologiche/Paraplegie spastiche ereditarie

Paraplegia spastica ereditaria; HSP; SPG; Paraparesi spastica ereditaria; Paraplegia spastica familiare; Malattia di Strümpell-Lorraine

SVILUPPO DI APPROCCI TERAPEUTICI PER IL RECUPERO DELLA SPASTINA IN MODELLI PRECLINICI DI SPG4-HSP

La paraplegia spastica ereditaria (HSP) è una malattia neurodegenerativa. Mutazioni eterozigoti con perdita di funzione del gene SPG4, codificante spastina, sono la causa più comune di HSP. Le mutazioni patogeniche di SPG4 sono principalmente troncanti e portano a una riduzione del dosaggio di spastina. Attualmente non esiste una cura, ma le strategie per indurre un recupero dei livelli di spastina stanno emergendo come possibili approcci terapeutici. Recentemente, abbiamo dimostrato che la poli-ubiquitinazione della spastina è mediata dal complesso cullin4a-Ring-Ligase (CRL4a). In particolare, abbiamo dimostrato che è possibile indurre un recupero dei livelli proteici di spastina e un miglioramento di fenotipi patologici agendo a diversi livelli di questa via regolativa. Abbiamo identificato farmaci che inducono un recupero dei livelli di spastina e li abbiamo validati in vivo in modelli aploinsufficienti di Drosophila e in cellule non neuronali derivate da pazienti portatori di mutazioni troncanti non-senso. Stiamo continuando gli studi sull'efficacia di questi farmaci in cellule derivate da pazienti portatori di un ampio spettro di mutazioni SPG4 troncanti e missenso. Parallelamente, miriamo a sviluppare approcci ancor più mirati per ripristinare i livelli spastina, identificando i fattori che reclutano la reclutano al complesso CRL4a, con l'obiettivo finale di utilizzare strategie di riposizionamento dei farmaci per bloccare questo reclutamento e valutare il loro potenziale terapeutico in modelli preclinici in vitro e in vivo.

121

Genetic neurological disorder/Hereditary Spastic Paraplegias

Hereditary spastic paraplegia

EYE MOVEMENTS AND OPTIC NERVE MARKERS IN SPASTIC PARAPLEGIA 7 (SPG7)

Bargagli Alessia[1], D. Lopergolo[1], G. Rieti[1], A. Rufa[1]

[1]Siena, Università Di Siena

Project: GSA22M002; Rufa Alessandra

Mutations in Spastic Paraplegia 7 (SPG7, OMIM# 607259) have first been associated with a rare autosomal recessive form of hereditary spastic paraparesis (HSP). However, in the past years both dominant and recessive SPG7 mutations have been increasingly recognized and associated with cerebellar involvement, optic neuropathy, progressive external ophthalmoplegia with ptosis, and supranuclear palsy. In literature, a few reports of childhood-onset optic nerve atrophy in SPG7 with progressive visual loss, preceding other SPG7 manifestations by many years. Furthermore, changes in saccadic eye movement dynamics due to cerebellar dysfunctions, easily assessed by eye tracking, may occur at any time in these patients. The aim of the study is the identification of ocular biomarkers as new indicators to predict ataxia progression at early stages of SPG7. Eight healty controls and six SPG7 patients, were recruited at the "UOC Neurologia e Malattie Neurometaboliche" of AOUS Senese and "IRCCS Stella Maris". All the patients underwent a complete neurological evaluation, a record of horizontal and vertical ocular movements with an eye tracker and OCT to measure Retinal Nerves Layers (RNFL) thickness and Ganglion Cells Layer (GCL) thickness. From the analysis of horizontal and vertical saccades emerged a statically significative reduction in amplitude and velocity in SPG7 patients and a significative increased duration than CNTRL subjects. The pattern of saccadic eye movements is characterized by a two-step saccade, suggesting an involvement of the cerebellar hemispheres. The OCT showed a significative reduction of GCL thickness in the inferior quadrant compared to healthy subjects.

Malattie genetiche neurologiche/Paraplegie spastiche ereditarie

Paraplegia spastica ereditaria; HSP; SPG; Paraparesi spastica ereditaria; Paraplegia spastica familiare; Malattia di Strümpell-Lorraine

STUDIO DEI MOVIMENTI OCULARI E DEL NERVO OTTICO NELLA PARAPARESI SPASTICA 7 (SPG7)

Le mutazioni nella paraplegia spastica 7 (SPG7, OMIM# 607259) sono state inizialmente associate a una rara forma autosomica recessiva di paraparesi spastica ereditaria. Tuttavia, negli ultimi anni sono state sempre più riconosciute mutazioni SPG7 sia dominanti che recessive, associate a coinvolgimento cerebellare, neuropatia ottica, oftalmoplegia esterna progressiva con ptosi e paralisi sopranucleare. In letteratura, sono stati riportati alcuni casi di atrofia del nervo ottico in età infantile in SPG7 con perdita progressiva della vista, che precede di molti anni le altre manifestazioni di SPG7. Inoltre,

le alterazioni della dinamica dei movimenti oculari saccadici dovute a disfunzioni cerebellari, facilmente valutabili mediante eye tracking, possono verificarsi in qualsiasi fase della malattia. Lo scopo dello studio è l'identificazione di biomarcatori oculari come nuovi indicatori per prevedere la progressione della sintomatologia atassica nelle fasi iniziali della SPG7. Presso l'UOC Neurologia e Malattie Neurometaboliche dell'AOUS Senese e l'IRCCS Stella Maris sono stati reclutati otto controlli sani e sei pazienti SPG7. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a una valutazione neurologica completa, alla registrazione dei movimenti oculari orizzontali e verticali con un eye tracker e all'esame OCT per misurare lo spessore degli strati nervosi retinici (RNFL) e lo spessore delle cellule ganglionari (GCL). Dall'analisi delle saccadi orizzontali e verticali è emersa una riduzione staticamente significativa dell'ampiezza e della velocità nei pazienti SPG7 e una durata significativamente maggiore rispetto ai controlli. Il modello dei movimenti oculari saccadici è caratterizzato da una saccade a due step, che suggerisce un coinvolgimento degli emisferi cerebellari. L'OCT ha mostrato una riduzione significativa dello spessore della GCL nel quadrante inferiore rispetto ai soggetti sani.

122

Genetic neurological disorder/Hereditary Spastic Paraplegias

Hereditary spastic paraplegia

HPDL IS CRITICAL IN HUMAN CORTICAL DEVELOPMENT VIA REGULATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONAL PROPERTIES

Baggiani Matteo[1], M. A. Desbats[2], V. Naef[1], M. Giacich[1], D. Galatolo[1],S. Mero[1], S. Zampieri[2], V. Cappello[3], A. Valentino[2], L. Salviati[2], F. M. Santorelli[4], D. Damiani[4]

[1]Calambrone (Pisa), Fondazione IRCCS Stella Maris
[2]Padova, Università Di Padova
[3]Pontedera, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)
[4]Calambrone (Pisa), Fondazione IRCCS Stella Maris

Project: GJC21131; Santorelli Filippo Maria, Salviati Leonardo

Human brain development relies on finely regulated mechanisms, leading to neurological or neurodevelopmental disorders in case of disruption. Among these processes, mitochondrial function is emerging as a key player in neurodevelopment, yet its involvement remains unclear. Here, we investigate the role of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-like (HPDL) in cortical development and mitochondrial activity, given its association with SPG83, a form of hereditary spastic paraplegia. Using mutant neuroblastoma cells, we showed that HPDL is essential for mitochondrial supercomplex assembly and redox balance. Transcriptomic analyses revealed dysregulated neurogenesis-related pathways, suggesting an early role in cortical development. We generated cortical neurons and organoids from SPG83 patient-derived iPSCs, finding premature neurogenesis, progenitor depletion, impaired proliferation, and apoptosis. Patient-derived organoids exhibited growth defects, resembling microcephaly, a condition see in severe cases of human SPG83 pathology. Mitochondrial analyses confirmed OxPhos dysfunction, increased ROS production, and unexpected hyperpolarization of the mitochondrial membrane, linked to reverse activity of ATP synthase complex. Additionally, HPDL neural progenitors displayed altered cristae morphology, reduced mitochondrial complex activities, and excessive ROS levels. Treatment with glutathione methyl-ester and MitoTEMPO partially rescued premature neurogenesis, suggesting a therapeutic avenue. Our findings highlight critical role for HPDL in neurodevelopment and mitochondrial function, offering mechanistic insights into SPG83 and potential strategies targeting oxidative stress. Further research is needed to explore late-stage cortical development and variant-specific effects.

Malattie genetiche neurologiche/Paraplegie spastiche ereditarie

Paraplegia spastica ereditaria; HSP; SPG; Paraparesi spastica ereditaria; Paraplegia spastica familiare; Malattia di Strümpell-Lorraine;

IL RUOLO FONDAMENTALE DI HPDL NELLO SVILUPPO DELLA CORTECCIA UMANA ATTRAVERSO LA REGOLAZIONE DELLE PROPRIETÀ FUNZIONALI DEI MITOCONDRI

Lo sviluppo del cervello umano è un processo molto complesso e regolato con precisione, per cui, quando questi meccanismi vengono alterati, possono insorgere disturbi neurologici. Tra i vari fattori coinvolti, i mitocondri giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo del sistema nervoso, anche se non è ancora del tutto chiaro come. In questo studio, abbiamo analizzato la proteina HPDL, ed il suo possibile coinvolgimento nello sviluppo della corteccia cerebrale e nel funzionamento dei mitocondri. Mutazioni nel gene HPDL sono associate alla SPG83, una forma ereditaria di paraplegia spastica caratterizzata da problemi nei movimenti ed anomalie corticali. Studiando cellule con mutazioni su HPDL, abbiamo scoperto che HPDL è essenziale per mantenere l'equilibrio energetico e strutturale dei mitocondri. Abbiamo generato quindi neuroni e organoidi corticali a partire da cellule staminali generate da pazienti affetti da SPG83. Da questi, abbiamo osservato che le staminali neurali mutate mostrano una maturazione precoce, con una riduzione delle cellule progenitrici ed un'alterazioni nei vari tipi di cellule corticali, mentre gli organoidi corticali mutanti hanno dimensioni ridotte, una somiglianza che si ritrova nei casi più gravi di SPG83 affetti anche da microcefalia. Inoltre, i mitocondri risultano meno efficienti nel produrre energia, con un aumento dello stress ossidativo. Da questo, abbiamo deciso di testare due composti antiossidanti, il glutatione metil-estere ed il MitoTEMPO, che hanno parzialmente corretto i difetti di sviluppo neuronale, suggerendo possibili strategie terapeutiche. In sintesi, il nostro studio evidenzia l'importanza di HPDL nella crescita del cervello e nel funzionamento dei mitocondri, offrendo nuove informazioni sulla patologia SPG83 e sulle potenziali terapie basate sulla riduzione dello stress ossidativo. Ulteriori ricerche saranno necessarie per comprendere meglio le fasi avanzate dello sviluppo corticale e l'effetto delle diverse mutazioni.

123

Genetic neurological disorder/Hereditary Spastic Paraplegias

Hereditary spastic paraplegia

THE MITOCHONDRIAL PORE IN HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA SPG7: DRUG REPURPOSING FOR THERAPEUTIC INTERVENTION

Casari Giorgio Nevio[1], "K. Paulikova[1], A., Sorgente[1], E. Franchini[1], I. Marafelli[1], M. Bulloni[2], M. Valassi[2], M. Giacomello[3], G. Covello[3], L. Pattini[2], G. Casari[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele
[2]Milan, Politecnico Di Milano
[3]Padova, Università Di Padova

Project: GMR22T2019; Casari Giorgio Nevio

Hereditary spastic paraplegias (HSPs) are a group of neurodegenerative disorders characterized by progressive weakness and spasticity of the lower limbs. These conditions exhibit considerable genetic heterogeneity, with over 80 loci or genes identified to date, underpinning common pathological themes associated with neurodegeneration of the corticomotor spinal tract, still calling for specific treatments. We focus on SPG7, a prevalent recessive form of HSP caused by mutations in paraplegin, a protein crucial for mitochondrial protein quality control, whose impairment leads to altered permeability of the inner mitochondrial membrane due to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). The mPTP can function in either a high- or low-conductance mode. Prolonged high-conductance opening constitutes a major mitochondria-associated cell-destructive pathway, ultimately leading to cell necrosis. Conversely, intermittent, rapid opening and closing of the pore -a process known as flickering- is essential for mitochondrial homeostasis, as it finely regulates intra-matrix concentrations of Ca^{2+} and reactive oxygen species through transient membrane depolarizations. A functional link between paraplegin and mPTP opening has been established, and we have demonstrated that impairment of flickering, secondary to SPG7 gene mutations, is a causative event in neurodegeneration. Using a biological assay to quantify mitochondrial flickering events, we screened over 2,000 FDA/EMA-approved drugs to identify compounds that enhance mPTP opening, thereby restoring its physiological opening and closing dynamics in SPG7 cells. This high-content screening identified several drugs that positively regulate pore activity. The next phase of the project focuses on selecting the most promising small-molecule candidates for in vivo administration in a mouse model, aiming to evaluate their efficacy as potential treatments for SPG7, particularly in mitigating motor dysfunction."

Malattie genetiche neurologiche/Paraplegie spastiche ereditarie

Paraplegia spastica ereditaria; HSP; SPG; Paraparesi spastica ereditaria; Paraplegia spastica familiare; Malattia di Strümpell-Lorraine;

IL PORO MITOCONDRIALE NELLA PARAPLEGIA SPASTICA EREDITARIA SPG7: NUOVE OPPORTUNITÀ TERAPEUTICHE ATTRAVERSO IL RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI

Una progressiva spasticità degli arti inferiori causata da neurodegenerazione dei neuron motori rappresenta il sintomo piu' comune delle numerose forme di paraplegie spastiche ereditarie (HSP). Lo studio verte su SPG7, una forma recessiva prevalente di HSP causata da mutazioni di paraplegina, una proteina cruciale per il controllo della qualità delle proteine mitocondriali, la cui mutazione porta ad alterata permeabilità della membrana mitocondriale interna a causa dell'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP). Il mPTP può operare in modalità ad alta o bassa conduttanza. L'apertura prolungata ad alta conduttanza rappresenta un importante meccanismo di distruzione cellulare associato ai mitocondri, portando infine alla necrosi cellulare. Al contrario, l'apertura e la chiusura intermittente e rapida del poro—un processo noto come flickering—è essenziale per l'omeostasi mitocondriale, poiché regola finemente le concentrazioni intramatriciali di Ca^{2+} e specie reattive dell'ossigeno attraverso depolarizzazioni transitorie della membrana. Abbiamo dimostrato un'associazione funzionale tra paraplegina e mPTP, evidenziando una riduzione di flickering nei pazienti SPG7. Utilizzando un saggio biologico per quantificare gli eventi di flickering mitocondriale, abbiamo esaminato oltre 2.000 farmaci approvati da FDA/EMA per identificare composti capaci di favorire l'apertura del mPTP, ripristinandone così la dinamica fisiologica di apertura e chiusura nelle cellule SPG7. Lo screening ha identificato diversi farmaci che regolano positivamente l'attività del poro. La prossima fase del progetto si concentra sulla selezione delle molecole candidate più promettenti per la somministrazione in vivo nel modello murino SPG7, con l'obiettivo di valutarne l'efficacia come potenziali trattamenti farmacologici per SPG7.

124

Genetic neurological disorder/Hereditary Spastic Paraplegias

Hereditary spastic paraplegia

STOP-HSP.NET: STORING A COLLECTION OF PATIENTS WITH HSP – NETWORK

SANTORELLI FILIPPO M[1]
"
[1]*Pisa, Fondazione Stella Maris - IRCCS*

Project: GSP23001; Santorelli Filippo Maria, Martinuzzi Andrea, Musumeci Olimpia, Rizzo Giovanni, Rossi Elisa, Silvestri Gabriella

Specific aims: Hereditary Spastic Paraplegias (HSP)s are rare axonopathies with high clinical and genetic heterogeneity, low prevalence and slow progression. These features are major drawbacks in designing clinical trials. The STOP-HSP.net initiative will facilitate trial-readiness for several HSPs by creating a solid, harmonized disease registry including >500 HSP patients. A federated repository of biological samples will be also established for future research purposes. Background: Despite the extreme heterogeneity of HSPs, a relatively limited set of pathological mechanisms explain the vast majority of them, and consequently, potential therapeutic bullets designed for few can hopefully serve many forms. Yet, their efficacy might be clearly established only if we have a large, well-characterized population of harmonized HSP patients. Methods: HSP patients will be initially enrolled in five third-level neurological centers. One partner will host the centralized registry on a GDPR-complaint high-performance computer. Clinical and diagnostic data will be collected longitudinally. The collaboration with Fondazione Telethon and the patients' association AiVIPS will be instrumental to reach our goals. Conclusions: The STOP-HSP.net registry will provide an easily accessible, web-based, multicenter infrastructure platform, and will favor easy interplay with other international groups involved in HSP research. In-depth characterization of patients and high-quality longitudinal data will allow to define sensitive outcome tools for future trial design.

Malattie genetiche neurologiche/Paraplegie spastiche ereditarie

Paraplegia spastica ereditaria; HSP; SPG; Paraparesi spastica ereditaria; Paraplegia spastica familiare; Malattia di Strümpell-Lorraine

STOP-HSP.NET:IL REGISTRO TELETHON DELLE PARAPARESI SPASTICHE EREDITARIE

Obiettivi specifici: Le paraplegie spastiche ereditarie (HSP) sono rare assonopatie con un'elevata eterogeneità clinica e genetica, una bassa prevalenza e una lenta progressione. Queste caratteristiche sono i principali svantaggi nella progettazione di studi clinici. L'iniziativa STOP-HSP.net faciliterà la preparazione alla sperimentazione per diverse HSP creando un registro di malattia solido e armonizzato che comprenda >500 pazienti HSP. Verrà inoltre creato un archivio federato di campioni biologici per futuri scopi di ricerca. Background: Nonostante l'estrema eterogeneità delle HSP, un

insieme relativamente limitato di meccanismi patologici spiega la stragrande maggioranza di esse e, di conseguenza, i potenziali proiettili terapeutici progettati per poche forme possono auspicabilmente servire a molte forme. Tuttavia, la loro efficacia potrebbe essere chiaramente stabilita solo se disponessimo di una popolazione ampia e ben caratterizzata di pazienti HSP armonizzati. Metodi: i pazienti HSP saranno inizialmente arruolati in cinque centri neurologici di terzo livello. Un partner ospiterà il registro centralizzato su un computer ad alte prestazioni conforme al GDPR. I dati clinici e diagnostici saranno raccolti longitudinalmente. La collaborazione con Fondazione Telethon e l'associazione di pazienti AiVIPS sarà fondamentale per raggiungere i nostri obiettivi. Conclusioni: Il registro STOP-HSP.net fornirà una piattaforma infrastrutturale multicentrica facilmente accessibile, basata sul web, e favorirà una facile interazione con altri gruppi internazionali coinvolti nella ricerca sulla HSP. La caratterizzazione approfondita dei pazienti e i dati longitudinali di alta qualità consentiranno di definire strumenti di outcome sensibili per la progettazione di studi futuri.

125

Genetic neurological disorder/Polyneuropathies

Charcot-Marie-Tooth disease, autosomal dominant

PHARMACOLOGIC ACTIVATION OF THE ATF6 BRANCH OF THE UPR FOR THERAPEUTIC INTERVENTION IN CMT1B NEUROPATHY

F. Gentile[1], F.A. Veneri[1], N. Sorigati[1], L. Morelli[1]., C. Ferri[1], S. Valenzano[1], U. Del Carro[1], M. D'Antonio[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GMR22T2020; D'Antonio Maurizio

Background - Charcot-Marie-Tooth type 1B is a hereditary neuropathy caused by mutations in myelin protein zero (MPZ/P0). Many of these mutations trigger a canonical unfolded protein response (UPR). Here, we explore the effects of the modulation of the ATF6 pathway of the UPR in CMT1B. Materials & Methods - the ATF6 gene was systemically ablated in mice models of CMT1B (ATF6KO/P0S63del). Locomotor, neurophysiology and morphologic studies were performed, as well as transcriptomics in sciatic nerves. Pharmacologic modulation of ATF6 through AA147, known as a selective ATF6 activator, was preliminary assessed in explants of dorsal root ganglia (DRG) and in vivo in CMT1B mice using a dose-escalation protocol (2, 4, and 8 mg/kg i.p.). Results - We observed a worsening of disease phenotype in ATF6KO/P0S63del mice, with reduced motor capacity and neurophysiology and thinner myelin observed in morphology. RNAseq analysis indicated that ablation of ATF6 leads to a strong dysregulation of the transcriptional landscape, mainly affecting protein folding and degradation pathways, as well as oxidative stress response and neuroinflammation. In P0S63del DRG cultures, AA147 increased myelination. In mice, a single i.p. injection of AA147 induced an increase in BiP expression at 8 mg/kg in WT mice 24 hours post-injection, accompanied by an increase also of XBP1 and CHOP gene expression. Interestingly, UPR genes tested showed a dose-dependent reduction in P0S63del mice after 24 hours. Instead, no significant difference in BiP expression was observed at 72 hours post-injection between placebo- and AA147- treated mice. Conclusions - Genetic and/or pharmacologic modulation of the ATF6-related pathways of the UPR may affect neuropathy severity and progression. The drug AA147 seems to exert a short-lasting but significant pharmacological activity. A short-term trial of AA147 will be performed to see if chronic administration may show disease-modifying effects"

Disordini genetici neurologici/Polineuropatie

Malattia di Charcot-Marie-Tooth autosomica dominante;

ATTIVAZIONE FARMACOLOGICA DEL RAMO DI ATF6 DELLA UPR COME INTERVENTO TERAPEUTICO NELLA NEUROPATIA DI CHARCOT-MARIE-TOOTH DI TIPO 1B

Backgroun - La Charcot-Marie-Tooth di tipo 1B è una neuropatia ereditaria causata da mutazioni nella proteina zero della mielina (MPZ/P0). Molte di queste mutazioni attivano una risposta canonica alle proteine non ripiegate (UPR). In questo progetto esploriamo gli effetti della modulazione della via ATF6 della UPR nella CMT1B. Materiali e Metodi - Il gene ATF6 è stato eliminato in modelli murini di CMT1B (ATF6KO/P0S63del). Sono stati effettuati studi di locomozione, neurofisiologia e morfologia, oltre a trascrittomica su nervi sciatici. La modulazione farmacologica di ATF6 tramite AA147, attivatore selettivo di ATF6, è stata preliminarmente valutata in esplanti di gangli delle radici dorsali (DRG) e in vivo in topi CMT1B a diversi dosaggi (2, 4 e 8 mg/kg i.p.). Risultati - Abbiamo osservato un peggioramento della malattia nei topi ATF6KO/P0S63del, con ridotta capacità motoria e neurofisiologia e mielina più sottile. L'analisi RNAseq ha indicato che l'ablazione di ATF6 porta a una forte disregolazione trascrizionale, che colpisce principalmente le vie di ripiegamento e degradazione delle proteine, nonché la risposta allo stress ossidativo e la neuroinfiammazione. Nelle culture di DRG P0S63del, AA147 ha aumentato la mielinizzazione. Nei topi, un'unica iniezione i.p. di AA147 ha indotto un aumento dell'espressione di BiP a 8 mg/kg nei topi WT 24 ore dopo l'iniezione, accompagnato anche da un aumento dell'espressione di XBP1 e CHOP. I geni UPR testati hanno invece mostrato una riduzione nei topi P0S63del dopo 24 ore. Tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza significativa nell'espressione di BiP a 72 ore dopo l'iniezione. Conclusioni - La modulazione di ATF6 può influenzare la gravità e la progressione della patologia. Il farmaco AA147 sembra esercitare un'attività farmacologica significativa ma di breve durata. Sarà effettuato uno studio a breve termine con AA147 per testare se l'amministrazione cronica possa mostrare effetti modificanti sulla malattia.

126

Genetic neurological disorder/Polyneuropathies

Charcot-Marie-Tooth disease, autosomal dominant

BOOSTING HSPB3 TO PREVENT NEUROMUSCULAR DEGENERATION IN PERIPHERAL NEUROPATHIES

S. Crotti[1], S. Carra[1], V. Secco[1], F. Antoniani[1], M. Mochi[2], B. Silvestri[2], M. Medici[2], M. Ferrara[1], L. Mediani[1], J. Vinet[1], A. Rosa[2]

[1]Modena, Università Di Modena E Reggio Emilia
[2]Roma, Università Di Roma La Sapienza

Project: GMR22T1003; Carra Serena

The small heat shock protein HSPB3 is upregulated in skeletal muscle cells (SkMCs) during differentiation. HSPB3 is also found

in motor neurons (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.

Neuromuscular junction (NMJ) pathology is an early event that precedes and contributes to MN loss in CMT; in addition, active denervation/reinnervation and repeated rounds of nerve degeneration/regeneration were reported in CMT2. However, the regenerative abilities of peripheral nerves and muscles decline with aging, when CMT develops. Of note, muscle and neuronal cell differentiation occurs during adulthood to enable the repair and regeneration of damaged NMJs and muscles. These data highlight the importance of identifying players that boost SkMC and MN differentiation, p

Disordini genetici neurologici/Polineuropatie

Malattia di Charcot-Marie-Tooth autosomica dominante;

IDENTIFICARE LE FUNZIONI DI HSPB3 PER PREVENIRE LA DEGENERAZIONE NEUROMUSCOLARE NELLE NEUROPATIE PERIFERICHE

La piccola proteina da shock termico HSPB3 è upregolata nelle cellule muscolari scheletriche (SkMC) durante la differenziazione. HSPB3 si trova anche nei motoneuroni (MN), ma le sue funzioni fisiologiche in SkMC e MN sono in gran parte sconosciute. Quattro mutazioni nel gene HSPB3 sono state associate a malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2 (CMT2) e miopatia congenita con segni di neuropatia, rinforzando l'idea che HSPB3 svolge funzioni importanti per la vitalità di SkMC e MN.

La degenerazione della giunzione neuromuscolare (NMJ) è un evento precoce che precede e contribuisce alla perdita di MN nella CMT, che è caratterizzata da ripetuti cicli di denervazione/reinnervazione dei nervi. Tuttavia, le capacità rigenerative dei nervi e dei muscoli periferici diminuiscono con l'invecchiamento, quando si sviluppa la CMT. E' importante sottolineare che la differenziazione delle cellule muscolari e neuronali avviene durante l'età adulta per consentire la riparazione e la rigenerazione delle NMJ e dei muscoli dan

127

Genetic neurological disorder/Polyneuropathies

Charcot-Marie-Tooth disease, autosomal recessive

TREATING CMT2A: MFN1 GENE ENHANCEMENT AS A THERAPEUTIC STRATEGY

Corti Stefania[1], M. D'Agostino[1], L. Quetti[1], L. Sali[1], F. Rizzo[1], L. Ottoboni[1], G. Comi[1]

[1] Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico

Project: GMR23T2153; Corti Stefania

Charcot-Marie-Tooth disease type 2A (CMT2A), a severely debilitating peripheral neuropathy, results from dominant loss-of-function mutations in the Mitofusin 2 (MFN2) gene and currently lacks an effective cure. Mitofusins play critical roles in various tissues. However, MFN2 mutations disproportionately impact the nervous system, likely due to neurons inherently having lower levels of MFN1 (Baloh, 2008, Detmer & Chan, 2007, Misko et al., 2012). Thus, neurons are more susceptible to disruption by mutant MFN2. MFN1 overexpression can compensate for the loss of MFN2 in vitro and in the recent transgenic mouse model (Thy1.2-MFN2R94Q) when expressed as a transgene (Detmer & Chan, 2007, Zhou et al., 2019). Similar preliminary data obtained by our group by overexpressing MFN1 in Thy1.2-MFN2R94Q mice via AAV9 seem to confirm that increased MFN1 levels in the nervous system can effectively ameliorate CMT2A symptoms. Furthermore, MFN2 dysfunction does not appear to be the main driver of MFN2 mutant toxicity in CMT2A, and MFN1 could correct the phenotype without side effects. These data highlight the potential of enhancing MFN1 as a viable therapeutic strategy to compensate for MFN2 defects. AIM 1: We will study how MFN1 overexpression, driven by a lentivirus vector encoding MFN1, influences the disease phenotype in human CMT2A motor neurons. AIM 2: We will compare the established AAV9 vector to the emerging 'capsid-engineered' AAV. CAP-B10 vector, assessing their molecular efficacy and safety in delivering MFN1 via cerebrospinal fluid administration to neonatal CMT2A (Thy1.2-MFN2R94Q) mice. AIM 3: Using the selected AAV vector from AIM 2, we will investigate the influence of MFN1 on the phenotype and neuropathology of CMT2A mice. Anticipated Output. Our research is a comprehensive exploration of the therapeutic potential of MFN1 gene therapy for CMT2A.

Disordini genetici neurologici/Polineuropatie

Malattia di Charcot-Marie-Tooth autosomica recessiva; RI-CMT;

MODULAZIONE DEL GENE MFN1 COME STRATEGIA TERAPEUTICA PER LA CMT2A

La malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT2A), una neuropatia periferica disabilitante ad oggi priva di cure risolutive, è dovuta a mutazioni dominanti con perdita di funzione a carico del gene Mitofusina 2 (MFN2). Le Mitofusine rivestono un ruolo cruciale in molti tessuti, tuttavia, le mutazioni del gene MFN2 hanno un impatto maggiore nel sistema nervoso, probabilmente a causa del fatto che i neuroni esprimono livelli più bassi di MFN1 e di conseguenza sono più suscettibili alle mutazioni di MFN2. L'overespressione di MFN1 riesce a compensare la perdita di MFN2 sia in vitro sia nel modello murino (Thy1.2- MFN2R94Q) (Detmer & Chan, 2007, Zhou et al., 2019) quando espresso come transgene. Dati preliminari ottenuti dal nostro gruppo overesprimendo MFN1 utilizzando un vettore AAV9 confermano che l'aumento dei livelli di MFN1 nel sistema nervoso può effettivamente migliorare i sintomi della patologia. Inoltre, la disfunzione di MFN2 non sembra essere il principale responsabile della tossicità dovuta alla presenza di MFN2 mutata nella CMT2A e MFN1 potrebbe correggere il fenotipo senza effetti collaterali. Questi dati suggeriscono l'aumento di MFN1 come potenziale strategia terapeutica in grado di compensare i difetti di MFN2. Obiettivo 1: Studieremo se l'overespressione di MFN1 tramite vettore lentivirale sia in grado di modificare il fenotipo patologico nei motoneuroni CMT2A. Obiettivo 2: Compareremo l'efficacia molecolare e la sicurezza dei "classici" vettori AAV9 con i più "moderni" AAV.CAP-B10 nel veicolare il gene MFN1 attraverso il liquido cerebrospinale nel modello animale CMT2A in età neonatale (Thy1.2-MFN2R94Q). Obiettivo 3: Investigheremo l'effetto dell'overespressione di MFN1, veicolata mediante il vettore selezionato nell'obiettivo 2, sul fenotipo patologico nel modello animale di CMT2A. Risultati attesi. Il nostro studio rappresenta una valutazione del potenziale terapeutico di un approccio di terapia genica basato sulla modulazione di MFN1 per la CMT2A.

128

Genetic neurological disorder/Polyneuropathies

Charcot-Marie-Tooth disease, autosomal recessive

Pharmacological modulation of myelin synthesis and cytoskeletal remodeling as a therapeutic strategy for CMT4B neuropathies with aberrant myelin

Bolino Alessandra[1], S. Cipriani[1], F. Maspes[1], A. Bolino[1]

[1]MIlano, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GGP20063; Bolino Alessandra

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease type 4B1 and B2 (CMT4B1 and CMT4B2) represent severe autosomal recessive demyelinating neuropathies with early onset and myelin outfoldings in the nerve, a form of aberrant hypermyelination, that degenerate causing axonal loss and functional impairment. CMT4B1 and B2 are caused by loss-of-function mutations in the MTMR2 and MTMR13 genes, respectively, which encode catalytically active (MTMR2) and inactive (MTMR13) proteins belonging to the Myotubularin-related protein family. MTMR2 dephosphorylates phosphoinositide phospholipids, important messengers in the cells that govern a variety of functions such as membrane trafficking. Interestingly, MTMR2 and MTMR13 interact and, at least in vitro, this interaction is thought to potentiate catalytic activity of MTMR2 and control recruitment at subcellular membranes. Using several in vitro and in vivo models of CMT4B1 (MTMR2 loss), we provided evidence that MTMR2 loss leads to increased PtdIns(3,5)P2 phosphoinositide levels. Interestingly, we recently proposed a novel mechanism by which the Ras-related GTPase Rab35 complexes with MTMR13 and likely with MTMR2 to negatively regulate PtdIns(3,5) P2 in Schwann cells. We also found that in both Rab35 and Mtmr2 KO mutants, elevated PtdIns(3,5)P2 enhances mTORC1-dependent myelin synthesis and RhoA/myosin II-dependent cytoskeletal dynamics resulting in aberrant myelin membrane expansion. Our data reveal a crucial role for MTMR2-regulated lipid turnover to titrate mTORC1 and RhoA signaling and to control myelin growth. In this project, we aim at interfering with these pathways using Rapamycin (mTORC1 inhibitor) and Fasudil (ROCK inhibitor) to ameliorate demyelinating neuropathies with aberrant myelin.

Disordini genetici neurologici/Polineuropatie

Malattia di Charcot-Marie-Tooth autosomica recessiva; RI-CMT;

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 agisce su un particolare tipo di fosfolipidi, i fosfoinositidi, che sono degli 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 in fase III, che mirano a ripristinare questi meccanismi alterati nelle cellule di Schwann CMT4B1. Useremo sia modelli della neuropatia di CMT4B1 che di CMT4B2.

129

Genetic neurological disorder/Polyneuropathies

Charcot-Marie-Tooth disease type 1X (CMT1X)

A NOVEL MOUSE MODEL FOR THE X-LINKED FORM OF CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE REVEALS INSIGHTS INTO PATHOGENESIS AND DISEASE PROGRESSION.

Bayraktar Erva[1], R. Ciaran Prior[2], T. Burg[2], R. Balada[1], A. Georgia Dumitras[1], B. Rijtano[1], A. Silva[2], M. Ascolani[3], F. Scavizzi[3], M. Raspa[3], S. Marinelli[3], C. Colussi[4], F. Mammano[1], B. Blaauw[1] L. Van den Bosch[2], M. Bortolozzi[1]

[1]Padua, Italy, Italy, 1 Veneto Institute of Molecular Medicine (VIMM), Padua, Italy. 2 Department of Physics and Astronomy, University of Padua, Padua, Italy.
[2]Leuven, Belgium., VIB-KU Leuven - Center for Brain & Disease Research, Leuven, Belgium.
[3] Monterotondo, Italy., European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Monterotondo, Italy.
[4]Rome, Italy., European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Monterotondo, Italy.

Project: GMR24T1174; Bortolozzi Mario

Charcot-Marie-Tooth disease type 1X (CMT1X) is an incurable inherited peripheral neuropathy caused by mutations in the GJB1 gene, which encodes the protein connexin 32 (Cx32). Here, we describe a novel CMT1X mouse model carrying the R220X mutation of Cx32, developed using CRISPR/Cas9 technique. Mutant mice exhibited progressive electrophysiological deficits, which became more evident during the second year of life, mirroring CMT1X progression in patients where axonal changes precede demyelination. Morphological analyses in R220X mice revealed significant reductions in myelin thickness and axonal diameter, that did not result in any major motor deficits or behavioural impairments. At 600 days of age, immunohistochemical analysis revealed signs of muscular damage in the tibialis anterior and gastrocnemius muscles. This damage was characterized by significant fragmentation of neuromuscular junctions, an increased number of centrally nucleated fibers (indicative of muscle regeneration), and upregulation of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM). Sciatic nerve evaluations revealed an increase in inflammatory markers and Schwann cell (SC) nuclei, which was accompanied by defects in Cx32 gap junction formation in myelinating SCs, as visualized by confocal microscopy. Functional in vitro characterizations demonstrated impaired ATP release from Cx32 hemichannels in dissociated mutant SCs, as well as in Schwannoma cells expressing Cx32-R220X hemichannels. Interestingly, RT-PCR analyses unveiled an overexpression of Cx32 and purinergic receptors in mutant sciatic

nerves, suggesting a dysregulated paracrine signaling in CMT1X pathogenesis. Overall, our study presents a comprehensive, long-term characterization of a CMT1X mouse model that recapitulates hallmark disease features. Our findings also support a pivotal role of Cx32 hemichannels in disease pathogenesis, thus providing a foundation for targeted therapeutic strategies in CMT1X.

Disordini genetici neurologici/Polineuropatie

Charcot-Marie-Tooth disease type 1X (CMT1X)

UN NUOVO MODELLO MURINO DELLA FORMA X DELLA MALATTIA DI CHARCOT-MARIE-TOOTH SVELA ASPETTI INEDITI NELLA PATOGENESI E PROGRESSIONE DELLA MALATTIA.

La malattia di Charcot-Marie-Tooth tipo 1X (CMT1X) è una neuropatia periferica ereditaria incurabile causata da mutazioni del gene GJB1, codificante la proteina connessina 32 (Cx32). Qui presentiamo un nuovo modello murino di CMT1X recante la mutazione R220X della Cx32, sviluppato con CRISPR/Cas9. I topi mutati evidenziano deficit elettrofisiologici progressivi che si aggravano durante il secondo anno di vita, rispecchiando la progressione della malattia nei pazienti, nei quali i danni assonali precedono la demielinizzazione. Le analisi morfologiche nei topi R220X rivelano una riduzione dello spessore mielinico e del diametro assonale, senza comportar significativi deficit motori o comportamentali. A 600 giorni di età, l'analisi immunoistochimica mostra segni di danno muscolare nel tibiale anteriore e nel gastrocnemio, con significativa frammentazione delle giunzioni neuromuscolari, aumento del numero di fibre con nucleazione centrale e sovraespressione del marcatore NCAM. L'analisi del nervo sciatico indica un aumento dei marcatori infiammatori e dei nuclei delle cellule di Schwann (SC), insieme a difetti nella formazione delle gap junction di Cx32 nelle SC mielinizzate. Test funzionali in vitro hanno misurato un rilascio di ATP ridotto da parte degli emicanali di Cx32 nelle SC dissociate dei topi mutanti, così come in cellule Schwannoma che esprimono emicanali di Cx32-R220X. Inoltre le analisi RT-PCR evidenziano una sovraespressione della Cx32 e dei recettori purinergici nei nervi sciatici mutanti, suggerendo una disregolazione della segnalazione paracrina nella patogenesi della CMT1X. Nel complesso, il nostro studio presenta una caratterizzazione completa e a lungo termine di un modello murino di CMT1X che recapitola le caratteristiche distintive della malattia. I nostri risultati supportano anche un ruolo chiave degli emicanali di Cx32 nella patogenesi della malattia, fornendo così una base per possibili strategie terapeutiche mirate alla cura della CMT1X.

130

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Leigh Syndrome

TRANSABDOMINAL ULTRASOUND GUIDED AAV9-GFP DELIVERY IN FETAL PIGS: A TRANSLATIONAL AND MINIMALLY INVASIVE MODEL FOR IN UTERO FETAL GENE THERAPY

Brunetti Dario[1], A. Di Donfrancesco[2], A. Adelizzi[2], A. Giri[3] R. Duchi[4], S. Boito[3], M. Barandalla[4], G. Massaro[5] C. Santanatoglia[6], E. Cappellozza[6], A. Perota[4], I. Di Meo[2], V. Tiranti[2], E. Bottani[6], C. Galli[4], E. Persico[3]

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Milan, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta
[3]Milan, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico
[4]Cremona, AVANTEA
[5]London, University College London
[6]Verona, Università Di Verona

Project: GMR23T2152; Brunetti Dario

Mutations in the SURF1 gene are a predominant cause of Leigh Syndrome (LS), a fatal mitochondrial encephalopathy characterized by psychomotor regression and lactic acidosis, with an incidence of approximately 1 in 36,000 live births. We recently developed a Surf1-knockout (Surf1KO) pig model that recapitulates several clinical phenotypes observed in LS patients, including reduced birth weight, impaired perinatal growth, bilateral eyelid ptosis, dysphagia, tremors, muscle weakness, downregulation of multiple COX subunit-encoding genes, delayed central nervous system (CNS) development, and elevated perinatal mortality. Our findings suggest that SURF1 deficiency disrupts fetal neuro-muscular development by impairing the metabolic transition from glycolysis to oxidative mitochondrial metabolism in precursor stem cells, thereby hindering normal neurogenesis and myogenesis. These results underscore the critical need for early therapeutic interventions to mitigate or prevent disease progression in LS. In this study, we present a minimally invasive, clinically translatable strategy for in utero gene therapy using an ultrasound-guided delivery of a self-complementary adeno-associated virus serotype 9 vector (scAAV9-CAG-GFP) in fetal pigs. We conducted transabdominal injections at various gestational ages and administered different vector doses to assess biodistribution across multiple organs, including the liver, heart, lungs, skeletal muscle, and CNS. The procedure demonstrated effective transgene delivery without eliciting significant inflammatory responses, toxicity, or adverse effects in critical organs. Our next objective is to apply this method for therapeutic gene delivery to SURF1KO fetuses. These findings provide a strong foundation for the safety and feasibility of in utero gene therapy and suggest its potential as a therapeutic approach for LS and other congenital genetic disorders.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Sindrome di Leigh; Malattia di Leigh; Encefalomielopatia subacuta necrotizzante

INIEZIONE TRANSADDOMINALE ECO-GUIDATA DI AAV9-GFP IN FETI DI SUINO: UN MODELLO TRASLAZIONALE E MINIMAMENTE INVASIVO PER LA TERAPIA GENICA IN UTERO

Le mutazioni nel gene SURF1 sono una delle principali cause della Sindrome di Leigh (LS), un'encefalopatia mitocondriale fatale con regressione psicomotoria e acidosi lattica, che colpisce circa 1 su 36.000 nati vivi. Abbiamo sviluppato un modello suino Surf1-knockout (Surf1KO) che riproduce il fenotipo clinico della LS, come basso peso alla nascita, crescita perinatale compromessa, ptosi palpebrale bilaterale, disfagia, tremori, debolezza muscolare, downregolazione di geni delle subunità COX, ritardo nello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) e alta mortalità perinatale. I nostri dati indicano che la mancanza di SURF1 compromette lo sviluppo neuro-muscolare fetale alterando la transizione metabolica dalla glicolisi al metabolismo ossidativo mitocondriale nelle cellule staminali progenitrici, ostacolando neurogenesi e miogenesi. Questo evidenzia l'importanza di interventi terapeutici precoci per prevenire o rallentare la progressione della LS. Abbiamo sviluppato una strategia minimamente invasiva e traslabile per la terapia genica in utero, basata sull'iniezione eco-guidata di un vettore virale adeno-associato di sierotipo 9 (scAAV9-CAG-GFP) nei feti di suino. Sono state eseguite iniezioni transaddominali in diverse fasi gestazionali, utilizzando dosi differenti del vettore per valutare la biodistribuzione in organi come fegato, cuore, polmoni, muscolo scheletrico e SNC. La procedura ha dimostrato un'efficace

somministrazione del transgene senza risposte infiammatorie significative, tossicità o effetti avversi negli organi critici. Il nostro prossimo obiettivo è applicare questa tecnica per la somministrazione del gene terapeutico nei feti SURF1KO. Questi risultati dimostrano la sicurezza e la fattibilità della terapia genica in utero, suggerendo il potenziale di questo approccio anche per altre patologie genetiche congenite.

131

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Mitochondrial DNA depletion syndrome, encephalomyopathic form

Leigh Syndrome

DECODING TMEM65 FUNC?ON: THE PATHWAY TO MTDNA INTEGRITY

De Gregorio Cristian[1], O. Zarbo[1](Co-author), M.E. Soriano[1], D. D'Angelo[1], A. Raffaello[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GJC22073; Soriano Maria Eugenia

TMEM65 is a mitochondrial protein of unclear function. A decade ago, a patient with a homozygous mutation in TMEM65 was reported to suffer from mitochondrial encephalomyopathy, characterized by reduced mitochondrial DNA (mtDNA) copy number and impaired mitochondrial respiration. Despite this, the function of TMEM65 remained unknown until recent studies suggested its role in calcium homeostasis, likely through regulation of the Na^+/Ca^{2+} exchanger NCLX. Consistent with these findings, TMEM65 knockout (KO) cells exhibit elevated calcium levels in the mitochondrial matrix. However, whether TMEM65 directly regulates mtDNA copy number or does so indirectly via calcium levels remains unclear. Our preliminary complexomic studies revealed that TMEM65 assembles into two distinct protein complexes of unknown function. Interestingly, both complexes are absent in mtDNAdepleted cell lines. This loss correlates with a marked reduction in TMEM65 protein levels following acute mtDNA depletion with ethidium bromide (EtBr). Furthermore, genetic modulation of TMEM65 expression impacts nucleoid number and size, a phenomenon also observed in a newly identified patient carrying a TMEM65 mutation. Notably, mitochondrial translation and mitoribosome stability remain unaffected, suggesting that TMEM65 is specifically involved in mtDNA-associated processes. To determine whether the nucleoid and mtDNA copy number alterations observed in TMEM65 KO cells and patients result from TMEM65 deficiency itself or from changes in mitochondrial calcium levels, we silenced the mitochondrial calcium uniporter (MCU) in TMEM65 KO cells. Our preliminary results indicate that MCU silencing rescues nucleoid number, suggesting that calcium levels regulate mtDNA copy number. Ongoing experiments aim to elucidate the molecular mechanisms underlying this regulation.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Sindrome da deplezione del DNA mitocondriale, forma miopatica; Sindrome da deplezione del mtDNA, forma miopatica;

Sindrome di Leigh; Malattia di Leigh; Encefalomielopatia subacuta necrotizzante;

DECIFRANDO LA FUNZIONE DI TMEM65: LA VIA PER L'INTEGRITÀ DEL MTDNA

TMEM65 è una proteina mitocondriale di funzione poco chiara. Un decennio fa, un paziente con mutazione omozigote in TMEM65 è stato descritto con encefalomiopatia mitocondriale, riduzione del numero di copie del DNA mitocondriale (mtDNA) e respirazione mitocondriale compromessa. Studi recenti suggeriscono un ruolo di TMEM65 nell'omeostasi del calcio, probabilmente regolando lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} NCLX. Le cellule knockout (KO) per TMEM65 mostrano livelli elevati di calcio nella matrice mitocondriale, ma non è chiaro se TMEM65 influenzi direttamente il numero di copie del mtDNA o lo faccia attraverso i livelli di calcio.

Studi complexomici preliminari rivelano che TMEM65 forma due complessi proteici di funzione sconosciuta, entrambi assenti in cellule prive di mtDNA. La deplezione acuta di mtDNA con bromuro di etidio (EtBr) riduce i livelli di TMEM65. Inoltre, la modulazione genetica della sua espressione altera il numero e la dimensione dei nucleoidi, fenomeno osservato anche in un paziente con mutazione in TMEM65. Tuttavia, la traduzione mitocondriale e la stabilità del mitoribosoma non risultano compromesse, suggerendo un ruolo specifico di TMEM65 nei processi associati al mtDNA.

Per chiarire se le alterazioni nei nucleoidi e nel numero di copie di mtDNA siano dovute alla carenza di TMEM65 o ai livelli di calcio, abbiamo silenziato l'uniportatore mitocondriale del calcio (MCU) in cellule KO TMEM65. I risultati preliminari indicano che il silenziamento di MCU ripristina il numero di nucleoidi, suggerendo che il calcio regoli il numero di copie del mtDNA. Esperimenti in corso mirano a chiarire i meccanismi molecolari di questa regolazione.

132

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Neuromuscular diseases

RNA-BASED COMBINATORIAL MULTI TARGET THERAPY FOR THE TREATMENT OF INHERITED NEUROMUSCULAR DISEASES

Sandri Marco[1], M. Pennuto[1], C. Viscomi[1]

[1]Padova, Istituto Veneto Di Medicina Molecolare (VIMM)

Project: GSP24003; Sandri Marco

Genetic neuromuscular disorders are characterized by muscle wasting, impaired mobility and premature death. There is no cure to arrest disease progression. Importantly, patients with neuromuscular diseases already experienced muscle loss and weakness at diagnosis. The recovery of muscle mass, myofiber innervation and force generation are important issues that are not targeted by current therapeutic approaches. To overcome these hurdles and accelerate development of neuromuscular therapeutics, we propose to test the central hypothesis that multi target RNA-based therapeutics to specifically target different signaling pathways combined or not with disease-specific gene editing approaches support muscle mass and force recovery. We will assess the efficacy of our approach in three inherited muscle conditions: Duchenne muscle dystrophy characterized by muscle degeneration and regeneration, spinobulbar muscle atrophy (SBMA) characterized by muscle atrophy and motoneuron degeneration,

and autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO) characterized by mitochondrial DNA instability and myopathy. Our experimental approach combines the use of murine models and patient-derived neuromuscular organoids (NMOs). We will pursue the following specific aims to: 1) Develop disease-specific gene editing technologies for skeletal muscle genetic conditions. 2)Create disease-specific ATLAS (Myo-PATH) to identify pathogenetic pathways. 3) Test the efficacy of multi-target RNA therapy modulating anabolic and catabolic pathways. 4) Assess the impact of gene editing combined with RNA therapy. We will provide proof-of-concept that gene editing or multitarget RNA therapy are effective to delay disease progression. Furthermore, we expect to establish that the combination of these approaches has synergistic effects. If our proposed combinatorial therapy is successful, it will be groundbreaking and open the possibility to apply this strategy to other neuromuscular diseases.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Malattie neuromuscolari

UN APPROCCIO GENETICO COMBINATO PER TRATTARE LE MALATTIE NEUROMUSCOLARI EREDITARIE

Le malattie neuromuscolari sono ancora orfane di una terapia efficace e curativa. La terapia genica può essere una risposta alla necessità di nuove cure, ma presenta limitazioni dovute all'uso di virus come vettori presenta alcuni limiti legati alla risposta immunitaria e all' efficienza con cui le fibre muscolari vengono geneticamente corrette. Inoltre, i pazienti arrivano alla diagnosi delle malattie neuromuscolari e al trattamento con la terapia genetica quando la perdita di massa muscolare e forza è evidente o addirittura importante. Questo progetto propone un approccio combinato innovativo in cui assieme alla correzione del gene mutato si attivano segnali che promuovano la crescita muscolare, il metabolismo energetico e l'innervazione attraverso l'uso di molecole di RNA. Terapie combinate vengono già utilizzate per la cura dei tumori, delle malattie autoimmuni e recentemente anche del diabete e dell'obesità, mentre non sono mai state esplorate nel campo delle malattie genetiche. Questo progetto vuole essere uno studio pilota sulla sua fattibilità. Useremo le più moderne tecnologie per la correzione della sequenza del DNA insieme alla terapia a RNA in tre malattie neuromuscolari, quali la distrofia di Duchenne, la malattia di Kennedy e la patologia mitocondriale da mutazioni nel gene POLG. Questo approccio verrà testato sia su diversi modelli murini di malattia sia su organoidi neuromuscolari derivati dalle cellule di pazienti. Il progetto prevede anche lo sviluppo di diverse tecnologie avanzate che permetteranno sia di capire meglio i meccanismi di malattia. Se il progetto avrà successo, si aprirà la strada per il trattamento combinato ad altre malattie neuromuscolari.

133

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease)

TACKLING DNA DAMAGE AND SENESCENCE TO IDENTIFY NEW THERAPEUTIC TARGETS FOR SBMA

Bincoletto Giacomo[1], **C Marchioretti**[1], **R Andreotti**[1], **E Zuccaro**[1], **M Pennuto**[1]

[1]*Padova, Università Di Padova*

Project: GSP24003-; Pennuto Maria

The androgen receptor (AR) is a nuclear receptor activated by ligand binding (androgenic hormones). Activation leads to AR translocation into the nucleus, DNA binding, cofactors recruitment and ultimately regulation of androgen responsive genes' expression. Expansions over 38 repeats of the polymorphic glutamine (Q)-encoding CAG tandem repeat in the first exon of the androgen receptor gene (AR) gene cause Kennedy disease, also known as spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): an inherited, slowly progressive neurodegenerative disease that fully manifests only in males, due to their higher levels of testosterone. SBMA is characterized by both a loss of function (LOF) and toxic gain of function (GOF) of AR, leading to motor neuron loss, muscle atrophy, mild androgen insensitivity syndrome and metabolic syndrome. Despite being considered a motor neuron disorder for a long time, in the last decade a key emerging aspect of SBMA is the primary involvement of peripheral tissues, such as skeletal muscle. In detail, we provide evidence of extensive activation of pathways linked to DNA damage, inflammation and cellular senescence in muscles of our mouse models and biopsies from SBMA patients. These alterations start being evident at disease onset and are further exacerbated at the late stage of the disease, mirroring the progressive worsening of the muscle phenotype in the mouse model. Interestingly, surgical castation results in an amelioration of the phenotype, highlighting the androgen-dependency of the pathology, driven by the toxicity of the polyQ-expanded AR. Studying the role of the AR in SBMA could serve as a starting point to characterize its role in the sex discrepancy of many other pathologies, including aging. We suggest that senolytics or senomorphics might be an effective therapy for SBMA to clear damaged cells from the muscle, therefore attenuating the detrimental consequences of the toxic GOF without exacerbating the LOF of the receptor.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Atrofia muscolare spinale e Bulbare; SBMA; Mallattia di Kennedy; BSMA legata allX; Amiotrofia bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinale e bulbare legata all'X; Atrofia muscolare bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinobulbare SMAX1-correlata;

SENESCENZA E DANNO AL DNA COME NUOVI TARGET IN SBMA

"Il recettore degli androgeni (AR) è un recettore nucleare attivato dal legame del ligando (androgeni). L'attivazione porta alla traslocazione dell'AR nel nucleo, al legame del DNA, al reclutamento di cofattori e infine alla regolazione dell'espressione dei geni responsivi agli androgeni. Le espansioni oltre 38 ripetizioni del tratto polimorfico CAG, codificante per la glutammina (Q), nel primo esone del gene del recettore degli androgeni (AR) causano l'atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA): una malattia neurodegenerativa ereditaria e progressiva che si manifesta completamente solo nei maschi, a causa dei loro livelli più elevati di testosterone. La SBMA è caratterizzata sia da una perdita di funzione (LOF) che da un guadagno tossico di funzione (GOF) dell'AR, che porta alla perdita dei motoneuroni, all'atrofia muscolare, a sindrome da insensibilità agli androgeni e a sindrome metabolica. Nonostante sia stata a lungo considerata una malattia dei motoneuroni, nell'ultimo decennio un aspetto chiave emergente della SBMA è il coinvolgimento primario dei tessuti periferici, come il muscolo scheletrico. Abbiamo raccolto prove di un'ampia attivazione di pathways collegati a danno al DNA, infiammazione e senescenza cellulare nei muscoli dei nostri modelli murini e biopsie di pazienti. Queste alterazioni iniziano a essere evidenti all'insorgenza della malattia e sono esacerbate

nella fase avanzata della malattia, rispecchiando il progressivo peggioramento del fenotipo muscolare nel modello di topo. Studiare il ruolo dell'AR nella SBMA potrebbe servire come punto di partenza per caratterizzare il suo ruolo nella discrepanza di sesso di molte altre patologie, incluso l'invecchiamento. Suggeriamo che farmaci senolitici o senomorfici potrebbero rappresentare una terapia efficace in SBMA per eliminare le cellule danneggiate dal muscolo, attenuando quindi le conseguenze dannose del GOF tossico senza esacerbare la LOF del recettore."

134

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease)

DEVELOPING A STRATEGY TO TARGET AR COACTIVATORS IN PRECLINICAL MODELS OF SBMA

R. Borella[1], F. Rosada[1], R. Andreotti[2], C. Marchioretti[2], L. Jauze[3], G.P. Stola[4], L. Nicoletti[4], G. Ronzitti[3], B. Stella[4], V. Chiono[4], M. Pennuto[2], M. Basso[1]

[1]Trento, Università Di Trento
[2]Padova, Università Di Padova
[3]Paris, Genethon
[4]Torino, Politecnico Di Torino

Project: GMR23T1032; Basso Manuela

Spinobulbar muscular atrophy (SBMA) is caused by CAG expansions in the androgen receptor gene. Androgen binding to polyQ-expanded androgen receptor triggers SBMA through a combination of toxic gain-of-function and loss-of-function mechanisms. Leveraging cell lines, mice, and patient-derived specimens, we show that androgen receptor co-regulators lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and protein arginine methyltransferase 6 (PRMT6) are overexpressed in an androgen-dependent manner specifically in the skeletal muscle of SBMA patients and mice. LSD1 and PRMT6 cooperatively and synergistically transactivate androgen receptor, and their effect is enhanced by expanded polyQ. Pharmacological and genetic silencing of LSD1 and PRMT6 attenuates polyQ-expanded androgen receptor transactivation in SBMA cells and suppresses toxicity in SBMA flies, and a preclinical approach based on miRNA-mediated silencing of LSD1 and PRMT6 attenuates disease manifestations in SBMA mice. These observations suggest that targeting overexpressed co-regulators can attenuate androgen receptor toxic gain-of-function without exacerbating loss-of-function, highlighting a potential therapeutic strategy for patients with SBMA. To ameliorate the preclinical strategy, we are testing the effects of muscle-specific adeno-associated viruses (AAVs), and nanoparticle (NP)-mediated delivery of Lsd1 and Prmt6-targeting artificial miRNAs to evaluate the best pre-clinical strategy to employ in future therapeutic developments.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Atrofia muscolare spinale e Bulbare; SBMA; Mallattia di Kennedy; BSMA legata allX; Amiotrofia bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinale e bulbare legata all'X; Atrofia muscolare bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinobulbare SMAX1-correlata;

SVILUPPO DI UNA STRATEGIA PER MODULARE L'ATTIVITÀ DEI COATTIVATORI DEL RECETTORE DELL'ANDROGENO NEI MODELLI PRECLINICI DI SBMA

L'atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA) è causata dalle espansioni CAG nel gene del recettore degli androgeni. Il legame degli androgeni al recettore degli androgeni con espansione in poliglutammine induce la malattia di Kennedy attraverso una combinazione di meccanismi tossici di guadagno e perdita di funzione. Utilizzando linee cellulari, topi e campioni derivati dai pazienti, mostriamo che i co-regolatori del recettore degli androgeni, chiamati demetilasi specifica della lisina 1 (LSD1) e la proteina arginina metiltransferasi 6 (PRMT6) sono sovraespressi in modo androgeno-dipendente specificamente nel muscolo scheletrico di pazienti e topi SBMA. LSD1 e PRMT6 transattivano cooperativamente e sinergicamente il recettore degli androgeni e il loro effetto è potenziato dall'espansione in poliglutammina. Il silenziamento farmacologico e genetico di LSD1 e PRMT6 attenua la transattivazione del recettore degli androgeni espanso nelle cellule SBMA e sopprime la tossicità nelle mosche SBMA, mentre un approccio preclinico basato sul silenziamento mediato da microRNA di LSD1 e PRMT6 attenua le manifestazioni della malattia nei topi SBMA. Queste osservazioni suggeriscono che prendere di mira i co-regolatori sovraespressi può attenuare il guadagno di funzione tossico del recettore degli androgeni senza esacerbare la perdita di funzione, evidenziando una potenziale strategia terapeutica per i pazienti con SBMA. Per migliorare la strategia preclinica, stiamo testando gli effetti dei virus adeno-associati (AAV) specifici del muscolo e il rilascio mediato da nanoparticelle (NP) di miRNA artificiali mirati a Lsd1 e Prmt6 per valutare la migliore strategia preclinica da impiegare in futuri sviluppi terapeutici.

135

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease)

GENOME EDITING AND RNA-BASED COMBINATORIAL MULTI TARGET THERAPY FOR THE TREATMENT OF INHERITED NEUROMUSCULAR DISEASES: UNIT KENNEDY DISEASE

C. Marchioretti[1], G. Bincoletto[1], R. Andreotti[1], M. Pennuto[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GSP24003-; Pennuto Maria

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA, also known as Kennedy disease) is an X-linked neuromuscular disorder characterized by the dysfunction and loss of motor neurons (MNs) in the brainstem and spinal cord, which manifests as skeletal muscle fasciculations, weakness, and atrophy. Patients also present with signs of endocrine abnormalities, such as gynecomastia, testicular atrophy, reduced fertility, and in some cases insulin intolerance and diabetes. SBMA is caused by exonic glutamine (Q)-encoding CAG expansions (>38) in the androgen receptor (AR) gene. SBMA is an androgen-dependent disease, fully manifesting in men, because androgen binding converts polyQ-expanded AR into a toxic molecule through toxic gain-of-function (GOF) and loss-of-function (LOF) mechanisms. In the last decade, clinical and experimental evidence has established that in SBMA skeletal muscle atrophy is not only secondary to MN dysfunction, but it also results from the primary cell-autonomous toxicity of polyQ-expanded AR in the myofiber. There is evidence that the deregulation of androgen signaling is necessary and sufficient to cause functional alterations in the motor

unit. We will develop disease-specific therapeutic strategies to target pathogenetic pathways in SBMA skeletal muscle, generate a "Myo-Path" of gene expression alterations before onset and during disease progression, and we will assess the efficacy of combinatorial therapy for amelioration of phenotype in preclinical models and 3D cultures derived from patients. We expect to obtain a comprehensive pattern of information spanning from molecular to cell biology combined with preclinical assessment.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Atrofia muscolare spinale e Bulbare; SBMA; Mallattia di Kennedy; BSMA legata allX; Amiotrofia bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinale e bulbare legata all'X; Atrofia muscolare bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinobulbare SMAX1-correlata;

EDITING DEL GENOMA E TERAPIA MULTI-TARGET COMBINATORIA BASATA SU RNA PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE NEUROMUSCOLARI EREDITARIE: UNITÀ MALATTIA KENNEDY

L'atrofia spinale muscolare e bulbare (SBMA, anche nota come malattia di Kennedy) è un disturbo neuromuscolare legato al cromosoma X caratterizzato dalla disfunzione e perdita dei motoneuroni (MN) nel tronco encefalico e nel midollo spinale, che si manifestano come fascicolazioni del muscolo scheletrico, debolezza e atrofia. I pazienti presentano anche segni di anomalie endocrine, come ginecomastia, atrofia testicolare, ridotta fertilità e, in alcuni casi, intolleranza all'insulina e diabete. La malattia SBMA è causata da espansioni della tripletta CAG codificante la glutammina (Q) (>38) nel gene del recettore degli androgeni (AR). La SBMA è una malattia androgeno-dipendente, che si manifesta pienamente negli uomini, perché il legame con gli androgeni converte l'AR espanso in poliQ in una molecola tossica attraverso meccanismi tossici di guadagno di funzione (GOF) e perdita di funzione (LOF). Nell'ultimo decennio, prove cliniche e sperimentali hanno stabilito che nella malattia SBMA l'atrofia del muscolo scheletrico non è solo secondaria alla disfunzione del MN, ma deriva anche da eventi catastrofici che avvengono nelle cellule muscolari. Ci sono prove che la deregolazione del segnale degli androgeni è necessaria e sufficiente per causare alterazioni funzionali nell'unità motoria. Svilupperemo strategie terapeutiche specifiche per la malattia per colpire i processi patogenetici nel muscolo scheletrico SBMA, generare un "Myo-Path" di alterazioni dell'espressione genica prima dell'insorgenza e durante la progressione della malattia e valuteremo l'efficacia della terapia combinatoria per il miglioramento del fenotipo nei modelli preclinici e nelle colture 3D derivate dai pazienti. Ci aspettiamo di ottenere un modello completo di informazioni che spazia dalla biologia molecolare a quella cellulare combinato con la valutazione preclinica.

136

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Spinal muscular atrophy

rRNA 2'O methylation patterns as novel biomarkers for Spinal Muscular Atrophy

Lauria Fabio[1], E. Perenthaler[1], M. Massari[1], D. Donzel[1]
YT Huang[2], T.H. Gillingwater[2], G. Viero[1]

[1]Trento, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Edinburgh, Edinburgh Medical School: Biomedical Sciences & Euan MacDonald Centre for Motor Neuron Disease Research, University of Edinburgh, Edinburgh

Project: GMR23T1048; Viero Gabriella

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a genetic disease, which affects the survival of motor neurons caused by depletion of the SMN protein. Despite success obtained with therapies, no current treatments offer a definitive cure. To evaluate disease progression and response to therapies, a handful of molecular biomarkers have been proposed but no one is robust, reliable and disease-specific. Our work proposes a completely unexplored class of putative biomarkers which rely on the concept of ribosomes heterogeneity and on epitranscriptional modifications of the RNA. Besides more traditional functions, SMN protein associates with ribosomes, the macromolecular machineries that produce proteins. This association is lost in SMA causing defective protein production in vitro, in cellulo and in vivo models of SMA. Our preliminary results show that SMN promotes the formation of a protein network involved in translation initiation and elongation, binding of m6A in mRNAs and catalysis of 2'O methylations (2'Ome) in rRNA. The interaction of SMN with the methyltransferase Fibrillarin (FBL) suggests a possible role of SMN in translation regulation via the modulation of the 2'Ome landscape. This hypothesis is further supported by the observation that FBL is enriched in cytoplasmic ribosomes bound by SMN and that the levels of SMN and FBL strongly correlates in mouse cell models of SMA. Prompted by these findings, we exploited RiboMethSeq to map in vivo the rRNA 2'Ome in control and SMA ribosomes in the brain of a mouse model of SMA. Our data show that SMN loss induces alterations in the 2'Ome landscape with major differences associated with methylations known to be development-dependent. Strikingly, the rRNA 2'O methylome obtained from patient's derived fibroblasts can be used to stratify the patients according to their disease severity. Taken together, our findings open new scenarios for novel biomarkers in SMA, which hopefully could serve as a model for other diseases.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Atrofia muscolare spinale; SMA

METILAZIONI 2'O DEGLI RRNA COME NUOVI BIOMARCATORI PER L'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE.

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia genetica causata dalla riduzione della proteina SMN, indispensabile per lo sviluppo e il mantenimento dei motoneuroni. Nonostante i successi ottenuti con le attuali terapie, nessun trattamento offre una cura definitiva. Per valutare la progressione della malattia e la risposta alle terapie, sono stati proposti alcuni biomarcatori molecolari, ma nessuno di essi è robusto, affidabile e specifico per la SMA. Il nostro studio propone una classe inesplorata di biomarcatori, basata sulle modifiche epitrascrizionali dell'RNA. Oltre alle funzioni tradizionali, SMN si lega ai ribosomi, le macchine macromolecolari che producono proteine. Questa associazione viene persa nella SMA, causando difetti nella produzione proteica in vitro, in cellulo e nei modelli in vivo della malattia. I nostri risultati mostrano che SMN promuove la formazione di una piattaforma proteica coinvolta anche nella catalisi delle metilazioni 2'O (2'Ome) degli rRNA. Inoltre, l'interazione di SMN con la metiltransferasi Fibrillarin (FBL) suggerisce un ruolo di SMN nella regolazione della traduzione attraverso la modulazione del corredo di 2'Ome. Questa ipotesi è supportata dall'arricchimento di FBL sui ribosomi citoplasmatici legati a SMN e dall'alta correlazione tra i livelli di SMN e FBL nei modelli cellulari murini di SMA. Spinti da questi risultati, tramite RiboMethSeq abbiamo mappato in vivo le 2'Ome degli rRNA in controllo e SMA in un modello

murino di SMA. I nostri dati rivelano che la perdita di SMN induce alterazioni nel corredo di 2'Ome, con differenze significative associate a metilazioni note per essere dipendenti dallo sviluppo. Sorprendentemente, le 2'Ome degli rRNA nei fibroblasti derivati da pazienti stratifica i pazienti in base alla gravità della malattia. I nostri risultati aprono nuovi scenari per lo sviluppo di biomarcatori innovativi nella SMA, che potrebbero, auspicabilmente, servire come modello per altre malattie.

137

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Spinal muscular atrophy

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF SMN CIRCRNAS IN HIPSCS AND HIPSCS DERIVED MNS

Guerra Marika[1], R. Borghi[2], C. Compagnucci[2], G. Coratti[3], M. Tartaglia[2], E.M. Mercuri[3], V. Pagliarini[4], C. Sette[4],

[1]Rome, Università Cattolica Del Sacro Cuore - Roma
[2]Rome, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS
[3]Rome, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli
[4]Rome, Università Cattolica Del Sacro Cuore - Roma

Project: GGP20055; Sette Claudio

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disease caused by mutations in the SMN1 gene, which encodes for the essential SMN protein. Humans also harbour an SMN1 homologous gene, named SMN2. However, due to a splicing defect in exon 7, SMN2 encodes a truncated protein with defective functions. The small amount of SMN2 transcripts producing the full-length functional SMN protein allows survival of patients at birth, but it does not prevent the disease. SMN2 is a disease modifier gene and its copy number inversely correlates with SMA severity. The current SMA therapies either rescue the SMN2 splicing defect or substitute the defective SMN1 gene. However, not all SMA patients equally respond to them. Thus, identification of reliable markers that predict therapy response is crucial. The SMN locus generates multiple circular RNAs (circRNAs) through non-canonical back-splicing events. CircRNAs are stable molecules, accumulate in long-living cells like neurons, and are abundant in brain. They are secreted in body fluids and modulate neuronal functions, including synaptic plasticity. We found that high levels of SMN circ4-2b-3 define a sub-group of SMA patients that respond particularly well to splicing correcting therapies, suggesting its potential role as biomarker of therapeutic response. Herein, we show that SMN circ4-2b-3 is equally expressed in control and SMA human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). SMN circ4-2b-3 localizes prevalently in the nucleus of hiPSCs and it is significantly up-regulated during their differentiation into motor neurons (MNs), which are the most affected cells in SMA. Ongoing studies are investigating the function of SMN circ4-2b-3 during MNs differentiation, by evaluating its impact on MN fitness and/or physiology and the potential effectors of its functional activity in both normal and SMA cells. These studies will shed light on the role of this SMN circRNA and may highlight new processes involved in the pathology of SMA.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Atrofia muscolare spinale; SMA;

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEGLI RNA CIRCOLARI DI SMN IN HIPSCS E MOTONEURONI DERIVANTI DA HIPSCS

L'atrofia muscolare spinale è una malattia neuromuscolare causata da mutazioni nel gene SMN1, che codifica per la proteina SMN. Gli esseri umani possiedono un gene omologo di SMN1, SMN2. A causa di un difetto di splicing, SMN2 codifica per una proteina non funzionale. La piccola quantità di trascritti di SMN2 che produce una proteina SMN completa e funzionale consente la sopravvivenza dei pazienti, ma non previene la malattia. SMN2 è un gene modificatore della malattia e il suo numero di copie correla inversamente con la gravità della SMA. Le attuali terapie correggono il difetto di splicing di SMN2 oppure prevedono la sostituzione del gene SMN1 difettoso, anche se non tutti i pazienti affetti da SMA rispondono allo stesso modo. Pertanto, l'identificazione di marcatori che predicano la risposta terapeutica è cruciale. SMN genera numerosi RNA circolari (circRNA), molecole stabili che si accumulano nelle cellule che non si dividono come i neuroni e molto abbondanti nel sistema nervoso. I circRNA vengono secreti nei fluidi corporei e possono modulare le funzioni neuronali, inclusa la plasticità sinaptica. Abbiamo scoperto che alti livelli del circolare di SMN, il circ4-2b-3, definiscono un sottogruppo di pazienti SMA che rispondono bene alle terapie che correggono il difetto di splicing, suggerendone un potenziale ruolo come biomarcatore della risposta terapeutica. In questo studio, mostriamo che il circ4-2b-3 è espresso similmente nelle cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) di controllo e SMA. Questo circRNA si localizza prevalentemente nel nucleo è up-regolato durante il loro differenziamento in motoneuroni (MN), le cellule maggiormente colpite nella SMA. Stiamo investigando la funzione del circ4-2b-3 durante il differenziamento dei MN, valutando il suo impatto sulla loro fisiologia e i potenziali effettori della sua attività funzionale in cellule normali che SMA. Questi studi potrebbero evidenziare nuovi processi coinvolti nella patologia della SMA.

138

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases

Spinal muscular atrophy

MINIATURIZED GENOME EDITING TOOLS FROM THE MICROBIOME: UNVEILING THE POTENTIAL OF ISCB AND TNPB PROTEINS

Conci Alessio[1], I. Bonuzzi[1], M. Ciciani[1], M. Zoccheddu[1], P. M. Escudero[1], N. Segata[1], A. Cereseto[1]

[1]Trento, Università Di Trento

Project: Other-AC; Cereseto Anna

Advances in the development of novel CRISPR/Cas-based gene therapies for genetic disorders have sparked new hopes for thousands of patients worldwide. However, several challenges remain, one of which is the size of the genome editor, as the cargo capacity of viral vector delivery systems is limited. Various strategies, such as split genome editors, have been explored, but their efficiency is suboptimal. Therefore, the search for smaller alternatives to the canonical SpCas9 is of major importance. Recent years have seen the discovery of several new genome editors, including IscBs and TnpBs. These consist of approximately ~400 amino acids and bind a 200-400 guide RNA sequence (ωRNA), which makes them about 70% smaller than SpCas9, allowing for a potential all-in-one AAV delivery while maintaining significant editing activity. This project aims to identify and characterize novel miniature genome editors derived from the human microbiome. Through the mining of prokaryotic metagenomic data we identified several

candidates from the IscB and TnpB families and tested their activity by deep sequencing. Although most candidates did not show any activity on endogenous human loci, a few promising editors were identified. These proteins require further optimization to achieve editing levels suitable for clinical applications, but there is a considerable margin for improvement. One key challenge is the size of the ωRNA which is large and difficult to deliver. A rational and systematic approach to trimming the ωRNA sequence could reduce its size and enhance editing efficiency. Additionally, we plan to employ a eukaryotic-based evolutionary method developed in our lab to further increase the editing activity of our candidates. We will also explore their potential as base and epigenome editors. Ultimately, our efforts aim to uncover novel genome editors to expand the range of rare genetic diseases that can be treated with genome editing technologies.

Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Atrofia muscolare spinale; SMA

STRUMENTI MINIATURIZZATI DI EDITING GENOMICO DAL MICROBIOMA: SVELANDO IL POTENZIALE DELLE PROTEINE ISCB E TNPB

Recenti sviluppi nelle terapie geniche basate sulla tecnologia CRISPR/Cas hanno portato nuove speranze per il trattamento di malattie genetiche in tutto il mondo. Tuttavia, ci sono ancora alcune limitazioni, come la dimensione degli strumenti di editing genomico, che sono troppo grandi per essere introdotti nelle cellule tramite vettori virali. Alcune soluzioni che ovviano a questo problema, sono state provate, ma non sono molto efficienti. Per questo, è importante trovare strumenti più piccoli ed efficaci. Negli ultimi anni, sono state scoperte nuove proteine che sono molto più piccole di quelle tradizionali come la Cas9, ma comunque in grado di modificare il DNA in modo efficace. Questi gruppi di proteine si chiamano IscB e TnpB e stanno mostrando un elevato potenziale per il trattamento di malattie genetiche rare. In questo progetto, stiamo cercando e studiando nuove IscB e TnpB provenienti dal microbioma umano. Grazie a delle previsioni bioinformatiche e a successivi test in laboratorio, abbiamo trovato alcuni candidati promettenti, sia tra le IscB che tra le TnpB, che potrebbero essere utilizzati per diverse malattie genetiche. Al momento stiamo lavorando per migliorare ed ottimizzare l'attività di queste proteine, in modo tale che in futuro possano essere utilizzate in applicazioni cliniche. Il nostro obiettivo finale è scoprire nuovi strumenti che potrebbero aiutare a trattare un numero maggiore di malattie genetiche rare.

139

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne and Becker muscular dystrophy

IN VIVO INHIBITION OF COMPLEMENT C1Q IN A MOUSE MODEL OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Biressi Stefano[1], S. Di Savino[1], F. Florio[1], S. Gaspari[1], M. Libergoli[1], Y. Torrente[2], B. Blaauw[3], V. Mathur[4], L. Kuhn[4], Y. S. Andrews-Zwilling[4], R. Artis[4], T. Yednock[4], T. A. Rando[5]

[1]Trento, Italy, Università Di Trento
[2]Milano, Italy, Università Degli Studi Di Milano Statale
[3]Padova, Italy, Università Di Padova
[4]South San Francisco, CA, USA, Annexon Biosciences
[5]Los Angeles, CA, USA, Broad Stem Cell Research Center University of California

Project: GMR23T1221; Biressi Stefano

In the muscles of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) patients, the absence of dystrophin causes a chronic condition of degeneration and inflammation. Fibers progressively undergo necrosis and are substituted by fibrotic extracellular matrix, determining a severe loss of muscular function. Recently obtained data from our laboratory demonstrate that complement C1, the complex operating upstream of the classical complement cascade, is aberrantly up-regulated in DMD patients and animal models. The C1 complex comprises multiple subunits codified by five genes: C1qa, C1qb, C1qc, C1s, and C1r. When we fractioned the cells from dystrophic muscles into the various subpopulations and evaluated the expression of the distinct complement C1 subunits, we could observe that all C1q subunits were almost exclusively expressed in macrophages, whereas C1s and C1r were preferentially induced in fibro-adipogenic progenitors (FAPs) populating the muscle interstitium. Importantly, we observed that the pharmacological inhibition of the enzymatic subunits of the C1 complex, C1s and C1r, counteracts the accumulation of fibrotic tissue in the fib-MDX model, an accelerated murine model of DMD. These observations suggest that a complement C1 plays a detrimental role in the progression of muscular dystrophy. Nevertheless, the effects of long-term inhibition of complement C1 in the dystrophic setting and the exact mechanisms underlining the influence of complement on dystrophic progression remain to be elucidated. To address these points, we started to evaluate the effects of C1q inhibition by investigating the phenotype of dystrophic MDX mice in which the expression of C1q has been genetically ablated. Both functional and mechanistic studies are currently ongoing. With this project, we strive to pave the road for repurposing C1-inhibitors into clinical use in dystrophic patients.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Diftrofia muscolare di Becker e Duchenne; distrofinopatie; DMD e DMB

INIBIZIONE IN VIVO DEL COMPLEMENTO C1Q IN UN MODELLO MURINO DI DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

Nei muscoli dei pazienti con distrofia muscolare di Duchenne (DMD), l'assenza di distrofina causa una condizione cronica di degenerazione e infiammazione. Le fibre vanno progressivamente incontro a necrosi e vengono sostituite da matrice extracellulare fibrotica, determinando una grave perdita di funzionalità muscolare. Dati recentemente ottenuti dal nostro laboratorio dimostrano che il complemento C1, il complesso che opera a monte della cascata classica del complemento, è sovraregolato in modo anomalo nei modelli animali e nei pazienti con DMD. Il complesso C1 comprende più subunità codificate da cinque geni: C1qa, C1qb, C1qc, C1s e C1r. Quando abbiamo frazionato le cellule dei muscoli distrofici nelle varie sottopopolazioni e valutato l'espressione delle distinte subunità del complemento C1, abbiamo potuto osservare che tutte le subunità C1q erano espresse quasi esclusivamente nei macrofagi, mentre C1s e C1r erano indotte preferenzialmente nei progenitori fibro-adipogenici (FAP) che popolano l'interstizio muscolare. Abbiamo anche osservato che l'inibizione farmacologica delle subunità enzimatiche del complesso C1, C1s e C1r, contrasta l'accumulo di tessuto fibrotico nel modello fib-MDX, un modello murino accelerato di DMD. Queste osservazioni suggeriscono che il complemento C1 svolga un ruolo dannoso nella progressione della distrofia muscolare. Tuttavia, gli effetti dell'inibizione a lungo termine del complemento C1 nell'ambiente distrofico e gli esatti meccanismi che sono alla

base dell'influenza del complemento sulla progressione distrofica devono ancora essere chiariti. Per affrontare questi punti, abbiamo iniziato a valutare gli effetti dell'inibizione di C1q studiando il fenotipo dei topi MDX distrofici in cui l'espressione di C1q è stata geneticamente ablata. Sono attualmente in corso studi sia funzionali che meccanicistici. Con questo progetto ci impegniamo ad aprire la strada al riutilizzo degli inibitori del C1 per l'uso clinico nei pazienti distrofici.

140

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne and Becker muscular dystrophy

UTROPHIN OVEREXPRESSION BY PRECISE BASE EDITING AS A UNIVERSAL THERAPEUTIC STRATEGY FOR DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Colli Francesca[1], C. Santangeli[1], B. Pacchioni[1], D. Berionni[2], C. Millinoi[2], M. Bellini[2], F. Chemello[1]

[1]Bologna, Università di Bologna
[2]Padova, Università Di Padova

Project: GMR23T2186; Chemello Francesco

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a fatal X-linked recessive disorder characterized by progressive muscle weakness and wasting, resulting from the absence of dystrophin protein. Various therapeutic approaches have been explored to restore muscle function in DMD; however, none have demonstrated the potential for permanent treatment. CRISPR-Cas9 gene editing offers the possibility of permanently correcting dystrophin gene mutations and restoring dystrophin protein. Nevertheless, these gene editing strategies are mutation-specific, limiting their applicability to only subsets of DMD patients. Utrophin, a paralogue of dystrophin, is expressed at low levels in mature muscle but its overexpression could serve as a universal therapeutic strategy for all DMD patients. Here, we aim to precisely disrupt miRNA binding sites within the 3' untranslated region of the utrophin gene using base editing. Base editors are advanced genome editing tools that enable irreversible base conversion at specific sites without introducing DNA double-strand breaks. By permanently disrupting the miRNA binding sites of utrophin through base editing, we will prevent the translational silencing of utrophin by miRNAs, leading to the overexpression of utrophin protein. This upregulation of utrophin is expected to result in functional improvements in human DMD cardiomyocytes and myotubes, as well as in DMD mouse models with various dystrophin gene mutations. The outcomes of this project will establish a new, permanent, and universal therapeutic strategy for all DMD patients.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Diftrofia muscolare di Becker e Duchenne; distrofinopatie; DMD e DMB;

SOVRAESPRESSIONE DI UTROFINA TRAMITE BASE EDITING MIRATO COME STRATEGIA TERAPEUTICA UNIVERSALE PER LA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia genetica recessiva legata al cromosoma X, caratterizzata da progressivo deterioramento muscolare e atrofia, derivante dall'assenza della proteina distrofina. Sono stati esplorati vari approcci terapeutici per ripristinare la funzionalità muscolare nei pazienti DMD; tuttavia, nessuno ha dimostrato la potenzialità di offrire un trattamento permanente. L'editing genetico CRISPR-Cas9 offre la possibilità di correggere in modo permanente le mutazioni alla base della malattia e ripristinare l'espressione della distrofina. Tuttavia, queste strategie di editing genetico sono specifiche per la mutazione, limitandone l'applicabilità a solo alcuni sottogruppi di pazienti DMD. L'utrofina, un paralogo della distrofina, è espressa a bassi livelli nei muscoli maturi, ma la sua sovraespressione potrebbe servire come una strategia terapeutica universale per tutti i pazienti DMD. Con questo studio, proponiamo di distruggere in maniera mirata i siti di legame dei miRNA nella regione 3' UTR del gene dell'utrofina utilizzando il base editing. I base editors sono strumenti avanzati di editing genomico che permettono una conversione irreversibile delle basi in siti specifici senza introdurre rotture a doppio filamento nel DNA. Distruggendo permanentemente i siti di legame dei miRNA dell'utrofina tramite base editing, impediremo il silenziamento translazionale dell'utrofina da parte dei miRNA, portando alla sovraespressione della proteina. Ci si aspetta che questa upregolazione dell'utrofina comporti miglioramenti funzionali nei cardiomiociti e nei miotubi umani di DMD, così come nei modelli murini di DMD con varie mutazioni nel gene della distrofina. I risultati di questo progetto stabiliranno una nuova strategia terapeutica permanente e universale per tutti i pazienti DMD.

141

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne and Becker muscular dystrophy

INVESTIGATING THE ROLE OF PERM1 IN TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF OXIDATIVE METABOLISM, IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY.

S. Gaino[1], G. Caretti[1], C. Bottino[1], F. Penna[2]

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]Torino, Università Di Torino

Project: GJC23072; Caretti Giuseppina, Penna Fabio

In patients affected by Duchenne dystrophy, the muscle displays a reduced mitochondria function. Studies in the mouse model of DMD indicate that restoration of mitochondrial metabolism improves the dystrophic muscle, and approaches aimed at correcting mitochondrial functions may represent an adjuvant therapy for Duchenne. We are studying a protein that decreases in Duchenne and that is involved in the expression of genes that enable proper mitochondrial function, the PERM1 protein. In particular, PERM1 performs its regulatory function through interactions with a well-known and important coactivator of mitochondrial genes, PGC-1α. Weare investigating their interaction in the nucleus, using microscopy techniques. We hypothesize that PERM1 and PGC-1α form domains where they reach a higher concentration compared to the rest of the nucleus, and that these nucleation points are particularly relevant for the activation of mitochondrial genes. We are using the mouse model of Duchenne dystrophy, the mdx mouse, to study the effect of PERM1 re-expression in muscle, and its impact on mitochondrial function. We also aim to employ immortalized cells derived from Duchenne patients to validate our results in a human model. We also propose to study the regions of the genome that are recognized by PERM1 and PGC-1α, to define the genes controlled by these two regulators.

Overall, this study aims to characterize the mechanisms by which PERM1 regulates mitochondrial function and its role in Duchenne dystrophy.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Diftrofia muscolare di Becker e Duchenne; distrofinopatie; DMD e DMB

STUDIO SUL RUOLO DELLA PROTEINA PERM1 NELLA REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DEL METABOLISMO OSSIDATIVO, NELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE.

Una delle caratteristiche del muscolo di pazienti affetti dalla distrofia di Duchenne è la ridotta funzionalità dei mitocondri. Studi nel modello in topo della distrofia di Duchenne indicano che il ripristino del metabolismo mitocondriale migliora il muscolo distrofico e si ritiene quindi che approcci volti a correggere la funzionalità mitocondriale possano essere una terapia adiuvante per la distrofia di Duchenne. In questo progetto proponiamo di studiare una proteina che è coinvolta nell'espressione di molti geni che permettono la corretta funzionalità mitocondriale, la proteina PERM1. In particolare, PERM1 svolge la sua funzione regolatrice attraverso l'interazione con un noto ed importante coattivatore dei geni del metabolismo mitocondriale, PGC-1α. Il nostro obiettivo è di studiare la loro interazione nel nucleo, utilizzando tecniche di microscopia volte a identificare regioni in cui queste proteine interagiscono. Ipotizziamo che PERM1 e PGC-1α formino dei domini in cui raggiungono un'alta concentrazione rispetto al resto del nucleo della cellula, e che questi punti di nucleazione siano particolarmente rilevanti per l'attivazione di geni mitocondriali. Utilizzeremo il modello murino della distrofia di Duchenne, il topo mdx, per studiare l'effetto di un recupero dei livelli di PERM1 nel muscolo, ed il suo impatto sul funzionamento del mitocondrio. In parallelo ci proponiamo di utilizzare anche cellule immortalizzate derivate da pazienti Duchenne, per validare i nostri risultati in un modello umano. Inoltre definiremo le regioni del genoma che sono riconosciute ed attivate da PERM1 e PGC-1α, per definire i geni controllati da questi due regolatori. Nel complesso, questo studio si propone di caratterizzare i meccanismi attraverso cui PERM1 regola il funzionamento del mitocondrio, ed il suo ruolo nella distrofia di Duchenne.

142

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne and Becker muscular dystrophy

Fear of Falling in muscular dystrophy: investigation of the phenomenon and a multidisciplinary rehabilitation approach to treat it

E. Evangelista[1], V. Varalta[1], A. Picelli[1], N. Smania[2], C. Fonte[2], A. Modenese[2], M. Filippetti[1], A. Righetti[1], D. De Grandis[3], B. Denti[3]

[1]Verona, Università Di Verona
[2]Verona, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona
[3]Verona, Fondazione Speranza Onlus

Project: GUP24007; Varalta Valentina, Smania Nicola, De Grandis Domenico

Muscular dystrophy is a progressive condition that leads to motor disability, particularly affecting walking and balance. As a result of these impairments, patients may experience fear of falling, a specific psychological aspect that further reduces autonomy and quality of life. The phenomenon of fear of falling in muscular dystrophy is still poorly investigated, and the literature does not propose specific rehabilitative interventions for its treatment. The main goal of this study is to increase understanding of the phenomenon of fear of falling in patients with muscular dystrophy. Specifically, the study plans two distinct work packages: one aimed at investigating the prevalence and motor, psychological, cognitive, and disability correlations of the disorder (WP1); the other aimed at evaluating the potential effects of a multidisciplinary rehabilitation approach involving the interaction of physicians, physiotherapists, and psychologists (WP2). This study will include patients (age >16 years) with muscular dystrophy accessing the UILDM service in Verona. To address the objective of WP1, all included patients will be assessed for the presence of fear of falling, motor and cognitive functionality, psychological and personality aspects, and degree of disability. Patients exhibiting fear of falling will be randomized into two groups (control group: motor rehabilitation; experimental group: motor rehabilitation and cognitive-behavioral therapy). This study aims to enroll approximately 100 subjects and detect fear of falling in more than half of the sample. Additionally, it is expected that a multidisciplinary approach to treating the disorder may determine more significant benefits in terms of motor functionality and reduction of disability in patients with muscular dystrophy.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Diftrofia muscolare di Becker e Duchenne; distrofinopatie; DMD e DMB;

LA PAURA DI CADERE NELLA DISTROFIA MUSCOLARE. INDAGINE DEL FENOMENO E APPROCCIO RIABILITATIVO MULTIDISCIPLINARE PER IL TRATTAMENTO.

La distrofia muscolare è una condizione progressiva che, influenzando negativamente la deambulazione e l'equilibrio, conduce ad importante disabilità motoria. A causa di queste compromissioni, i pazienti possono sperimentare la paura di cadere, un aspetto psicologico specifico che riduce ulteriormente l'autonomia e la qualità della vita. Il fenomeno della paura di cadere nella distrofia muscolare è ancora poco studiato, e la letteratura non propone interventi riabilitativi specifici per il suo trattamento. L'obiettivo principale di questo studio è approfondire la comprensione del fenomeno della paura di cadere nei pazienti con distrofia muscolare. In particolare, lo studio prevede due distinti work packages: il primo finalizzato a indagare la prevalenza e i correlati motori, psicologici, cognitivi e di disabilità del disturbo (WP1); l'altro mirato a valutare i potenziali effetti di un approccio riabilitativo multidisciplinare che coinvolge l'interazione di medici, fisioterapisti e psicologi (WP2). Lo studio includerà pazienti (età >16 anni) con distrofia muscolare che accedono al servizio UILDM di Verona. Per raggiungere l'obiettivo del WP1, tutti i pazienti inclusi saranno sottoposti ad una valutazione della paura di cadere, della funzionalità motoria e cognitiva, degli aspetti psicologici e di personalità, e del grado di disabilità. I pazienti che manifestano paura di cadere saranno poi randomizzati in due gruppi (gruppo di controllo: riabilitazione motoria; gruppo sperimentale: riabilitazione motoria e terapia cognitivo-comportamentale). Lo studio mira ad arruolare circa 100 soggetti e a rilevare la paura di cadere in più della metà del campione. Inoltre, si prevede che un approccio multidisciplinare al trattamento del disturbo possa determinare benefici più significativi in termini di funzionalità motoria e riduzione della disabilità nei pazienti con distrofia muscolare.

143

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne and Becker muscular dystrophy

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

Previtali Stefano[1]

[1]*Milano, Università Vita Salute San Raffaele*

Project: GUP21006; Previtali Stefano, Ferlini Alessandra, Comi Giacomo, Masson Riccardo, Albamonte Emilio, Ricci Federica, Fiorillo Chiara, Nigro Vincenzo, Pane Marika, D'Amico Adele, Messina Sonia, Pini Antonella, D'Angelo Maria Grazia, Pegoraro Elena, Astrea Guja

Broad objectives and specific aims To characterize the clinical phenotype and possible predictive/prognostic factors of patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) due to duplication of exon 2 (Dup2). Specifically, we aim 1) to describe the progression of motor, respiratory and cardiac function; 2) to enquire if the phenotypic spectrum of Dup2 is milder than classic DMD, 3) to perform whole genome sequencing (WGS) to characterize DNA breakpoints to correlate with the phenotype; 4) to collect material for future proteomic/transcriptomic studies. Background/Rationale DMD is caused by mutations in the DMD gene and in 11% of cases is due to duplications. The most promising therapeutic approaches include mutation-specific therapies. Notably, there is increasing evidence that specific groups of mutations may underlie different disease trajectories compared to the "average" DMD population. It is thus mandatory to have more information on genotype-phenotype correlations and patterns of progression related to different genotypes. Dup2 is the most common DMD duplication and the only one for which a AAV-mediated exon skipping study is ongoing. Despite most case series and databases ascribe Dup2 to severe phenotype, our preliminary findings sustain that these patients have collectively a milder progression of the disease and in 1/3 of cases a significantly milder phenotype. Moreover, our attempts to reveal mechanism involved in attenuating the phenotype would confute the hypothesis of alternative spicing transcripts as previously described for DMD with deletion of exon 2. Results We evaluated 25 italian patients with Dup2, with a media age at first visit of 10.6 years. 50% of patients were ambulant and had an estimated age at loss of ambulation of 14 years, 4 patients were ambulant >14 years old. 8 patients were classified ad intermediate forms, based on clinical functions, and 2 as Becker disease. WGS studies showed that duplication was observed in tandem for all except

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Diftrofia muscolare di Becker e Duchenne; distrofinopatie; DMD e DMB;

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DI PAZIENTI CON DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE CAUSATA DA DUPLICAZIONE DELL'ESONE 2 ED IDENTIFICAZIONE DI FATTORI PREDITTIVI E PROGNOSTICI

Obiettivi generali e specifici Caratterizzare il fenotipo clinico e i possibili fattori predittivi/prognostici dei pazienti con distrofia muscolare di Duchenne (DMD) dovuta alla duplicazione dell'esone 2 (Dup2). In particolare, miriamo a 1) descrivere la progressione della funzione motoria, respiratoria e cardiaca; 2) indagare se lo spettro fenotipico di Dup2 è più lieve del DMD classico; 3) eseguire il sequenziamento del genoma completo (WGS) per caratterizzare i punti di rottura del DNA correlati-va mente al fenotipo; 4) raccogliere materiale per futuri studi proteomici/trascrittomici. Contesto/giustificazione La DMD è causata da mutazioni nel gene della DMD e nel l'11% dei casi è dovuta a duplicazioni. Gli approcci terapeutici più promettenti comprendono le terapie specifiche per mutazioni. In particolare, vi sono sempre più prove che gruppi specifici di mutazioni possono essere alla base di traiettorie di malattia diverse rispetto alla popolazione "media" di DMD. Risulta quindi obbligatorio disporre di maggiori informazioni sulle correlazioni genotipo-fenotipo e sui modelli di progressione relativi ai diversi genotipi. Dup2 è la più comune duplicazione di DMD e l'unico per il quale è in corso uno studio di saltaexon mediato da AAV. Nonostante la maggior parte delle serie di casi e dei database attribuiscano Dup2 a fenotipo grave, i nostri risultati preliminari sostengono che questi pazienti hanno collettivamente una progressione più lieve della malattia e in 1/3 dei casi un fenotipo significativamente più lieve. Inoltre, i nostri tentativi di rivelare il meccanismo coinvolto nell'attenuazione del fenotipo confuterebbe l'ipotesi di trascrizioni alternative di spicing come precedentemente descritto per DMD con delezione dell'esone 2. Risultati Abbiamo valutato 25 pazienti italiani con Dup2, con un'età media alla prima visita di 10,6 anni. 50% dei pazienti erano ambulatoriali e avevano un'età stimata a perdita di deambulazione di 14 anni, 4 pazienti erano ambulat

144

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne muscular dystrophy

DELIVERY OF CYTOPLASMIC HISTONE DEACETYLASE 4 TO TREAT DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Moresi Viviana[1], **A. Renzini**[2], **G. Cavioli**[2], **A. Cedola**[1], **D. Coletti**[2]

[1]*Roma, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche*
[2]*Roma, Università Di Roma La Sapienza*

Project: GMR23T2003; Moresi Viviana

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic, progressive disease characterized by muscle degeneration and weakness. With the aim to develop novel treatments to ameliorate the muscle status and the burden of the disease, we study the effects of delivering the cytoplasmic form of Histone deacetylase 4 (HDAC4). We have already characterized the harmful consequences of HDAC4 deletion in skeletal muscle of a murine model of DMD, i.e. mdx mice, showing how important is preserving HDAC4 functions in dystrophic skeletal muscles. We now demonstrate that delivery of the DNA encoding a mutant form of HDAC4 restricted to the cytoplasm (HDAC4 L175A) ameliorates numerous features of DMD, such as muscle necrosis, intramuscular infiltration of fibrotic and adipose tissues, muscle regeneration, the membrane repair response and muscle performance of mdx mice. These protective effects, seen at two weeks following DNA delivery, are confirmed in two different mdx muscles, i.e. gastrocnemius and triceps brachii, and persist after four weeks. HDAC4 deacetylase activity is likely not involved in the observed amelioration of the DMD phenotype, since a mutant form with two mutations in the HDAC4 L175A enzymatic pocket still mimics the beneficial effects of HDAC4 L175A. As for the mechanism, an interactome analysis revealed three putative HDAC4 L175A partners that may be involved in ameliorating

the dystrophic phenotype. Ongoing spatial transcriptomics and proteomics analyses will identify the signaling underpinning the HDAC4 L175A dependent rescue of the dystrophic phenotype, providing new potential targets for pharmacological interventions to treat DMD. Overall, our study will define whether the delivery of cytoplasmic HDAC4 is a tool for treating DMD, providing both genetic and pharmacological targets to be potentially exploited for a treatment of muscular dystrophy.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Distrofia Muscolare di Duchenne; Distrofinopatia grave, tipo Duchenne; DMD

AUMENTO DELLA PRODUZIONE DELL'ISTONE DEACETILASI 4 CITOPLASMATICA PER IL TRATTAMENTO DELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia genetica progressiva caratterizzata da degenerazione e debolezza muscolare. Con l'obiettivo di sviluppare nuovi trattamenti per migliorare lo stato muscolare, studiamo gli effetti della sovraproduzione della forma citoplasmatica dell'istone deacetilasi 4 (HDAC4). Abbiamo già caratterizzato le conseguenze dannose dell'eliminazione dell'HDAC4 nel muscolo scheletrico di un modello murino di DMD, ovvero i topi mdx, mostrando quanto sia importante preservare le sue funzioni nei muscoli scheletrici distrofici. Ora dimostriamo che aumentando la produzione di HDAC4 limitato al citoplasma (HDAC4 L175A), apportando del DNA dentro i muscoli di topi mdx, miglioriamo numerose caratteristiche della DMD, come la necrosi muscolare, l'accumulo intramuscolare di tessuto fibrotico e adiposo, la rigenerazione muscolare, la risposta di riparazione della membrana e la funzionalità muscolare. Questi effetti protettivi sono confermati in due diversi muscoli dei topi mdx, e persistono dopo due e quattro settimane dal trattamento. L'attività deacetilasica dell'HDAC4 probabilmente non è coinvolta nel miglioramento osservato del fenotipo DMD, poiché una forma mutata con due mutazioni nella tasca enzimatica dell'HDAC4 L175A imita ancora gli effetti benefici di HDAC4 L175A. Per quanto riguarda il meccanismo, un'analisi di interattoma ha rivelato tre presunti partner di HDAC4 L175A che potrebbero essere coinvolti nel miglioramento del fenotipo distrofico. Le analisi in corso di trascrittomica spaziale e proteomica identificheranno le vie di segnalazione alla base del miglioramento dipendente da HDAC4 L175A del fenotipo distrofico, fornendo nuovi potenziali bersagli per il trattamento della DMD. Nel complesso, il nostro studio definirà se la sovraproduzione di HDAC4 citoplasmatico è uno strumento per il trattamento della DMD, fornendo sia bersagli genetici che farmacologici da sfruttare potenzialmente per migliorare la distrofia muscolare.

145

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Duchenne muscular dystrophy

THE SIRTUIN 6-THYROID HORMONE CROSS TALK REGULATES THE SATELLITE CELLS ACTIVATION IN THE DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

Dentice Monica[1],

[1]*Napoli, Università Di Napoli Federico II*

Project: GMR22T1020; Dentice Monica

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an inherited disease characterized by progressive skeletal muscle weakness and degeneration. Currently, there is no cure, so the identification of novel therapeutic targets is urgently needed. Thyroid hormones (THs) are master regulators of muscle homeostasis and alterations in thyroid status lead to thyroid myopathies. The intracellular activation of THs by the type 2 deiodinase enzyme (D2) augments TH action during muscle regeneration and loss of D2 worsens muscle pathologies such as DMD. Sirtuins are NAD-dependent histone/protein deacetylase playing roles in diverse cellular processes. In skeletal muscle, SIRT6 altered expression results in deregulation of myogenic factors. Our preliminary data indicate that SIRT6 expression is enhanced in muscles of DMD patients and, notably inversely correlates with D2 expression. Our working hypothesis is that, during DMD, enhanced expression of SIRT6 suppresses D2, thus inhibiting the surge of TH signal that is required for proper muscle regeneration. Thus, blocking SIRT6 in DMD could improve the regeneration ability of dystrophic muscles. Using genetically manipulated mouse models of altered SIRT6 expression and patient-derived cells and tissues, we aim to dissect the interplay between SIRT6 and TH signal in the myogenic program and the consequences of SIRT6 up-regulation in the pathogenesis of DMD. We observed that pharmacological inhibition of SIRT6 results in enhanced TH signaling in muscle cells in vitro and enriched expression of myogenic markers. Moreover, in vivo, upon cardiotoxin-induced muscle damage, the SIRT6 inhibition reduced the muscle degradation and protected muscle fibers by loss of satellite cells. These data point to a critical role of the SIRT6-TH axis in regulating the amplification of satellite cells and suggest to explore the therapeutic potential of SIRT6 inhibitors to enhance the TH signature at a specific muscle level.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Distrofia Muscolare di Duchenne; Distrofinopatia grave, tipo Duchenne; DMD

IL CROSS TALK ORMONE TIROIDEO-SIRTUINA 6 REGOLA L'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE SATELLITI NELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia ereditaria caratterizzata da progressiva debolezza e degenerazione dei muscoli scheletrici. Gli ormoni tiroidei (OT) sono i principali regolatori dell'omeostasi muscolare e le alterazioni dello stato tiroideo portano a miopatie tiroidee. L'attivazione intracellulare degli OT da parte dell'enzima deiodinasi di tipo 2 (D2) aumenta l'azione degli OT durante la rigenerazione muscolare e la perdita di D2 peggiora patologie muscolari come la DMD. Le sirtuine sono deacetilasi istoniche NAD-dipendenti che svolgono ruoli in diversi processi cellulari. I nostri dati preliminari indicano che l'espressione di SIRT6 è aumentata nei muscoli dei pazienti con DMD e, in particolare, è inversamente correlata con l'espressione di D2. La nostra ipotesi di lavoro è che, durante la DMD, l'aumentata espressione di SIRT6 sopprima D2, inibendo così l'aumento del segnale degli OT necessario per una corretta rigenerazione muscolare. Pertanto, il blocco di SIRT6 nella DMD potrebbe migliorare la capacità di rigenerazione dei muscoli distrofici. Utilizzando modelli murini con espressione alterata di SIRT6 e cellule e tessuti derivati dal paziente, miriamo ad analizzare l'interazione tra SIRT6 e gli OT nel programma miogenico e le conseguenze della sovraregolazione di SIRT6 nella patogenesi della DMD. Abbiamo osservato che l'inibizione farmacologica di SIRT6 determina un potenziamento della segnalazione del TH nelle cellule muscolari in vitro e un'espressione arricchita di marcatori miogenici. Inoltre, in vivo, in seguito al danno muscolare indotto dalla cardiotossina, l'inibizione di SIRT6 ha ridotto la degradazione muscolare e protetto le fibre muscolari mediante la perdita di cellule satellite. Questi

dati indicano un ruolo critico dell'asse SIRT6-OT nella regolazione dell'amplificazione delle cellule satellite e suggeriscono di esplorare il potenziale terapeutico degli inibitori SIRT6 per migliorare i livelli di OT a livello muscolare.

146

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Emery-Dreifuss muscular dystrophy

MLIP DYSREGULATION AFFECTS CHROMATIN ORGANIZATION AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION DURING MUSCULAR DIFFERENTIATION.

Ferrari Francesco[1], V. Rosti[2], G. Lembo[1], A. Nicolosi[2], A. Aghajani[1] S. Cervone[2], G. Poma[3], C. Lanzuolo[2]

[1]Milano, IFOM ETS - Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare
[2]Milano, Fondazione Istituto Nazionale Di Genetica Molecolare (Ingm)
[3]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GJC21144; Lanzuolo Chiara, Ferrari Francesco

Emery Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) is a rare genetic disease caused by mutations in genes encoding for nuclear envelope or lamina components. Despite the variety of mutations, the EDMD phenotype always involves skeletal and/or cardiac muscles dysfunctions. The disruption of the nuclear lamina structure is expected to result in a cascade of molecular alterations involving: nuclear shape, chromatin 3D architecture, epigenetic and transcriptional regulation. 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 investigated MLIP molecular function in the epigenetic and transcriptional regulation of muscle cells differentiation. We used multiple complementary cellular models of myoblasts differentiation with perturbation of MLIP. We applied epigenomics and transcriptomics techniques to dissect the cascade of molecular effects of MLIP dysregulation. We also leveraged a novel technique to reconstruct chromatin compartmentalization based on our recently published 4f-SAMMY-seq method. We identified epigenetic and transcriptional alterations on pathways normally involved in the differentiation of muscle cells. We found that MLIP dysfunction can delay the normal kinetic of differentiation, slowing down the achievement of terminal differentiation. We also observed that even a temporary perturbation can induce a lasting effect on the differentiation trajectory. It can be postulated that a disturbance of the differentiation process of muscle cells may impair the normal repair of muscle fibers after damages in vivo. However, further dedicated studies will be required to understand the in vivo effects of these molecular perturbations in terms of skeletal muscle fibers functionality or response to damages.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss; EDMD; Emerinopatia;

LA DISREGOLAZIONE DI MLIP INFLUENZA L'ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA E LA REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DURANTE LA DIFFERENZIAZIONE MUSCOLARE.

La distrofia muscolare di Emery Dreifuss (EDMD) è una malattia genetica rara causata da mutazioni nei geni che codificano per componenti dell'involucro nucleare o della lamina. Nonostante la varietà di mutazioni, il fenotipo EDMD comporta sempre disfunzioni dei muscoli scheletrici e/o cardiaci. Si prevede che l'alterazione strutturale della lamina nucleare determini una cascata di eventi molecolari che coinvolgono: forma nucleare, architettura 3D della cromatina, regolazione epigenetica e trascrizionale. In questo contesto, la proteina interagente con la LMNA muscolare (MLIP) è una proteina con funzione ampiamente sconosciuta (Tdark) ma collegata all'EDMD, con una probabile associazione ai componenti della lamina nucleare e possibilmente coinvolta nella regolazione genica. In questo studio abbiamo esaminato la funzione molecolare della MLIP nella regolazione epigenetica e trascrizionale della differenziazione delle cellule muscolari. E' stata utilizzata una varieta' di modelli cellulari tra loro complementari di differenziazione dei mioblasti con perturbazione del gene MLIP. Abbiamo applicato tecniche di epigenomica e trascrittomica per analizzare la cascata di effetti molecolari della disregolazione MLIP. Abbiamo anche sfruttato una nuova tecnica per ricostruire la compartimentazione della cromatina basata sul nostro metodo 4f-SAMMY-seq recentemente pubblicato. I risultati hanno identificato alterazioni epigenetiche e trascrizionali su percorsi normalmente coinvolti nella differenziazione delle cellule muscolari. Si e' scoperto che la disfunzione MLIP può ritardare la normale cinetica di differenziazione, rallentando il raggiungimento della differenziazione terminale. Abbiamo anche osservato che pure una perturbazione temporanea può indurre un effetto duraturo sulla traiettoria di differenziazione. Si può ipotizzare che una perturbazione del processo di differenziazione delle cellule muscolari possa compromettere la normale riparazione delle fibre muscolari.

147

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Facioscapulohumeral dystrophy

UNDERSTANDING AND TREATING INFLAMMATION IN FSHD MUSCULAR DYSTROPHY

Gabellini Davide[1]

[1]Milano, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GMR23T1035; Gabellini Davide

FSHD muscular dystrophy, one of the most prevalent neuromuscular diseases, is caused by aberrant expression of the transcription factor DUX4. Despite the recognition that muscle inflammation is a prominent feature of FSHD, the underlying molecular mechanism remains poorly understood. Current research has largely overlooked the specific inflammatory processes in FSHD, particularly how inflammation may directly contribute to disease progression rather than serving merely as a byproduct of muscle degeneration, as observed in other muscular dystrophies. This is a critical gap, as understanding the inflammatory mechanism in FSHD could lead to the development of targeted therapeutic interventions. We employed a combination of DUX4 manipulation in vitro and in vivo, single-nucleus RNA sequencing, and detailed cellular characterizations to investigate the inflammatory processes associated with FSHD. Our findings reveal that DUX4 activates endogenous retroviruses and other repetitive sequences, resulting in the accumulation of double-stranded RNA and the induction of a "viral mimicry" state, which includes the activation of key inflammatory mediators such as IFN-γ, STAT-1, STAT-3, and IL-6 in primary muscle cells from FSHD patients and in muscles of the FSHD

mouse model. This is further associated with the expansion of fibro-adipogenic progenitors (FAPs) and their transition to a pro-fibrotic phenotype. Notably, we demonstrate that IFN-γ treatment alone is sufficient to activate this pathway, while neutralization of IFN-γ significantly reduces inflammation, decreases FAP accumulation, and preserves muscle tissue in the FSHD mouse model. Collectively, our results indicate that DUX4 directly activates a pro-inflammatory pathway that contributes to muscle wasting in FSHD. This work not only provides insights into the pathogenesis of FSHD but also highlights the potential for targeted therapeutic strategies to mitigate inflammation and preserve muscle integrity in FSHD patients.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Distrofia Facio-scapolo-omerale; FSHD; Distrofia FSH; Distrofia muscolare facio-scapolo-omerale; Miopatia facio-scapolo-omerale; Miopatia di Landouzy-Dejerine

COMPRENSIONE E TRATTAMENTO DELL'INFIAMMAZIONE NELLA DISTROFIA MUSCOLARE FSHD

La distrofia muscolare FSHD, una delle malattie neuromuscolari più diffuse, è causata dall'espressione aberrante del fattore di trascrizione DUX4. Nonostante sia riconosciuto che l'infiammazione muscolare sia una caratteristica importante della FSHD, il meccanismo molecolare sottostante rimane poco compreso. La ricerca attuale ha ampiamente trascurato i processi infiammatori specifici nella FSHD, in particolare il modo in cui l'infiammazione può contribuire direttamente alla progressione della malattia piuttosto che servire semplicemente come sottoprodotto della degenerazione muscolare, come osservato in altre distrofie muscolari. Si tratta di una lacuna critica, poiché la comprensione del meccanismo infiammatorio nella FSHD potrebbe portare allo sviluppo di interventi terapeutici mirati. I nostri risultati rivelano che DUX4 attiva retrovirus endogeni e altre sequenze ripetute, determinando l'accumulo di RNA a doppio elica e l'induzione di uno stato di "viral mimicry", che include l'attivazione di mediatori infiammatori chiave come IFN-γ, STAT-1 , STAT-3 e IL-6 nelle cellule muscolari primarie di pazienti con FSHD e nei muscoli del modello murino di FSHD. Ciò è ulteriormente associato all'espansione dei progenitori fibro-adipogenici (FAPs) e alla loro transizione verso un fenotipo pro-fibrotico. In particolare, dimostriamo che il trattamento con IFN-γ da solo è sufficiente per attivare questo processo, mentre la neutralizzazione dell'IFN-γ riduce significativamente l'infiammazione, diminuisce l'accumulo di FAPs e preserva il tessuto muscolare nel modello murino FSHD. Collettivamente, i nostri risultati indicano che DUX4 attiva direttamente un processo proinfiammatorio che contribuisce alla perdita di tessuto muscolare nella FSHD. Questo lavoro non solo chiarisce la patogenesi della FSHD, ma evidenzia anche il potenziale di strategie terapeutiche mirate a mitigare l'infiammazione e preservare l'integrità muscolare nei pazienti con FSHD.

148

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Facioscapulohumeral dystrophy

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF FRG2 GENE FAMILY IN THE FRAMEWORK OF FHSD

Salsi Valentina[1], R. Tupler[1], F. Losi[1], B. Fosso[2], M. Chiara[3], M. Ferrarini[4]

[1]Modena, Università Di Modena E Reggio Emilia
[2]Bari, Università Degli Studi Di Bari Aldo Moro
[3]Modena, Università Degli Studi Di Milano Statale
[4]Modena, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Di Modena"

Project: GJC23060; Tupler Rossella Ginevra, Chiara Matteo

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is a common hereditary myopathy linked to a reduced copy number of the D4Z4 macrosatellite on chromosome 4q35. The deletion of D4Z4 repeats leads to the aberrant expression of nearby 4q35 genes, contributing to disease. Among these genes, FSHD Region Gene 2 A (FRG2A) is selectively overexpressed in FSHD muscles in an inverse correlation with D4Z4 repeat number and is stabilized upon genotoxic stress. Beside the copy on chr.4, 14 FRG2 paralogs are dispersed throughout the human genome, 4 with protein-coding potential and 10 annotated as pseudogenes. RNAs from the various FRG2 paralogs are differentially expressed in a tissue- and subject-specific manner in both FSHD and control samples. Our work demonstrates that FRG2A is a heterochromatin-associated long non-coding RNA (lncRNA), not a protein-coding gene as predicted. By a multi-omics strategy, we identified thousands of FRG2A target sites genome-wide and revealed its trans-association with centromeres and rDNA arrays on the short arms of acrocentric chromosomes. Moreover, transcripts from various FRG2 paralogs, both coding and non-coding, co-localize in the same trans-acting complexes. By employing targeted CRISPR-Cas9 editing, RNA fractionation, and ChRIP, we established that FRG2A and its paralogs constitute a family of heterochromatin-associated lncRNAs. Consistent with their genomic localization, FRG2A transcripts accumulate in the nucleolus in the compartment responsible for rDNA transcription and early pre-rRNA processing. FSHD cells display a significant impairment in pre-rDNA transcription and reduced protein synthesis, both of which are restored upon FRG2A silencing. These findings highlight the long-range effects of elevated FRG2A expression and open new avenues for understanding the molecular mechanisms underlying FSHD pathogenesis

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Distrofia Facio-scapolo-omerale; FSHD; Distrofia FSH; Distrofia muscolare facio-scapolo-omerale; Miopatia facio-scapolo-omerale; Miopatia di Landouzy-Dejerine

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DELLA FAMIGLIA GENICA FRG2 NEL CONTESTO DELLA FSHD

La distrofia muscolare facioscapolomerale (FSHD) è una malattia genetica caratterizzata da una riduzione del numero di copie delle ripetizioni D4Z4 sul cromosoma 4q35. Questa riduzione porta a un'attivazione anomala dei geni localizzati nella regione, la cui deregolazione correla con lo sviluppo della malattia. Tra questi, il gene FRG2A (FSHD Region Gene 2 A) risulta sovraespresso nei muscoli di pazienti con FSHD, con livelli inversamente correlati al numero di ripetizioni D4Z4, e il suo trascritto è stabilizzato in condizioni di stress genotossico. Oltre alla copia presente su chr 4, il genoma umano contiene altri 14 paraloghi di FRG2: 4 annotati come codificanti e 10 come pseudogeni. Gli RNA derivati da questi paraloghi sono differenzialmente espressi a seconda del tessuto e del soggetto, sia nei pazienti con FSHD che nei controlli. Il nostro studio dimostra che FRG2A non codifica una proteina, come precedentemente ipotizzato, ma è un RNA non codificante (lncRNA). Grazie a un approccio multi-omico, abbiamo identificato migliaia di siti target di FRG2A nel genoma umano rappresentati dai centromeri e dagli array del DNA ribosomale (rDNA) sui bracci corti dei cromosomi acrocentrici. Inoltre, abbiamo osservato che i trascritti di vari paraloghi di FRG2, codificanti e non codificanti, interagiscono tra di loro formando

un complesso. Utilizzando CRISPR-Cas9, frazionamento dell'RNA e ChRIP, abbiamo dimostrato che FRG2A e i suoi paraloghi rappresentano una famiglia di lncRNA associati a eterocromatina. Coerentemente con la loro associazione genomica, i trascritti di FRG2A si accumulano nel nucleolo, nel comparto deputato alla trascrizione del rDNA e delle prime fasi della ribogenesi e causano un deficit nella trascrizione del rDNA e una ridotta capacità di sintesi proteica. Questi risultati evidenziano gli effetti in trans della sovraespressione di FRG2A, aprendo nuove prospettive per esplorare i meccanismi molecolari alla base della FSHD.

149

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies

Sarcoglycanopathy

CORRECTING FOLDING DEFECTIVE ?-SARCOGLYCAN TO RESTORE MYOGENIC CELL FUNCTION IN LGMDR3 DIAPHRAGM 3D MODELS

Benetollo Alberto[1], E. Maghin[2], M. Scano[1], P. Caccin[1], M. Piccoli[2], D. Sandonà[1]

[1]Padova, Università Di Padova
[2]Padova, Istituto Di Ricerca Pediatrica Città Della Speranza (Irp)

Project: GGP20097; Sandonà Dorianna

The main aim of this project is to model 3D muscle structures that mimic sarcoglycanopathy (LGMDR3). The generation of these artificial pathological muscles addresses the need for versatile tools to test potential drug efficacy, overcoming the limitations of underperforming animal models. Additionally, this approach could lay the groundwork for future personalized medicine experiments. Our strategy is based on the engraftment of a decellularized extracellular matrix (ECM) by immortalized myogenic cells. Initial experiments assessed proliferation and myogenic index of two cell lines, revealing that both the healthy cells and the dystrophic ones, carrying the L31P/V247M mutations, exhibited myogenic properties and robust proliferation. We successfully accomplished the re-cellularization of the ECM with healthy cells, while LGMDR3 cells failed to colonize the scaffold. We observed a lower cell density and poor scaffold penetration. Thus, we asked whether if the alpha-SG mutations may have a role in this behavior possibly through the involvement of the cadherin-like domain of the protein. We hypothesized that the mutations, affecting protein folding, impair alpha-SG interaction with ECM, limiting cell migration and matrix penetration. To investigate this, we analyzed LGMDR3 cells for attachment and detachment. Alpha-SG was present in both healthy and LGMDR3 myoblasts, but reduced in the latter due to the problem of folding. LGMDR3 cells detached more easily from EDTA-treated substrates, suggesting an altered docking, and also showed reduced adhesion to some collagen and laminin peptides. A short treatment with C17 slightly improved migration and restored detachment resistance of LGMDR3 myogenic cells, while long-term C17 treatment improved alpha-SG membrane localization and myotubes organization. The experiments assessing the C17 effect on LGMDR3 cell engraftment and differentiation on decellularized ECM are ongoing.

Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Sarcoglicanopatia; alterazioni qualitative e/o quantitative dei sarcoglicani;

CORREGGERE L'?-SARCOGLICANO DIFETTIVO NEL FOLDING PER RIPRISTINARE LA FUNZIONALITÀ DI CELLULE MIOGENICHE IN MODELLI 3D DI DIAFRAMMA DI LGMDR3

L'obiettivo principale di questo progetto è modellare strutture muscolari 3D che mimino la sarcoglicanopatia (LGMDR3). Questi muscoli patologici artificiali rispondono alla necessità di strumenti versatili per testare l'efficacia dei farmaci, superando le limitazioni dei modelli animali poco performanti. Inoltre, questo approccio potrebbe gettare le basi per futuri esperimenti di medicina personalizzata. La nostra strategia si basa sull'innesto di cellule miogeniche immortalizzate in una matrice extracellulare (ECM) decellularizzata. I primi esperimenti hanno valutato la proliferazione e l'indice miogenico di due linee cellulari, mostrando che sia le cellule sane che quelle distrofiche con mutazioni L31P/V247M presentavano proprietà miogeniche e robusta proliferazione. Abbiamo completato con successo la recellularizzazione dell'ECM con cellule sane, mentre le cellule LGMDR3 non sono riuscite a colonizzare il supporto, mostrando una densità cellulare inferiore e scarsa penetrazione. Ci siamo chiesti se le mutazioni di alpha-SG potessero influenzare questo comportamento, possibilmente attraverso il coinvolgimento del dominio cadherine-like, ipotizzando che compromettano l'interazione con l'ECM e limitino la migrazione cellulare. Abbiamo analizzato le cellule LGMDR3 per l'adesione e il distacco. Alpha-SG era presente in entrambe le linee cellulari, ma ridotto nelle cellule LGMDR3 a causa del ripiegamento anomalo. Queste cellule si staccavano più facilmente dai substrati trattati con EDTA e mostravano ridotta adesione a peptidi di collagene e laminina. Un breve trattamento con C17 ha leggermente migliorato la migrazione e ripristinato la resistenza al distacco delle cellule miogeniche LGMDR3, mentre un trattamento a lungo termine ha migliorato la localizzazione della membrana di alpha-SG e l'organizzazione dei miotubi. Gli esperimenti sull'effetto di C17 sull'innesto e sulla differenziazione delle cellule LGMDR3 su ECM decellularizzata sono in corso.

150

Genetic muscular disease/Myotonic disorders

Myotonic Dystrophy type 2

LOCOMOTOR DEFECTS IN TYPE 2 MYOTONIC DYSTROPHY (DM2) ARE LINKED TO CNBP-DEPENDENT INCREASE OF AUTOPHAGIC FLUX

Marzullo Marta[1], R. D'Amico[2], M. Terribili[2], S. Coni[2], R. Bordone[2], A. Lobina[2], L. Madaro[2], L. Ciapponi[2], G. Canettieri[2]

[1]Rome, Istituto di Biologia e Patologie molecolari (IBPM), CNR
[2]Rome, Università Di Roma La Sapienza

Project: GMR22T1027; Canettieri Gianluca

Myotonic Dystrophy Type 2 (DM2) is a genetic multisystemic disease primarily affecting skeletal muscle, caused by the expansion of CCTG repeats in the first intron of the CNBP gene. The contribution to the dystrophic phenotype of either CNBP loss of function or accumulation of repeated toxic RNA/peptides remains to be elucidated. We show here that CCTG expansion correlates with reduced CNBP expression in both DM2 patient-derived cells and a Drosophila DM2 model. The ablation of CNBP from Drosophila muscle tissues causes severe locomotor defects, which can be fully rescued upon reconstitution with either Drosophila or human CNBP. Consistently, we found that heterozygous CNBP-KO mice exhibit muscle atrophy and late onset movement deficits. CNBP silencing also impairs the differentiation of mouse muscle cells

and is associated with reduced expression of myogenic markers. Transcriptomic and KEGG pathway analyses on CNBP-depleted mouse myoblasts revealed significant alterations in the PI3K/Akt/mTOR (PAM) pathway. Remarkably, upon CNBP depletion, we observed decreased activation of the PAM pathway, associated to enhanced autophagic flux in muscle cells, along with significant changes in key autophagy markers in both mammalian and Drosophila DM2 models. Inhibition of autophagy via RNAi-mediated silencing of atg7 successfully rescued the locomotor defect in DM2 flies, suggesting that autophagy inhibition could be a potential therapeutic target for treating DM2. Intriguingly, we found that muscle specific CNBP depletion in flies causes neuromuscular junction (NMJ) defects, characterized by reductions in both pre- and post-synaptic markers, suggesting that the observed molecular defects may drive non-cell-autonomous alterations in the NMJ, contributing to the dystrophic phenotype. Together, these data illustrate an unprecedented mechanism of autophagy misregulation in DM2, which may contribute to muscle dysfunction, one of the most debilitating symptoms in DM2 patients.

Malattie genetiche muscolari/Miotonie

Distrofia Miotonica di tipo 2

I DIFETTI LOCOMOTORI NELLA DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 2 (DM2) SONO ASSOCIATI A UN AUMENTO DEL FLUSSO AUTOFAGICO MEDIATO DA CNBP

La Distrofia Miotonica di tipo 2 (DM2) è una malattia genetica multisistemica che colpisce principalmente i muscoli scheletrici, è causata dall'espansione di ripetizioni CCTG nel primo introne del gene CNBP. Rimane da chiarire se il fenotipo distrofico è causato dalla perdita di funzione di CNBP o dall'accumulo di RNA/peptidi tossici. In questo studio, abbiamo dimostrato che l'espansione delle ripetizioni CCTG è associata a una ridotta espressione di CNBP sia in cellule derivate da pazienti DM2 sia in un modello DM2 di Drosophila. La riduzione di CNBP nei tessuti muscolari dei moscerini causa gravi difetti locomotori, che possono essere completamente recuperati reintroducendo CNBP di Drosophila o umano. Analogamente, i topi eterozigoti CNBP-KO mostrano atrofia muscolare e deficit motori a esordio tardivo. Inoltre, il silenziamento di CNBP compromette la differenziazione delle cellule muscolari murine e riduce l'espressione di marcatori miogenici. Analisi trascrittomiche e delle vie KEGG su mioblasti murini privi di CNBP hanno rivelato una ridotta attivazione della pathway PI3K/Akt/mTOR (PAM) in seguito alla deplezione di CNBP, accompagnata da cambiamenti nei marcatori autofagici in modelli DM2 cellulari, murini e di Drosophila. L'inibizione dell'autofagia, tramite silenziamento RNAi del gene atg7, ha ripristinato i difetti locomotori nei moscerini DM2, suggerendo che l'inibizione dell'autofagia potrebbe rappresentare un potenziale approccio terapeutico per la DM2. Inoltre, abbiamo scoperto che la deplezione muscolo-specifica di CNBP in Drosophila provoca difetti alle giunzioni neuromuscolari (NMJ), caratterizzati da riduzioni nei marcatori pre- e post-sinaptici. Questi difetti potrebbero contribuire a modifiche non-cell autonomous della NMJ, aggravando il fenotipo distrofico. Questi risultati delineano un nuovo meccanismo di disfunzione dell'autofagia nella DM2, che sembra contribuire ai disturbi muscolari, uno dei sintomi più debilitanti nei pazienti affetti da DM

151

Genetic muscular disease/Myopathies and cardiomyopathies

Tubular aggregate myopathy

NEWLY GENERATED MOUSE MODELS OF TUBULAR AGGREGATE MYOPATHY (TAM): TOOLS FOR THE INVESTIGATION OF THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF THE DISEASE.

Protasi Feliciano[1], **L. Pietrangelo**[1], **A. Brasile**[1], **G. Rastelli**[1]

[1]*Chieti, Fondazione Università G. D'annunzio*

Project: GGP19231; Protasi Feliciano

Tubular aggregates (TAs) are regular arrays of highly ordered and densely packed straight-tubes of sarcoplasmic reticulum (SR) origin found in muscle biopsies. The extensive presence of TAs represent a key histopathological hallmark of TAMyopathy (TAM), a heritable myopathy primarily characterized by progressive muscle weakness, elevated levels of creatine kinase (CK), hypocalcemia, and exercise intolerance. TAs are also found in fast twitch muscle of ageing male mice. TAM has been linked to mutations in genes encoding for proteins that coordinate store-operated Ca2+ entry (SOCE, a mechanism activated by SR depletion and fatigue) that allows recovery of external Ca2+ when intracellular stores are depleted: a) stromal interaction molecule-1 (STIM1), a Ca2+ sensor of the SR lumen; b) ORAI1, the pore that allows entry of external Ca2+when activated by STIM1-dimers; c) Casq1, the main Ca2+ buffer of the SR that acts as a negative regulator of SOCE. Thanks to the support of the Italian Telethon Foundation in GGP19231: a) First, we studied TAs in ageing male mice, and discovered that: i) their presence is associated to SOCE dysfunction; b) their formation can be reduced by exercise and treatment with estrogens and anti-oxidants. b) Then, we characterized two mouse models generated in collaboration with R.T. Dirksen at the University of Rochester (NY): i) knock-in mice carrying a human mutation in the ORAI1 pore (Orai1G100S/+ or GS mice) which in humans results in a severe, early-onset form of TAM; ii) knock-in mice harboring a mutation in the Casq1 gene (Casq1GD44N/+ or D44N mice) identified in a 32-year-old male who complained of fatigue, generalized myalgia, and presence of tubular aggregates in muscle biopsies. We verified that both GS and DN mice develop TAs and muscle dysfunction that resemble the human disease. Hence these newly generated mouse models may represent in the future a tool for investigation of the pathophysiological mechanisms of TAM in humans.

Malattie genetiche muscolari/Miopatie e Cardiomiopatie

Miopatia con aggregati tubulari; TAM;

CARATTERIZZAZIONE DI MODELLI MURINI DI MIOPATIA DA AGGREGATI TUBULARI (TAM): NUOVI MODELLI PER L'INDAGINE DEI MECCANISMI FISIOPATOLOGICI DELLA MALATTIA.

Gli aggregati tubulari (AT) sono tubi ordinati di reticolo sarcoplasmatico (RS) presenti in biopsie muscolari di pazienti affetti da Miopatia degli Aggregati Tubulari (MAT), una patologia muscolare ereditaria caratterizzata da debolezza muscolare progressiva, livelli elevati di creatin-chinasi (CK), e intolleranza all'esercizio fisico. Gli AT sono anche presenti in muscoli di topi maschi anziani. La MAT è stata associata a mutazioni in geni che codificano per proteine che coordinano SOCE, un meccanismo che attivato da RS depleto e fatica, che consente il recupero del Ca2+ extracellulare: a) STIM1, un sensore di Ca2+ nel lume del RS; b) ORAI1, il canale che permette l'ingresso di Ca2+ esterno; c) Casq1, il principale tampone di Ca2+ del RS che funziona anche da regolatore negativo di SOCE. Grazie al sostegno del progetto Telethon GGP19231: a) In primo luogo, abbiamo esaminato AT in topi maschi anziani, scoprendo che la loro: i) presenza è correlata a disfunzioni di SOCE; ii) formazione può essere ridotta da esercizio fisico regolare e da trattamenti con estrogeni e antiossidanti.

b) In secondo luogo, abbiamo caratterizzato due modelli murini, sviluppati in collaborazione con R.T. Dirksen dell'Università di Rochester (NY): i) topi portatori di una mutazione nel canale ORAI1 (Orai1G100S/+ o GS mice), che negli esseri umani provoca una forma grave di MAT; ii) topi knock-in con una in Casq1 (Casq1GD44N/+ o D44N mice) identificata in un maschio di 32 anni che lamentava mialgia diffusa indotta da esercizio, e presenza di aggregati tubulari. Abbiamo verificato che sia nei topi GS che nei topi D44N: i) si formano AT nelle fibre muscolari e i) la presenza di disfunzione muscolare simile alla malattia umana. Questi risultati suggeriscono che i modelli murini appena descritti potrebbero rappresentare in futuro uno strumento utile per lo studio dei meccanismi fisiopatologici alla base della MAT nell'uomo.

152

Genetic muscular disease/Myopathies and cardiomyopathies

Duchenne muscular dystrophy

CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF MONOAMINE OXIDASE INHIBITORS AGAINST DUCHENNE-ASSOCIATED CARDIOMYOPATHY

Arusei Ruth Jepchirchir[1], J. Sabatino[2], I. Cattapan[2], A. Di Candia[2], K. Rahhali[2], M. Spasiano[2], F. Di Lisa[2], G. Di Salvo[2], N. Kaludercic[2]

[1]Padova, Padova, Department of Biomedical Sciences, University of Padua, Italy
[2]Padua, Department of Woman's and Child's Health, University of Padua, Italy

Project: GMR23T1047; Kaludercic Nina

Cardiomyopathy is an increasing burden and a major cause of mortality in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Despite advancements in the management of muscular and respiratory problems in DMD, diagnostic and therapeutic approaches to counter the development and progression of cardiac deficiencies are still lacking. Growing evidence indicates reactive oxygen species (ROS) as one of the major players in the pathogenesis of DMD-related cardiac anomalies, although the exact sources of ROS are yet to be identified. Here, we investigated the contribution of monoamine oxidases (MAO), an important source of mitochondrial ROS, to the development and progression of DMD-associated cardiomyopathy. To this aim, male and female WT C57BL/10ScSn and mdx mice at 3 or 12 months of age were characterized at baseline and after treatment with MAO inhibitors safinamide or pargyline. Echocardiography revealed significant septal thickening and altered longitudinal and circumferential strain in the mdx compared to WT mice at 3 months of age, indicating an impairment in regional myocardial function. This was accompanied by a 10-fold increase in cardiac fibrosis and increased superoxide levels. Compared to the WT, mitochondria isolated from mdx hearts generated more ROS in the presence of MAO substrates. MAO inhibition in vivo prevented cardiac dysfunction in the mdx mice treated with either safinamide or pargyline compared to the saline group. In older mdx mice (i.e., 12 months), safinamide administration halted continued thickening of the septum and posterior wall relative to the vehicle-treated mdx mice and led to a significant improvement in the circumferential strain. Taken together, present findings reveal a cardioprotective role of MAO inhibition in a mouse model of DMD and identify a potential clinically relevant target for the treatment of DMD-associated cardiomyopathy.

Malattie genetiche muscolari/Miopatie e Cardiomiopatie

Distrofia Muscolare di Duchenne; Distrofinopatia grave, tipo Duchenne; DMD;

EFFETTI CARDIOPROTETTIVI DEGLI INIBITORI DELLA MONOAMINO OSSIDASI NELLA CARDIOMIOPATIA ASSOCIATA ALLA DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

La cardiomiopatia rappresenta una delle principali cause di mortalità nella distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Nonostante i progressi nella gestione dei problemi muscolari e respiratori nella DMD, mancano approcci efficaci per contrastare le disfunzioni cardiache. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono implicate nella patogenesi delle anomalie cardiache nella DMD, ma le loro fonti esatte restano sconosciute. In questo studio, abbiamo valutato il ruolo delle monoamino ossidasi (MAO), una fonte importante di ROS mitocondriali, nello sviluppo e nella progressione della cardiomiopatia associata alla DMD. Topi maschi e femmine WT C57BL/10ScSn e mdx di 3 o 12 mesi di età sono stati caratterizzati a livello basale e dopo trattamento con gli inibitori delle MAO safinamide o pargilina. L'ecocardiografia ha rivelato un significativo ispessimento del setto e alterazioni nello strain longitudinale e circonferenziale nei topi mdx rispetto ai WT a 3 mesi di età, indicando un deterioramento della funzione miocardica regionale. Queste alterazioni erano accompagnate da un aumento di 10 volte della fibrosi cardiaca e da livelli elevati di superossido. Rispetto ai WT, i mitocondri isolati dai cuori mdx hanno generato una maggiore quantità di ROS in presenza di substrati delle MAO. L'inibizione delle MAO in vivo ha prevenuto la disfunzione cardiaca nei topi mdx trattati con safinamide o pargilina rispetto al gruppo trattato con soluzione salina. Nei topi mdx più anziani (12 mesi), la somministrazione di safinamide ha portato a un miglioramento significativo dello strain circonferenziale rispetto ai topi mdx trattati con veicolo. Complessivamente, questi risultati rivelano un ruolo cardioprotettivo dell'inibizione delle MAO in un modello murino di DMD e identificano un potenziale bersaglio clinicamente rilevante per il trattamento della cardiomiopatia associata alla DMD.

153

Genetic cardiac disease

Familial dilated cardiomyopathy with conduction defect due to LMNA mutation

153IPSC-BASED CARDIAC MODELS TO INVESTIGATE THE ROLE OF MLIP IN LMNA-CARDIOMYOPATHY

Medeghini Vittoria[1], C. Ronchi[1], C. Thairi[2], C. Galli[1], M. Ballerini[3] C. Pernici[4], R. Visone[4], P. Occhetta[4], M. Rasponi[3], E. Di Pasquale[1]

[1]Rozzano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Rozzano, Humanitas Research Hospital
[3]Milano, Politecnico Di Milano
[4]Milano, Milano, BiomimX Srl, Milan, 20157, Italy

Project: GJC22040; Di Pasquale Elisa

LMNA cardiomyopathy is a heart disease caused by mutations in the gene encoding Lamin A/C proteins (LMNA) and characterized by left ventricle dilatation and systolic dysfunction. It is associated with arrhythmias and conduction abnormalities. This pathology has variable penetrance and expressivity, and manifests with heterogeneous clinical phenotypes. Here we hypothesized that MLIP (muscular LMNA interacting protein) might influence Lamin A/C functions, could

contribute to the phenotypic variability observed in patients. Starting from cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) either control or carrying LMNA mutations (p.K219T), we first analyzed expression of MLIP variants through RT-PCR and identified variant 3 as the cardiomyocyte-specific one. Lentiviral-mediated overexpression of this MLIP variant in iPSC-CMs localizes it in the cytoplasm, against to expectations that it might co-localize with Lamin A/C proteins in the nuclear envelope. Nevertheless, this behavior is consistent with the lack in the variant 3 of exon 4 containing the nuclear localization signal. Immunofluorescence data are instead showing both cytoplasmic and nuclear localization. Notably, immunohistochemistry on heart sections confirmed MLIP is present in the cytoplasm of both cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. In wild type cardiomyocytes MLIP was also found at the cell-cell junction, but this MLIP expression was lost in pathological heart sections from LMNA patients, suggesting a potential role of this protein in gap junction formation and function. Functional investigations, using iPSC-CMs both in 2D configuration and 3D Heart-on-Chip platform (µHeart), will provide us with its potential role in the disease. In conclusion, this preliminary study has enabled us to characterize MLIP localization and its potential involvement in the pathology, providing the basis for further functional research on the regulation and the role of this protein in the heart.

Malattie genetiche cardiache

Cardiomiopatia dilatativa familiare con difetto di conduzione da mutazione in LMNA

MODELLI CARDIACI IPSC-DERIVATI PER INVESTIGARE IL RUOLO DI MLIP NELLA CARDIOMIOPATIA LAMINA-DIPENDENTE

La cardiomiopatia Lamina-dipendente è una malattia del cuore causata da mutazioni nel gene che codifica le proteine Lamina A/C (LMNA), caratterizzata da dilatazione del ventricolo sinistro e disfunzione sistolica. È associata ad aritmie e anomalie della conduzione. Questa patologia presenta un'elevata variabilità clinica, con sintomatologia eterogenea tra pazienti. Ipotizziamo che la proteina MLIP (muscular LMNA interacting protein) possa influenzare la funzione di Lamina A/C, contribuendo a questa variabilità. Partendo da cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CMs), sia controllo che mutati nel gene LMNA, abbiamo analizzato l'espressione delle varianti di MLIP tramite RT-PCR, identificando la variante 3 come quella cardiomiocita-specifica. L'overespressione di MLIP non la localizza nel nucleo insieme a Lamina A/C, come atteso, ma nel citoplasma. Questo può essere giustificato dall'assenza nella variante 3 dell'esone 4, contenente il segnale di localizzazione nucleare. I dati di immunofluorescenza mostrano una localizzazione più diffusa, sia citoplasmatica che nucleare. Esperimenti di immunoistochimica su sezioni miocardiche hanno confermato la presenza di MLIP nel citoplasma sia dei cardiomiociti che delle cellule muscolari vascolari lisce. Nei cardiomiociti delle sezioni di controllo MLIP si localizza anche alle giunzioni cellulari, ma questo segnale si perde nelle sezioni patologiche, suggerendo un possibile ruolo di questa proteina nella formazione e nel funzionamento nelle giunzioni cellula-cellula. Ulteriori indagini funzionali, sia in 2D in iPSC-CMs che in microtessuti 3D (uHeart), ci aiuteranno a comprendere meglio il ruolo di MLIP nella malattia. In conclusione, questo studio preliminare ci ha permesso di caratterizzare la localizzazione subcellulare di MLIP e il suo potenziale coinvolgimento nella patologia, fornendoci le basi per ulteriori ricerche funzionali sul ruolo e la regolazione di questa proteina nel cuore.

154

Genetic cardiac disease

Familial dilated cardiomyopathy with conduction defect due to LMNA mutation

SUBTYPE-SPECIFIC IPSC-DERIVED CARDIOMYOCYTE MODELS TO UNRAVEL DISTINCT CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF LMNA-CARDIOMYOPATHY (ATHENA)

Ronchi Carlotta[1], C. Thairi[2], N. Salvarani[1], C. Galli[1], S. Puccio[2], C. Pernici[3], R. Visone[3], M. Ballerini[4], P. Occhetta[3], M. Rasponi[4], E. Di Pasquale[2]

[1]Milan, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Milan, Humanitas Research Hospital
[3]Milan, BiomimX Srl, MIND - Milano Innovation District
[4]Milan, Politecnico Di Milano

Project: GMR22T1093; Di Pasquale Elisa

Cardiomyopathy caused by LMNA gene mutations is an inherited disorder affecting the nuclear lamina proteins Lamin A/C, classified among rare laminopathies. It primarily manifests as dilated cardiomyopathy, often with conduction abnormalities and fatal arrhythmias. Symptoms vary widely without a clear genotype-phenotype correlation, leading to several hypotheses to explain the clinical heterogeneity. We previously demonstrated that LMNA p.K219T mutation influences SCN5A transcription, linking defective Lamin A/C-driven epigenetic regulation to cardiac disease; however, its impact on electrical and mechanical properties of cardiac cells remains under-assessed. ATHENA hypothesized possible distinct roles of Lamin A/C in specific cardiomyocyte (CM) subtypes and its involvement in regulating specific transcriptional programs may underlie LMNA-cardiomyopathy clinical variability. To this, CMs differentiated into distinct subtypes from patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSC-CMs) carrying LMNA mutations and the respective controls, are being compared. Results show that ventricular-like LMNA-CMs exhibit faster Ca2+ dynamics and contraction compared to controls, while atrial-like LMNA-CMs show significant reduced contractility and delayed Ca2+ transients. RNA sequencing experiments are ongoing to elucidate the mechanisms behind these observations; preliminary bioinformatic analysis on ventricular cells indicates that Ca2+ signal and muscle contraction pathways are mostly involved. Functional and molecular studies in 3D cardiac models and in sinoatrial-nodal CMs are still ongoing. In conclusion, these findings suggest a specific function of Lamin A/C into defined subtypes that might depend on an epigenetic effect on CMs function. Altogether, results obtained from these distinct cell populations will be crucial for clarifying the heterogeneous clinical phenotype associated with the disease and underlying more specific genotype/phenotype correlations.

Malattie genetiche cardiache

Cardiomiopatia dilatativa familiare con difetto di conduzione da mutazione in LMNA

USO DI SOTTOTIPI DI CARDIOMIOCITI DERIVATI DA IPSC PER SVELARE I MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI DELLA CARDIOMIOPATIA ASSOCIATA A LMNA (ATHENA)

Mutazioni nel gene LMNA causano una cardiomiopatia ereditaria che colpisce le proteine della lamina nucleare Lamina A/C. Si manifesta principalmente come cardiomiopatia dilatativa con

anomalie della conduzione e aritmie fatali, ma è caratterizzata da sintomi variabili, senza chiara correlazione genotipo-fenotipo, portando a diverse ipotesi per spiegare l'eterogeneità clinica. Precedentemente, abbiamo dimostrato che la mutazione LMNA p.K219T influenza la trascrizione di SCN5A tramite regolazione epigenetica, ma il suo impatto sulle proprietà elettriche e meccaniche del cuore è ancora poco studiato. ATHENA ipotizza che la variabilità clinica potrebbe essere spiegata dal ruolo della Lamina A/C nei diversi sottotipi di cardiomiociti (CM) mediante la regolazione di specifici programmi trascrizionali. Per investigare questo aspetto, ATHENA utilizza cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC-CMs) con mutazioni LMNA e controlli, differenziandoli in sottotipi e confrontandoli. I risultati mostrano che i CM-ventricolari mutati presentano una dinamica del Ca^{2+} più rapida e una contrazione maggiore, mentre i CM-atriali mutati mostrano una significativa riduzione della contrattilità e un ritardo nei transienti di Ca^{2+}. Esperimenti di sequenziamento dell'RNA sono in corso per chiarire i meccanismi sottostanti. Analisi bioinformatiche preliminari su CM-ventricolari indicano il coinvolgimento de segnali di Ca^{2+} e delle vie di contrazione muscolari. Studi funzionali e molecolari su modelli cardiaci tridimensionali e su cardiomiociti del nodo senoatriale sono ancora in corso. Questi risultati suggeriscono una funzione specifica di Lamina A/C nei vari sottotipi, probabilmente mediata da effetti epigenetici. Lo studio di queste popolazioni cellulari distinte aiuterà a chiarire il fenotipo clinico eterogeneo della malattia e a definire meglio le correlazioni genotipo/fenotipo.

155

Genetic cardiac disease

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy

COMPARISON OF KNOCK-IN MOUSE AND HIPSC-BASED MODELS OF ARRHYTHMOGENIC RIGHT VENTRICULAR CARDIOMYOPATHY CARRYING THE DSG2 P.Q558* MUTATION

Calore Martina[1], R.M.W. Colpaert[2], C. Sacchetto[2], S. Ferron[1] S. Vencato[1], C. Romanato[1], F. Rossi[3], E. Di Pasquale[4], L. Vitiello[1] L.J. De Windt[2], A. Rampazzo[1]

[1]Padova, Università Di Padova
[2] Maastricht, Maastricht University
[3] Vancouver, Biomedical Research Centre, University of British Columbia
[4]Rozzano, Milano, Humanitas Research Hospital

Project: GMR24T1105; Calore Martina

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC/ACM) is one of the most common inherited cardiomyopathies, characterized by myocardial fibro-fatty replacement, ventricular arrhythmias, and sudden cardiac death. Mutations in desmosomal proteins plakophilin-2 (PKP2), desmoplakin (DSP), and desmoglein-2 (DSG2) are most common. The pathogenesis of ARVC remains unclear and therefore the establishment of reliable disease models is crucial. Here, we compared and integrated the phenotypic data from novel induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) and fibroblasts (hiPSC-FBs), and knock-in (KI) mice carrying the DSG2 p.Q558 pathogenic variant. hiPSCs were generated from epithelial renal cells of an ARVC patient and differentiated into either hiPSC-CMs or hiPSC-FBs, alongside isogenic controls made via prime editing. Heterozygous and homozygous KI mice were viable and fertile. hiPSC-CMs and KI mice showed reduced DSG2 expression and deregulated components of cardiac mechanical and electrical junctions. RNA-seq revealed altered genes involved in electrical transmission and in fibrosis. Interestingly, homozygous KI mice had an abnormally large left atrium and electrical alterations after endurance training. Finally, ARVC hiPSC-FBs spontaneously activated into hiPSC-myoblasts, suggesting fibroblasts play a role in the fibro-fatty replacement. Both in vitro and in vivo models recapitulate several ARVC features. These models are currently being used to test novel therapeutic approaches for the disease based on gene and RNA therapy.

Malattie genetiche cardiache

cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro

Studio di nuovi modelli per capire meglio la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro con mutazione nel gene DSG2

La cardiomiopatia aritmogena (ARVC/ACM) è una malattia ereditaria del cuore che colpisce la struttura del muscolo cardiaco. In questa patologia, il tessuto muscolare viene progressivamente sostituito da tessuto fibroso o fibro-adiposo, aumentando il rischio di aritmie e morte cardiaca improvvisa. Alcuni geni, come quelli che producono proteine importanti per collegare le cellule del cuore tra loro (PKP2, DSP e DSG2), sono spesso mutati in questa malattia. Per studiare meglio l'ARVC e sviluppare nuove terapie, abbiamo utilizzato due modelli: cellule cardiache derivate da cellule staminali (chiamate hiPSC) di un paziente affetto portatore della variante patogena p.Q558* nel gene DSG2 e topi geneticamente modificati che portano la stessa mutazione. Le nostre analisi hanno mostrato che sia le cellule cardiache che i topi presentano segni caratteristici della malattia, come alterazioni dei geni legati alla trasmissione elettrica e alla fibrosi. Nei topi, abbiamo anche osservato dilatazione dell'atrio sinistro e problemi elettrici sotto sforzo fisico. Questi modelli sono ora utilizzati per testare nuove terapie, tra cui trattamenti basati su tecnologie genetiche avanzate e sull'RNA, per affrontare questa malattia complessa e migliorare le prospettive di cura.

156

Genetic cardiac disease

Timothy syndrome

THE ROLE OF CAMKII AND CALCINEURIN IN CALCIUM-DRIVEN ARRHYTHMOGENIC REMODELING IN A SWINE MODEL OF TIMOTHY SYNDROME

Trancuccio Alessandro[1], C. Tarifa[2], D.J. Santiago[2], D. Kukavica[1] V. Pergola[3], S.G. Priori[4], A. Mazzanti[5]

[1]Pavia, Università Di Pavia
[2]Madrid, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
[3]Napoli, Università Di Napoli Federico II
[4]Pavia, Fondazione Salvatore Maugeri
[5]Pavia, Fondazione Salvatore Maugeri"

Project: GMR22T1100; Mazzanti Andrea

Timothy Syndrome (TS) is a lethal arrhythmogenic disorder caused by CACNA1C gene mutations that impair Cav1.2 inactivation, leading to prolonged cardiac action potentials (APs) and Ca^{2+} overload. We tested the hypothesis that cellular Ca^{2+} overload leads to Ca^{2+}-dependent alterations of

ionic currents in TS cardiomyocytes in a swine model of TS. Patch-clamp recordings from WT and TS swine ventricular myocytes confirmed delayed ICa inactivation, prolonged APs, and increased Ca^{2+} transient (CaT) duration and amplitude in TS cells. We then hypothesized that elevated intracellular Ca^{2+} in TS overactivates CaMKII, a key regulator of INa. Indeed, TS cardiomyocytes showed a one-third reduction in peak INa and a twofold increase in late INa, with significantly greater CaMKII auto-phosphorylation compared to WT. Pre-treatment with AIP and KN-93 restored peak and late INa to WT levels, confirming CaMKII dependence. We further investigated this mechanism by developing an in silico swine ventricular myocyte model incorporating CaMKII regulation. This virtual TS myocyte recapitulated experimental findings and provided mechanistic insights into how CaMKII contributes to secondary arrhythmogenic phenotypes. The model was further leveraged to evaluate the therapeutic potential of various pharmacological compounds in rescuing these pathological alterations. Finally, we hypothesized that Calcineurin, a Ca^{2+}-dependent phosphatase regulating ICa inactivation, could exacerbate TS arrhythmias by further slowing ICa inactivation beyond the direct effects of the CACNA1C mutation. Consistent with this, Tacrolimus and Cyclosporine A accelerated ICa inactivation and shortened APs in patch-clamped TS cells. In summary, our study identifies two Ca^{2+}-driven arrhythmogenic cascades in TS, mediated by post-translational modifications of Na^{+} and Ca^{2+} channels. We also provide insights into potential pharmacological strategies to restore normal electrophysiology in TS cardiomyocytes."

Malattie genetiche cardiache

Sindrome di Timothy; TS; LQT8; Sindrome del QT lungo - sindattilia; Sindrome del QT lungo, tipo 8;

IL RUOLO DI CAMKII E CALCINEURINA NEL RIMODELLAMENTO ARITMOGENICO INDOTTO DAL CALCIO IN UN MODELLO SUINO DI SINDROME DI TIMOTHY

La Sindrome di Timothy è una grave patologia cardiaca ereditaria che può causare aritmie pericolose per la vita. È causata da una mutazione genetica che altera il funzionamento di un canale del calcio (Ca^{2+}) nelle cellule cardiache ("cardiomiociti") e determina un prolungamento dei segnali elettrici cardiaci, nonchè un accumulo eccessivo di calcio al loro interno. Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato un modello suino di Sindrome di Timothy per studiare come l'accumulo di Ca^{2+} possa influenzare il comportamento di altri canali ionici nel cuore. Nello specifico, abbiamo scoperto che, tramite l'attivazione anomala di una proteina chiamata CaMKII, l'accumulo di Ca^{2+} altera il flusso di ioni sodio. Ciò contribuisce ulteriormente sia al prolungamento del segnale elettrico cardiaco che alla genesi dei fenomeni aritmici. A conferma di tale ipotesi, quando abbiamo testato dei composti sperimentali che bloccano CaMKII, il flusso di sodio è tornato alla normalità. Abbiamo poi creato un modello matematico puramente computazionale per simulare queste alterazioni e testare possibili strategie terapeutiche. Questo modello ha ricapitolato i risultati sperimentali e ci ha aiutato a capire meglio come i cambiamenti nel calcio e nel sodio mediati dalla CaMKII contribuiscono alle aritmie. Infine, abbiamo studiato un'altra proteina, la Calcineurina, la cui funzione può essere alterata da uno stato di sovraccarico cellulare di calcio, risultando responsabile di un ulteriore peggioramento del fenotipo aritmico. Tale ipotesi si è confermata dimostrando che due molecole in grado di inibire la calcineurina (tacrolimus e ciclosporina) sono in grado di ripristinare un flusso di calcio più normale all'interno dei cardiomiociti di maiale con la sindrome di Timothy. Riassumendo, abbiamo identificato due meccanismi che rendono il cuore più vulnerabile alle aritmie nella Sindrome di Timothy, individuando alcune strategie farmacologiche che potrebbero aiutare a correggere questi problemi.

157

Genetic cardiac disease

Renal hypomagnesemia-7 with or without dilated cardiomyopathy (HOMG7)

FROM GENETIC DEFECT TO CARDIAC DYSFUNCTION: INVESTIGATING RRAGD CARDIOMYOPATHY IN VITRO

Guerrero Gerbolés Amparo[1], N. Djalinac[1], C. Carlini[1], B. Pacchioni[1] I. Sambri[2], A. Ballabio[2], M. Bellin[1]

[1]Padova, Università Di Padova
[2]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: GMR24T1104; Bellin Milena

Mutations in the RRAGD gene have recently been associated with the HOMG7 syndrome: an autosomal dominant pathology that, despite primarily affecting the kidneys, also shows an early onset of dilated cardiomyopathy. The RagD GTPase (RagD), encoded by the RRAGD gene, mediates a non-canonical mTORC1 signalling cascade. Pathogenic mutations associated with HOMG7 lead to a constitutive activation of RagD, preventing TFEB nuclear translocation, and consequently impairing lysosomal and mitochondrial stress response. Nevertheless, the cascade of events that determine cardiac dysfunction is still largely unknown. Previously, we demonstrated TFEB cytosolic retention in human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived cardiomyocytes overexpressing mutated RRAGD. Here, we will instead use patient-specific hiPSCs carrying a pathogenic RRAGD mutation to 1) characterise the molecular and functional phenotypes underlying HOMG7-associated cardiomyopathy using an innovative three-dimensional cardiac microtissue model and 2) screen compounds capable of restoring TFEB nuclear translocation. So far, we generated two hiPSC lines from skin fibroblasts of patients carrying the c.263C>T heterozygous missense mutation. RRAGDwt/c.263C>T hiPSCs were successfully differentiated into cardiomyocytes and recapitulated TFEB nuclear translocation impairment following lysosomal stress induction. These patient-derived hiPSCs represent an invaluable resource to differentiate multiple cardiac cell types (such as endothelial cells and cardiac fibroblasts) and assemble an in vitro three-dimensional heart model. With this approach we can 1) promote post-natal cardiac maturation, enabling the capture of adult phenotypes of cardiac diseases 2) identify cell type-specific contribution to RRAGD-mediated cardiac dysfunction and 3) build a physiologically relevant screening platform to assess whether the restoration of TFEB nuclear translocation leads to a rescue of the cardiac function.

Malattie genetiche cardiache

Renal hypomagnesemia-7 with or without dilated cardiomyopathy (HOMG7)

DAL DIFETTO GENETICO ALLA DISFUNZIONE CARDIACA: STUDIO IN VITRO DELLA CARDIOMIOPATIA RRAGD

Recentemente, mutazioni nel gene RRAGD sono state associate alla sindrome HOMG7: una patologia che colpisce sia i reni che il cuore.

Questa mutazione porta a una proteina (chiamata RagD) danneggiata che compromette la normale risposta cellulare allo stress metabolico. Attualmente, mancano modelli che permettano di studiare questa malattia in laboratorio, compromettendo la possibilità di identificare una cura adeguata. Per questo motivo, il nostro gruppo si è focalizzato nel creare il primo modello cellulare in vitro per questa patologia. Grazie alla donazione di alcuni pazienti con una mutazione nel gene RRAGD, abbiamo generato cellule staminali pluripotenti a partire da alcune cellule della pelle. Da queste cellule, tramite opportuni protocolli di differenziamenti, è possibile ricavare le diverse tipologie cellulari che compongono il cuore umano (cardiomiociti, fibroblasti e cellule endoteliali). Con questi elementi è possibile creare piccoli organoidi battenti con l'informazione genetica dei pazienti, e studiare come la mutazione in RRAGD alteri la funzione delle diverse tipologie cellulari, e determinini la disfunzione cardiaca. In più, questo modello cellulare rappresenta un'ottima opportunità per testare composti che possano correggere l'attività della proteina mutata e identificare potenziali strategie terapeutiche.

158

Genetic renal disease

Hypomagnesemia 7, Renal, with or Without Dilated Cardiomyopathy (HOMG7)

MODELING TUBULOPATHY AND CARDIOMYOPATHY SYNDROMES DRIVEN BY RRAGD MUTATIONS

Sambri Irene[1], M. Ferniani[1], R. Pennella[1], B. Rossi[1], A. Iannaccone[2], L. Staiano[1], F. Trepiccione[2], A. Ballabio[1]

[1]Naples, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem) 2 Naples, Istituto Di Ricerche Genetiche "Gaetano Salvatore" (Irgs) - Biogem

Project: TGM22CBDM06; Ballabio Andrea

Inherited kidney tubulopathies comprise a diverse group of disorders characterized by impaired renal function, often accompanied by cardiomyopathy. Recent studies have identified a novel autosomal dominant syndrome linking kidney tubulopathy and severe dilated cardiomyopathy to mutations in the RRAGD gene, which encodes the GTPase RagD. Rag GTPases, forming heterodimeric complexes of RagA or RagB with RagC or RagD, play a pivotal role in activating mTORC1 signaling. Our lab has demonstrated that the GDP-binding state of RagC/D, regulated by the GTPase-activating protein (GAP) folliculin (FLCN), is essential for mTORC1-mediated selective phosphorylation and cytoplasmic retention of the transcription factors TFEB and TFE3, which are master regulators of lysosomal biogenesis and autophagy.We recently identified a novel RRAGD mutation (Pro88Leu) that, similar to previously described RRAGD mutations, disrupts RagD's ability to bind GTP, resulting in a constitutively active protein. This persistent activation causes continuous phosphorylation of TFEB and TFE3, preventing their nuclear translocation. These findings suggest that the impaired nuclear localization of TFEB and TFE3 contributes to kidney tubulopathy and dilated cardiomyopathy in patients with auto-activating RagD mutations.To investigate the pathogenic role of TFEB cytoplasmic sequestration, we generated a Rragd Pro88Leu knock-in mouse model to study the tissue-specific mechanisms underlying the renal and cardiac phenotypes. Both heterozygous and homozygous Rragd Pro88Leu mice exhibit clinical features found in human patients, including polyuria and hypomagnesemia, underscoring the robustness of this model for elucidating the molecular and physiological effects of RagD hyperactivation. By characterizing RagD-driven pathogenic pathways, this project aims to uncover disease mechanisms and support the development of targeted therapies for inherited kidney tubulopathies and cardiomyopathy syndromes.

Malattie genetiche renali

Hypomagnesemia 7, Renal, with or Without Dilated Cardiomyopathy (HOMG7)

SVILUPPO DEL MODELLO MURINO RRAGD KNOCK-IN PER L'ANALISI DEI MECCANISMI PATOLOGICI ALLA BASE DELLE SINDROMI CARDIORENALI CAUSATE DALLE MUTAZIONI IN RRAGD.

Le tubulopatie renali ereditarie rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate da un'alterazione della funzione renale, spesso associate a cardiomiopatia. Studi recenti hanno identificato una nuova sindrome autosomica dominante che collega le tubulopatie renali a una grave cardiomiopatia dilatativa, causata da mutazioni nel gene RRAGD, che codifica per la GTPasi RagD. Le GTPasi Rag, che formano complessi eterodimerici tra RagA o RagB e RagC o RagD, giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione del segnale mTORC1, un pathway chiave per la regolazione della crescita e del metabolismo cellulare.Il nostro laboratorio ha dimostrato che la capacità di RagC/D di legare GDP, regolata dalla proteina attivatrice delle GTPasi (FLCN), è cruciale per la fosforilazione selettiva mediata da mTORC1 e per il sequestro citoplasmatico dei fattori di trascrizione TFEB e TFE3, regolatori centrali della biogenesi lisosomiale e dell'autofagia. Abbiamo recentemente identificato una nuova mutazione in RRAGD (Pro88Leu) che, analogamente ad altre mutazioni già descritte, compromette la capacità di RagD di legare GTP, rendendo la proteina costitutivamente attiva. Questa attivazione persistente determina una fosforilazione continua di TFEB e TFE3, impedendo la loro traslocazione nel nucleo. I nostri risultati suggeriscono che questa mancata localizzazione nucleare di TFEB e TFE3 contribuisca all'insorgenza di sindromi cardiorenali nei pazienti con mutazioni attivanti di RagD. Per investigare il ruolo patologico del sequestro citoplasmatico di TFEB, abbiamo generato un modello murino knock-in con mutazione Rragd Pro88Leu, per studiare i meccanismi specifici che causano i fenotipi renali e cardiaci. I topi Rragd Pro88Leu, sia eterozigoti sia omozigoti, presentano caratteristiche cliniche simili a quelle osservate nei pazienti, come poliuria e ipomagnesemia, confermando l'affidabilità del modello per lo studio dei meccanismi patologici e per lo sviluppo di future terapie mirate.

159

Genetic renal disease

Nephronophthisis / Infantile nephronophthisis

Retinitis pigmentosa

BASE EDITING SCREEN FOR THE IDENTIFICATION OF MUTATIONS DISRUPTING DISTAL APPENDAGES FUNCTIONALITY

Migliorati Daniele[1], A. Mattivi[1], L. Fava[1]

[1]Trento, Università Di Trento

Project: GJC21181; Fava Luca

Distal appendages (DAs) are essential components for the nucleation of the primary cilium, a cellular organelle deputed to sensing the extracellular environment. Mutations in the genes coding for DAs have been linked to various “ciliopathies”, diseases in which the primary cilium is not properly assembled or functioning. These include Nephronophthisis, Joubert Syndrome, Retinitis Pigmentosa and others. A recurrent trait in these genetic disorders is the scarce genotype-phenotype correlation, with mutations impacting the same gene but resulting in a different penetrance of disease traits. In this poster, we propose a mutagenesis approach for DA genes, intending to better characterize the association between mutated genomic regions and resulting phenotype for a specific subset of ciliopathy-causing genes. We designed a library of sgRNAs exploiting all the 5’-NGG-3’ PAMs in the coding sequences of the following centrosomal proteins: FOPNL, CEP120, C2CD3, OFD1, CEP83, and SCLT1. When used with a cytidine base editor, this custom-made library can collectively mutate all the cytidines in the editing windows of its sgRNAs, thus affecting the corresponding residues of the proteins listed above. This library will be used in Cal51 cells engineered with a fluorescent reporter developed in our laboratory and capable of informing about DAs integrity.After inducing the activation of the fluorescent reporter, cells will be sorted according to their fluorescence status by using a flow cytometer. The sgRNAs enriched in the fluorescent-negative population will inform about mutations that are associated with disruption of the DA compartment, generating a “map” of regions in the selected genes that, when affected by point mutations, are resulting in a detrimental effect on the structure of DAs and possibly making the genotype-phenotype association for the selected ciliopathy-causing genes more robust.

Malattie genetiche renali

Nefronoftisi; NPHP; Nefronoftisi infantile; NPHP infantile autosomica recessiva; Nefronoftisi infantile autosomica recessiva;

Retinite pigmentosa; RP;

BASE EDITING SCREEN PER L’IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI IMPATTANTI LA FUNZIONE DELLE APPENDICI DISTALI

Le appendici distali (AD) sono componenti essenziali per la nucleazione del ciglio primario, un organello cellulare adibito alla percezione dell’ambiente extracellulare. Mutazioni nei geni codificanti per le AD sono state collegate a varie “cigliopatie”, malattie in cui non sia ha la corretta formazione o funzionamento del ciglio primario. Queste includono la Nefronoftisi, la Sindrome di Joubert, la Retinite Pigmentosa e altre. Un tratto ricorrente in queste malattie genetiche è la scarsa correlazione genotipo-fenotipo, avendo mutazioni impattanti lo stesso gene ma con diversa penetranza dei tratti della malattia. In questo poster proponiamo un approccio di mutagenesi per i geni delle AD, con l’intento di meglio caratterizzare, per uno specifico sottoinsieme di geni causanti cigliopatie, l’associazione tra la regione genomica mutata e il fenotipo risultante. Abbiamo disegnato una libreria di sgRNA che sfruttano tutte le PAM 5’-NGG-3’ nelle sequenze codificanti delle seguenti proteine centrosomali: FOPNL, CEP120, C2CD3, OFD1, CEP83, and SCLT1. Se usata in combinazione con un cytidine base editor, questa libreria può complessivamente mutare tutte le citidine contenute nelle finestre di editing dei suoi sgRNA, modificando di conseguenza i corrispondenti residui delle proteine sopra elencate. La libraria sarà usata in cellule Cal51 ingegnerizzate con un reporter fluorescente in grado di evidenziare l’integrità delle AD. Dopo aver indotto l’attivazione del reporter fluorescente, le cellule saranno separate a seconda del loro livello di fluorescenza. I sgRNA arricchiti nella popolazione non fluorescente daranno informazioni riguardanti quali mutazioni siano deleterie per le AD, generando una “mappa” di quali regioni, nei geni selezionati, siano importanti per la struttura delle AD e andando a rendere più robusta l’associazione genotipo-fenotipo per i geni causanti-ciliopatie inclusi in questo studio.

160

Genetic renal disease

Autosomal dominant polycystic kidney disease

TARGETED THYROID HORMONE RELEASE TO TREAT AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE

Del Vecchio Alice[1], L. Locatelli[1], M. Trillini[1], D. Cerullo[1]
B. Petracca[1],V. Brizi[1], S. Buttò[1], A. Villa[1], T. Peracchi[1], D. Corna[1],
N. Rubis[1], A.M. Lavecchia[1], G. Remuzzi[1], C. Xinaris[1]

[1]Bergamo, Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS

Project: GMR23T2014; Xinaris Christodoulos

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a monogenic disease, characterized by the formation of multiple cysts that cause gradual loss of renal function. To date there is no effective cure for this disease. Our clinical study showed that ADPKD patients with impaired renal function exhibit significantly higher reverseT3 and lower freeT3 levels and, in vitro/in vivo studies demonstrated that TH administration reduces cyst formation and growth. Despite so, TH systemic administration might cause several side effects, such as hyperfiltration and arrhythmias. To minimize the harmful effects and maximize the therapeutic ones we have developed nanoparticles containing T4 (NanoT4) functionalized with a compound to specifically target renal tubular epithelium. Our in vitro studies showed that NanoT4 (i) did not induce cytotoxicity, (ii) effectively bind to ADPKD cells and in vitro cysts and (iii) release T4 at low pH or in ROS-rich milieus, as is the case of the inflamed polycystic kidney. Next, we evaluated NanoT4 efficacy in a 3D cystogenesis assay with patient-derived cells. The results from this study showed that NanoT4 markedly reduced cysts number compared to control (untreated) and T4-treated cysts (2- and 1,5-fold decrease, respectively). Finally, specificity studies in PCK rats showed that NanoT4 selectively accumulated in polycystic kidney compared to other organs.

Malattie genetiche renali

Malattia del rene policistico, autosomica dominante; ADPKD;

RILASCIO MIRATO DELL’ORMONE TIROIDEO PER LA CURA DELLA MALATTIA AUTOSOMICA DOMINANTE DEL RENE POLICISTICO

La malattia autosomica dominante del rene policistico (ADPKD) è una malattia genetica rara, caratterizzata dalla formazione di cisti che causano una graduale perdita di funzione renale. Ad oggi non esiste ancora una cura per questa malattia. Il nostro studio clinico ha messo in evidenza che pazienti ADPKD con ridotta funzionalità renale presentavano livelli più alti di reverseT3, la forma inattiva dell’ormone tiroideo (TH), e ridotti livelli di T3 circolante, la forma attiva del TH. Inoltre, i nostri studi svolti in vivo in ratti PCK e in vitro hanno dimostrato che l’amministrazione di TH riduce significativamente la crescita e la formazione delle cisti. Nonostante ciò, la somministrazione cronica di TH libero può causare effetti collaterali, quali aritmie e iperfiltrazione. Con l’obiettivo di minimizzare questi effetti negativi e massimizzare l’efficacia terapeutica del trattamento, sono state sviluppate delle nanoparticelle contenenti T4 (NanoT4), il precursore di T3,

in grado di rilasciare T4 in modo specifico e controllato solo alle cellule malate del rene. I primi risultati di questo studio mostrano che (i) le NanoT4 non danno segni di tossicità, (ii) sono altamente specifiche e (iii) rilasciano in modo controllato T4. Infine, i risultati mostrano che il trattamento con Nano T4 è ancora più efficace di T4 libero nel ridurre la formazione delle cisti in un modello ottenuto in laboratorio con cellule di pazienti.

161

Genetic renal disease

Syndactyly-telecanthus-anogenital and renal malformations syndrome

THE LONG TAIL OF A STAR: A MATTER OF CELL DIFFERENTIATION IMPAIRMENT AND ABERRANT CYTOSKELETAL DYNAMICS TO EXPLAIN STAR SYNDROME PHENOTYPE

Paccosi Elena[1], D. Guzzon[1], L. Proietti De Santis[1]

[1] Viterbo, Università Della Tuscia

Project: GJC22057; Proietti de Santis Luca

STAR syndrome is a rare X-linked dominant developmental disorder due to mutations of the FAM58A gene encoding for Cyclin M, a poorly known protein binding partner of Cyclin-dependent kinase 10. CycM acts as an inhibitor of ciliogenesis in favor of Actin stress fibers formation and its loss of function gives rise to abnormally elongated cilia. STAR syndrome is characterized by toe Syndactyly, Telecanthus, Anogenital and Renal malformations. Even if it was recently classified as a ciliopathy, the molecular causes of its severe phenotype are still obscure. Our hypothesis is that the complex STAR phenotype might be explained by an impairment of ciliogenesis, affecting both the signaling cascades involved in cell fate determination and the specialized cytoskeletal architecture of certain differentiated cell types. Our studies, taking advantage of both STAR patients-derived cells and human cell line models edited by CRISPR/Cas9 system to recapitulate patients mutations, helped us to understand that CycM defects hamper the proper localization of the ciliary protein Ift88, which results to be diffused along the entire elongated cilium in CycM KO cells. Ift88 is a subunit of the intraflagellar transport (IFT) particle complex B and its knockdown has been shown to block the assembly of primary cilia and cell differentiation as a consequence of defective ciliary Hh signaling. The fact that this protein displays an aberrant localization may be at the basis of an hampering in stem cells differentiation into renal lineage. Along this line, we observed that the renal podocyte cell line display, after CycM KO, both differentiation defects and deregulation of those actin networks implicated in podocytes responsiveness to mechanical stress, thus hampering their proper functionality. Successful conclusion of our studies will improve our knowledge of the mechanisms at the basis of STAR syndrome and hopefully lay the groundwork for development of therapeutic approaches.

Malattie genetiche renali

Sindattilia-telecanto- malformazioni anogenitali e renali; STAR; Sindrome STAR; Sindattilia con malformazioni renali e anogenitali;

LA LUNGA CODA DI UNA STELLA: UNA QUESTIONE DI COMPROMISSIONE DEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE E DI DINAMICHE CITOSCHELETRICHE ABERRANTI PER SPIEGARE IL FENOTIPO DELLA SINDROME STAR

La sindrome STAR è un raro disturbo dello sviluppo dominante legato al cromosoma X dovuto a mutazioni del gene FAM58A che codifica per la ciclina M, un partner di legame proteico poco noto della chinasi ciclina-dipendente 10. La ciclina M agisce come un inibitore della ciliogenesi a favore della formazione di fibre di stress di actina e la sua perdita di funzione dà origine a ciglia anormalmente allungate. La sindrome STAR è caratterizzata da sindattilia, telecanto, malformazioni anogenitali e renali. Anche se è stata recentemente classificata come ciliopatia, le cause molecolari del suo grave fenotipo sono ancora oscure. La nostra ipotesi è che il complesso fenotipo STAR sia dovuto a una compromissione della ciliogenesi, colpendo sia le cascate di segnalazione coinvolte nel differenziamento sia l'architettura citoscheletrica. I nostri studi, sfruttando sia le cellule derivate dai pazienti STAR sia i modelli di linee cellulari umane modificati dal sistema CRISPR/Cas9 per ricapitolare le mutazioni dei pazienti, ci hanno aiutato a comprendere che i difetti di CycM ostacolano la corretta localizzazione della proteina ciliare Itf88, che risulta essere diffusa lungo l'intero ciglio allungato nelle cellule CycM KO. Il knockdown di Ift88 ha dimostrato di bloccare l'assemblaggio dei cigli primari e la differenziazione cellulare come conseguenza della segnalazione Hh ciliare difettosa. Il fatto che questa proteina mostri una localizzazione aberrante potrebbe essere alla base di un ostacolo nel differenziamento delle cellule renali. Inoltre la linea cellulare dei podociti renali mostra, dopo CycM KO, sia difetti di differenziamento che deregolamentazione dell'actina implicata nella reattività dei podociti allo stress meccanico, ostacolandone così la corretta funzionalità. La conclusione positiva dei nostri studi migliorerà la nostra conoscenza dei meccanismi alla base della sindrome STAR e, auspicabilmente, getterà le basi per lo sviluppo di approcci terapeutici.

162

Genetic renal disease

Tuberous Sclerosis Complex

MODELING TUBEROUS SCLEROSIS COMPLEX IN KIDNEY ORGANOIDS: UNCOVERING THE ROLE OF TFEB IN PATHOGENESIS AND DISEASE PROGRESSION

Gagliotta Salvatore[1], M. Testa[1], J. Salzano[1], J. Monfregola[1] A. Ballabio[1], L. Staiano[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: GSA24D011; Staiano Leopoldo

Tuberous Sclerosis Complex (TSC) is a rare genetic disorder caused by mutations in the TSC1 and TSC2 tumor suppressor genes, leading to hyperactivation of mTORC1. This hyperactivation promotes the growth of benign tumors in various organs with kidney-related complications such as angiomyolipomas, epithelial cysts, and renal cell carcinoma being the primary cause of mortality in adult patients. Recent studies highlight the pivotal role of TFEB in mTORC1 hyperactivation and kidney cystogenesis in TSC2-deficient mouse models, suggesting that TFEB inhibition might mitigate these phenotypes. However, mouse models fail to fully replicate the human kidney's pathology, particularly the scattered second-hit mutations and loss of heterozygosity in TSC loci. To overcome these limitations, we used human pluripotent stem cells to generate kidney organoid models to dissect TFEB role in TSC pathology. We established two complementary models: a complete TSC2 knockout to study full loss-of-function effects and a conditional, scattered deletion model simulating second-hit mutations. The latter was

achieved using a tetracycline-controlled shRNA expression system, integrated into the AAVS1 locus, enabling precise TSC2 suppression upon tetracycline administration. Our findings reveal that both models have nuclear TFEB localization and upregulation of its target genes, underscoring TFEB's role in TSC-associated kidney pathology. TSC2-deficient organoids exhibit pronounced mTORC1 hyperactivation, this increase was directly linked to key pathological hallmarks, including pronounced cystogenesis, distal tubule enlargement, and enhanced angiogenesis. Notably, both models displayed elevated markers of epithelial-to-mesenchymal transition suggesting a possible mechanism underlying tissue remodeling and disease progression in TSC-related kidney pathology. This study establishes kidney organoids as a powerful model for dissecting TSC pathophysiology and evaluating new therapeutic strategies.

Malattie genetiche renali

sclerosi Tuberosa; Complesso della Sclerosi tuberosa; ST; TSC; Sindrome di Bourneville

SVILUPPO DI NUOVI MODELLI DI ORGANOIDI RENALI PER ESPLORARE IL RUOLO DI TFEB NELLA SCLEROSI TUBEROSA

La Sclerosi Tuberosa (TSC) è una malattia genetica rara dovuta a mutazioni nei geni oncosoppressori TSC1 e TSC2, che causano l'iperattivazione del complesso mTORC1. Questo fenomeno favorisce la formazione di tumori benigni e complicanze renali come angiomiolipomi, cisti epiteliali e carcinoma a cellule renali, come una delle principali cause di mortalità nei pazienti adulti. Studi recenti evidenziano il ruolo cruciale di TFEB nell'iperattivazione di mTORC1 e nella cistogenesi renale in modelli murini TSC2-deficienti, suggerendo che inibire TFEB potrebbe ridurre questi effetti. Tuttavia, i modelli murini non replicano appieno la complessità della patologia renale umana, inclusa la presenza di mutazioni secondarie sparse e la perdita di eterozigosità. Per superare tali limiti, abbiamo generato organoidi renali da cellule staminali pluripotenti umane per studiare la patologia TSC e il ruolo di TFEB. Abbiamo sviluppato due modelli: uno completamente deficiente di TSC2 per analizzare la perdita totale di funzione e un modello condizionale con mutazioni sparse, ottenuto tramite un sistema shRNA controllato dalla tetraciclina, integrato nel locus AAVS1, che consente una soppressione precisa di TSC2. Entrambi i modelli mostrano localizzazione nucleare di TFEB e maggiore espressione dei suoi geni bersaglio, confermando il ruolo di TFEB nella patologia renale associata alla TSC. Gli organoidi privi di TSC2 evidenziano una marcata iperattivazione di mTORC1, associata a cistogenesi pronunciata, ingrandimento dei tubuli distali e angiogenesi. Inoltre, abbiamo rilevato un aumento di marcatori della transizione epitelio-mesenchimale, suggerendo un possibile meccanismo di rimodellamento tissutale e progressione della malattia. Questo studio dimostra come gli organoidi renali siano una piattaforma promettente per investigare i meccanismi della TSC e sviluppare nuove terapie mirate contro mTORC1 e TFEB nella patologia renale.

163

Genetic renal disease

UMOD-related autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease

DIETARY INTERVENTIONS AS A THERAPEUTIC STRATEGY IN AN ER-STORAGE DISEASE OF THE KIDNEY

Cratere Mariapia[1], B. Perrone[1], C. Schaeffer[1], L. Rampoldi[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GMR23T2167 ; Rampoldi Luca

Uromodulin-related Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease (ADTKD-UMOD) is a rare genetic cause of end-stage kidney disease, characterized by tubulointerstitial inflammation and fibrosis for which a specific therapeutic strategy is still an unmet clinical need. UMOD mutations share a common gain-of-function effect and lead to retention and aggregation of misfolded uromodulin in the endoplasmic reticulum (ER), inducing ER stress and ascribing ADTKD-UMOD as an ER storage disease. Other key phenotypes are dysfunctional mitochondria, increased apoptosis and defective autophagy in uromodulin expressing cells. Dietary interventions (DI) have been demonstrated to be beneficial in different pathological settings characterized by altered proteostasis and inflammation. Our preliminary results suggest similar effects in the context of ADTKD-UMOD. Indeed, in a transgenic mouse model recapitulating the human disease, DI started at an early disease stage reduce mutant uromodulin aggregates and inflammation, preventing fibrosis and decline of kidney function. Stemming on these data, we aim at assessing the therapeutic potential of DI at advanced disease stages, to provide the proof-of-principle that diet modulation could block disease progression and revert already established kidney damage. By exploiting spatially resolved transcriptomics, we will dissect the molecular pathways induced by DI and contributing to improve disease phenotype. As a complementary and alternative strategy, we plan to test pharmacological compounds mimicking functional effects of the identified DI. The results obtained may pave the way for the use of specific therapies for ADTKD-UMOD. Furthermore, our data will contribute to gain insight on disease pathogenesis with the potential of identifying new targets for therapeutic interventions. Finally, this study could have relevance for other kidney diseases converging to kidney fibrosis and inflammation and/or for other toxic proteinopathies.

Malattie genetiche renali

Nefropatia tubulo-interstiziale autosomica dominante correlata a UMODADTKD correlata a UMOD; ADTKD-UMOD; MCKD2; Malattia cistica della midollare renale tipo 2; Nefropatia associata all'uromodulina; Nefropatia iperuricemica giovanile familiare tipo 1

INTERVENTI DIETETICI COME POSSIBILE STRATEGIA TERAPEUTICA IN UNA MALATTIA RENALE DA ACCUMULO NEL RETICOLO ENDOPLASMATICO

La nefropatia tubulo-interstiziale autosomica dominante correlata a uromodulina (ADTKD-UMOD) è una rara causa genetica di insufficienza renale cronica, caratterizzata da infiammazione e fibrosi renale, per la quale non esistono terapie specifiche. Le mutazioni in UMOD condividono lo stesso effetto di guadagno di funzione e causano ritenzione e aggregazione di uromodulina mutata nel reticolo endoplasmatico (RE), inducendo stress del RE. ADTKD-UMOD è pertanto classificata tra le malattie da accumulo nel RE. Altri fenotipi chiave includono disfunzione mitocondriale, aumentata apoptosi ed alterata autofagia nelle cellule esprimenti UMOD. L'uso di interventi dietetici (ID) ha dimostrato benefici in vari contesti patologici caratterizzati da alterata proteostasi e infiammazione. I nostri risultati preliminari suggeriscono un effetto simile nel contesto di ADTKD-UMOD. In un modello murino, infatti, questi ID riducono l'aggregazione di uromodulina mutata e l'infiammazione, prevenendo la fibrosi e il declino della funzione renale, se iniziati ad uno stadio precoce di malattia.

Basandoci su questi dati, intendiamo valutare il potenziale terapeutico e l'efficacia di ID nel bloccare la progressione e nel riparare il danno tissutale già in atto in fasi avanzate della malattia. Mediante analisi di trascrittomica spaziale, analizzeremo le vie molecolari attivate dagli ID che contribuiscono al miglioramento del fenotipo renale. Come strategia complementare e alternativa, testeremo composti farmacologici che mimano gli effetti funzionali degli ID identificati. I risultati ottenuti potrebbero aprire la strada all'utilizzo di terapie specifiche per ADTKD-UMOD. Inoltre, i nostri dati contribuiranno a chiarire la patogenesi della malattia e potrebbero portare all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici. Infine, questo studio potrebbe assumere una rilevanza più generale per malattie renali caratterizzate da infiammazione e fibrosi e/o altre proteinopatie.

164

Genetic renal disease

UMOD-related autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease

REN-related autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease

ROLE OF QUALITY CONTROL IN THE EARLY SECRETORY COMPARTMENT IN AUTOSOMAL DOMINANT TUBULOINTERSTITIAL KIDNEY DISEASE

Rampoldi Luca[1], F. Ghirotto[2], C. Schaeffer[1], C. Tesoriero[2] M.P.G. Cratere[1], F. Greco[2], A. Vettori[2], L. Rampoldi[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele
[2]Verona, Università Di Verona

Project: GJC21104; Rampoldi Luca, Vettori Andrea

Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease (ADTKD) is a disorder caused by mutations in UMOD, REN, MUC1, SEC61A1 and HNF1B that leads to chronic kidney disease. UMOD and a subset of REN mutations lead to mutant protein accumulation in the endoplasmic reticulum (ER) and activation of the Unfolded Protein Response (UPR). During UPR, an increased leakage of ER resident proteins has been reported. Such proteins are ligands of KDEL receptors (KDELR) that retrieve them from the Golgi to the ER. We showed that, among the 3 KDELRs, KDELR3 is consistently overexpressed in different in vitro and in vivo ADTKD models. In this project, we aim at characterizing the role of KDELR3 in physiological conditions and in the pathogenesis of ER storage diseases, regarding ADTKD as a paradigm disorder. To this end, we generated cell and zebrafish models with genetic ablation of KDELR3. Transcriptional profiling of cells knock-out for KDELR3 unraveled the dysregulation of pathways related to extracellular matrix and inflammation. Interestingly, KDELR3 has no effect on the activation of signaling cascades reported downstream of KDELR1. Stratification of the lack of KDELR3 with inducible expression of GFP, wild type or ER retained mutant (L381P) renin does not affect cell viability. Characterization of the cell proteome and secretome and identification of dysregulated signaling pathways by targeted phosphoproteome are currently ongoing. The absence of KDELR3 in zebrafish is associated with mild phenotypic features, including subtle morphological changes and reduced fitness. Notably, we observed a dysregulation of ER stress-associated genes, supporting a role of KDELR3 in ER homeostasis. We also generated a zebrafish transgenic line specifically expressing the human renin mutant L381P in juxtaglomerular cells. Interestingly the L381P mutant exhibits defective pronephros development. The stratification of the lack of KDELR3 in the context of L381P expression is under development.

Malattie genetiche renali

Nefropatia tubulo-interstiziale autosomica dominante correlata a UMODADTKD correlata a UMOD; ADTKD-UMOD; MCKD2; Malattia cistica della midollare renale tipo 2; Nefropatia associata all'uromodulina; Nefropatia iperuricemica giovanile familiare tipo 1

Nefropatia tubulo-interstiziale autosomica dominante correlata a REN

RUOLO DEL CONTROLLO QUALITÀ NELLA VIA SECRETORIA CELLULARE NELLA NEFROPATIA TUBULOINTERSTIZIALE AUTOSOMICA DOMINANTE

La nefropatia tubulointerstiziale autosomica dominante (ADTKD) è una patologia causata da mutazioni in UMOD, REN, MUC1, SEC61A1 e HNF1B che porta alla malattia renale cronica. Le mutazioni in UMOD e alcune mutazioni di REN portano all'accumulo della proteina mutata nel reticolo endoplasmatico (RE) e all'attivazione dell'Unfolded Protein Response (UPR). Durante l'UPR aumenta l'uscita di proteine residenti nel RE. Queste proteine sono ligandi dei recettori KDEL (KDELR) che le riportano dal Golgi al RE. Abbiamo dimostrato che, tra i 3 KDELR, KDELR3 è costantemente sovraespresso in diversi modelli in vitro ed in vivo di ADTKD. In questo progetto, ci proponiamo di caratterizzare il ruolo di KDELR3 in condizioni fisiologiche e nella patogenesi delle malattie da accumulo nel RE, considerando ADTKD come modello. Abbiamo generato linee cellulari e di zebrafish knock-out per KDELR3. Il profilo trascrizionale delle cellule KO per KDELR3 mostra la disregolazione di pathways legati alla matrice extracellulare e all'infiammazione. KDELR3 non ha alcun effetto sull'attivazione di vie di segnalazione che sono attivate da KDELR1. La stratificazione dell'assenza di KDELR3 con l'espressione inducibile di GFP, di renina wild type o mutata, ritenuta nel RE (L381P), non influisce sulla vitalità cellulare. La caratterizzazione del proteoma e del secretoma cellulare e l'identificazione dei pathway alterati mediante fosfoproteoma sono in corso. L'assenza di KDELR3 in zebrafish è associata a lievi cambiamenti fenotipici (cambiamenti morfologici e ridotta fitness). Inoltre, si evidenzia una disregolazione dei geni dell'UPR, suggerendo un ruolo di KDELR3 nell'omeostasi del RE. Abbiamo inoltre generato una linea transgenica di zebrafish che esprime la renina umana mutata L381P specificamente nelle cellule juxtaglomerulari. Questi pesci hanno un diffetto di sviluppo del pronefro. La stratificazione della mancanza di KDELR3 nel contesto dell'espressione di L381P è in fase di sviluppo.

165

Genetic hepatic disease

Wilson disease

Prion protein promotes copper toxicity in Wilson disease

R. Petruzzelli[1], F. Catalano[1], R. Crispino[1], E. Polishchuk[1], M. Battipaglia[1], Piccolo[1], E. Biasini[2], R. Chiesa[1], R. Polishchuk[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)
[2]Povo, Università Di Trento

Project: TGM22CBDM05; Polishchuk Roman

Copper (Cu) is a vitally important micronutrient whose balance between essential and toxic levels requires a tightly regulated network of proteins which handle metal uptake, intracellular distribution, storage, and export. Mutations in key components of this network lead to severe aberrations of Cu homeostasis causing fatal inherited disorders. The components of the Cu-transporting machinery that can be targeted to normalize Cu homeostasis in these disorders remain poorly explored. Here, using genome wide screening, we identified the cellular prion protein (PrP) as an important mediator of Cu toxicity in Wilson disease, a fatal genetic disease caused by mutations in the hepatic Cu efflux transporter ATP7B. We found that Cu accumulation in ATP7B-deficient hepatic cells stimulates the expression of PrP, which in turn drives endocytic Cu uptake leading to toxic Cu overload. PrP suppression significantly limits Cu accumulation and toxicity in ATP7B-deficient cells and reduces liver damage in a mouse model of Wilson disease. These findings underscore an important regulatory role of PrP in copper metabolism and open new opportunities to explore the therapeutic potential of PrP suppression in Wilson disease.

Malattie genetiche epatiche

malattia di Wilson; degenerazione epatolenticolare;

LA PROTEINA PRIONICA PROMUOVE LA TOSSICITÀ DEL RAME NELLA MALATTIA DI WILSON.

Il rame è un micronutriente di vitale importanza, il cui equilibrio tra livelli essenziali e tossici richiede una rete strettamente regolata di proteine che si occupano dell'assorbimento, della distribuzione intracellulare e dell'esportazione del metallo. Le mutazioni nei componenti chiave di questa rete portano a gravi alterazioni dell'omeostasi del rame, causando malattie ereditarie fatali. I componenti del macchinario di trasporto del rame che potrebbero essere bersagliati per normalizzare l'omeostasi del rame in queste malattie rimangono poco esplorati. Qui, utilizzando uno screening genome-wide, abbiamo identificato la proteina prionica cellulare (PrP) come un mediatore importante della tossicità del rame nella malattia di Wilson, una malattia genetica fatale causata da mutazioni nel trasportatore epatico del rame ATP7B. Abbiamo scoperto che l'accumulo di rame nelle cellule epatiche carenti di ATP7B stimola l'espressione di PrP, che a sua volta guida l'assorbimento endocitico del rame, portando a un sovraccarico tossico. La soppressione di PrP limita significativamente l'accumulo e la tossicità del rame nelle cellule carenti di ATP7B e riduce il danno epatico in un modello murino della malattia di Wilson. Questi risultati sottolineano un importante ruolo regolatorio di PrP nel metabolismo del rame e aprono nuove opportunità per esplorare il potenziale terapeutico della soppressione di PrP nella malattia di Wilson.

166

Genetic hepatic disease

Wilson disease

COPPER-MEDIATED DNA DAMAGE INFLUENCES AAV INTEGRATION PROFILES IN GENE THERAPY AND GENOME EDITING FOR WILSON DISEASE

A. Padula[1], C. Cipriani[2], L. Rudilosso[2], R. De Cegli[1], A. Carissimo[3] E. Montini[2], D. Cesana[2], P. Pasquale[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)
[2]Milan, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[3]Naples, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: TGM23MFU08; Piccolo Pasquale

Wilson Disease (WD) is a genetic disorder caused by mutations in the ATP7B gene, leading to toxic copper buildup in the liver and other organs. Liver-directed gene therapy using adeno-associated viral (AAV) vectors shows potential for WD and is currently in clinical trials. Although most AAV genomes remain episomal, they can integrate into the host genome, raising genotoxicity concerns. AAV integration preferentially occurred at DNA double-strand breaks (DSB) and we found that human ATP7B-/- hepatocytes were more susceptible to DSB generation in response to copper challenge. Consistently, increased DSBs were observed in ATP7B-deficient human and mouse livers relative to controls. Surprisingly, upregulation of genes involved in homology-directed repair (HDR) was found in ATP7B-deficient human hepatocytes and mouse livers. We investigated AAV integration profiles in Atp7b-/- mice treated with classic gene therapy and genome editing. Genome editing involved HDR-mediated targeted integration of a promoterless human mini-ATP7B cDNA into the albumin locus (Alb-ATP7B), while the gene replacement vector included a mini-ATP7B cDNA under a liver-specific promoter (HLP-ATP7B). Control vectors with GFP (Alb-GFP and TBG-GFP) were also tested. Livers injected with HLP-ATP7B showed a 100-fold increase in integration site (IS) number compared to TBG-GFP controls, suggesting integration events provided selective advantage to gene therapy-treated hepatocytes. Conversely, similar IS numbers were found with genome editing and respective control vectors. HLP-ATP7B-treated mice showed higher clonal diversity, whereas genome editing vectors showed a more oligoclonal profile. Gene enrichment analysis of IS revealed over-representation of genes linked to liver damage, with the albumin gene frequently targeted. These findings underscore the importance of disease conditions in determining AAV integration and the need for further investigation into AAV-based therapies' safety in WD.

Malattie genetiche epatiche

malattia di Wilson; degenerazione epatolenticolare;

L'INTEGRAZIONE DEI VETTORI AAV NELLA TERAPIA GENICA PER LA MALATTIA DI WILSON È INFLUENZATA DAL DANNO AL DNA MEDIATO DAL RAME

La malattia di Wilson (MW) è causata da mutazioni nel gene ATP7B, con conseguente accumulo tossico di rame nel fegato. La terapia genica con vettori adeno-associati (AAV) è promettente e in fase di sperimentazione clinica. Sebbene la maggior parte dei genomi AAV rimanga episomica, una frazione può integrarsi nel genoma dell'ospite, comportando un potenziale rischio di genotossicità. Abbiamo osservato che gli epatociti umani ATP7B-/- e i fegati di modelli murini e pazienti con MW mostrano un aumento delle rotture a doppio filamento del DNA (DSB) in risposta al rame, accompagnato da una aumentata espressione dei geni della riparo per ricombinazione omologa (HDR). Abbiamo analizzato l'integrazione dell'AAV nei topi Atp7b-/- trattati con terapia genica convenzionale o editing genomico. L'editing ha sfruttato l'integrazione mirata di un mini-cDNA ATP7B nel locus dell'albumina (Alb-ATP7B), mentre la terapia genica classica ha utilizzato un mini-cDNA sotto un promotore epatico (HLP-ATP7B). Controlli iniettati con vettori GFP (Alb-GFP, TBG-GFP) sono stati inclusi nello studio. I fegati trattati con HLP-ATP7B hanno mostrato un aumento di 100 volte nei siti di integrazione (IS) rispetto ai controlli TBG-GFP, suggerendo un vantaggio selettivo per gli epatociti integrati. Al contrario, l'editing genomico ha prodotto un numero di IS simile ai controlli. La terapia genica ha generato una maggiore

diversità clonale, mentre l'editing ha mostrato un profilo oligoclonale. L'analisi genica ha evidenziato frequenti eventi di integrazione in geni associati al danno epatico, inclusa l'albumina. Questi dati suggeriscono che lo stress ossidativo e il danno al DNA influenzano l'integrazione dell'AAV, evidenziando la necessità di valutare attentamente la sicurezza delle terapie AAV per la MW.

167

Genetic hepatic disease

Retinitis pigmentosa

Lysosomal storage disease

THERAPEUTIC HOMOLOGY-INDEPENDENT TARGETED INTEGRATION IN RETINA AND LIVER

ESPOSITO FEDERICA[1], **A. Padmanabhan**[1], **S. Auricchio**[1], **F. Dell'Aquila**[1], **P. Sureda horrach**[1], **R. Di Cunto**[1], **I. Trapani**[1] **E. Marrocco**[1], **M. Lupo**[1], **A. Auricchio**[1]

[1]*Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)*

Project: TGM22MT04; Auricchio Alberto

"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 Rhodopsin (P23H RHO) mutation. Using a P23H knock-in mouse model, we show that AAV-HITI efficiently targets photoreceptors in mice with 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. We show that neonatal AAV-HITI is effective in different mouse models of inherited diseases, in which we achieve stable therapeutic levels of systemic proteins. 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."

Malattie genetiche epatiche

Retinite pigmentosa; RP;

Malattie da accumulo lisosomiale;

INTEGRAZIONE TERAPEUTICA INDIPENDENTE DALL' OMOLOGIA PER LA RETINA E IL FEGATO

La terapia genica con vettori virali adeno associati (AAV) offre grande potenziale per garantire l'espressione a lungo termine di transgeni terapeutici dopo una singola somministrazione. Tuttavia, rimangono alcune sfide significative, tra cui l' effcicacia nel trattamento di malattie con mutazioni con guadagno di funzione, che non traggono beneficio dalla tradizionale terapia di sostituzione genica, e l'ottenimento di un'espressione persistente del transgene in tessuti proliferanti, come il fegato neonatale, dato che il DNA AAV è prevalentemente episomale. Per superare queste limitazioni, abbiamo utilizzato un editing genomico basato sull'integrazione mirata indipendente dall'omologia (HITI) di un transgene terapeutico mediata dal sistema CRISPR/Cas9.

Abbiamo sviluppato l'approccio AAV-HITI per trattare una forma autosomica dominante di Retinite Pigmentosa dovuta a una mutazione prevalente del gene della Rodopsina (P23H RHO). Utilizzando un modello murino knock-in con la mutazione P23H, dimostriamo che AAV-HITI raggiunge efficacemente i fotorecettori nei topi, migliorando il fenotipo retinico.

Inoltre, per affrontare il problema dell'espressione persistente del transgene mediata da AAV nel fegato, abbiamo sviluppato AAV-HITI per raggiungere il locus altamente trascritto dell'Albume di topo (mAlb). Dimostriamo che l'AAV-HITI somministrato in fase neonatale è efficace in diversi modelli murini di malattie ereditarie, nei quali otteniamo livelli terapeutici stabili di proteine sistemiche.

Nel complesso, questi risultati supportano l'applicazione di AAV-HITI per il trattamento di malattie che colpiscono diversi organi e che non possono essere affrontate con la tradizionale terapia genica AAV.

168

Genetic eye disease

Retinitis pigmentosa

UNCOVER OF MOLECULAR MECHANISM UNDERLYING NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF PEDF PEPTIDES AS THERAPEUTIC AGENTS FOR INHERITED RETINAL DEGENERATION

Marigo Valeria[1], **A. Bigninati**[1], **E. Adani**[1], **S. D'Alessandro**[1]

[1]*Modena, Università Di Modena E Reggio Emilia*

Project: GMR24T2052; Marigo Valeria

We developed two delivery approaches for long-term treatment of degenerating retina using H105A, a pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide, and demonstrated its neuroprotective effects in murine and human disease models of retinitis pigmentosa (RP). Here we propose to characterize the treatment time window and the molecular targets of H105A in degenerating retinas. Aims: 1) Assess the efficacy of H105A in RP mutant retinas treated post-onset of degeneration; 2) Conduct transcriptome analysis of murine RP retina upon delivery of H105A; 3) Validate pathways targeted by H105A in other murine and human models of retinal degeneration. Background/Rationale Inherited RP leads to significant vision loss due to mutations in various genes, presenting challenges for therapeutic development due to the high genetic heterogeneity. Neuroprotection, that targets common denominators of different forms of RP, may benefit a broad patient population. PEDF, a natural retinoprotective protein, and its derivative peptide H105A, show promising potential for RP therapeutics. Research design and methods for achieving the stated objectives Building on previous preclinical studies, we propose to test preservation of retinal photoreceptors and their function upon treatments in retinas after degeneration has started; characterize changes in gene expression in single cells as response to H105A in one model of RP; assess changed expressed genes in a second

RP mouse and in a human organoid retinal degeneration model. Anticipated output Our study aims to advance H105A towards clinical translation and define optimal intervention time frames for RP treatment.

Malattie genetiche dell'occhio

Retinite pigmentosa; RP;

CARATTERIZZAZIONE DEI MECCANISMI MOLECOLARI DEGLI EFFETTI NEUROPROTETTIVI DI PEPTIDI DERIVATI DA PEDF CONE AGENTI TERAPEUTICI PER DEGENERAZIONI RETINICHE EREDITARIE

La retinite pigmentosa (RP) è causata dalla perdita delle cellule che rispondono alla luce nella retina. La maggior parte delle forme di RP non è oggi curabile e, sebbene singolarmente siano rare, insieme costituiscono una delle principali cause di grave perdita visiva e cecità nella popolazione in età lavorativa. Poiché la RP presenta caratteristiche genetiche eterogenee, la neuroprotezione, che mira ai meccanismi comuni di morte cellulare, può giovare a un numero elevato di pazienti, indipendentemente dalla singola mutazione. Abbiamo identificato un piccolo peptide, H105A, da una proteina naturale presente nell'occhio il pigment epithelium-derived factor (PEDF), in grado di rallentare la degenerazione in modelli murini di RP e anche in un modello basato su organoidi umani. In questo progetto intendiamo definire la finestra terapeutica per la somministrazione di H105A per aiutare la selezione dei pazienti in base allo stadio della degenerazione retinica. In secondo luogo, intendiamo caratterizzare le cellule bersaglio dell'H105A nella retina trattata. Queste informazioni sono importanti per la traslazione del trattamento alla clinica. L'obiettivo a lungo termine di questa proposta è lo sviluppo di un protocollo di trattamento per i pazienti affetti da degenerazione retinica ereditaria, mirando agli eventi dannosi attivati nella maggior parte delle forme della malattia.

169

Genetic eye disease

Retinitis pigmentosa

A MEMBRANE-TARGETED PHOTOSWITCH RESTORES PHYSIOLOGICAL ON/OFF RESPONSES TO LIGHT IN THE DEGENERATE RETINA

DI MARCO STEFANO[1], F. Benfenati[2], G. Ziraldo[2], S. Cupini[2], V. Sesti[3], C. Bertarelli[3], G. Lanzani[2], E. Delfino[2]

[1]Genova, Università Di Genova
[2]Genova, Istituto Italiano Di Tecnologia (IIT)
[3]Milano, Politecnico Di Milano

Project: GMR22T2013; Benfenati Fabio

The lack of effective therapies for visual restoration in Retinitis pigmentosa has pushed to pioneer therapeutical strategies to replace dead photoreceptors, including optogenetics and retinal prostheses. However, the resulting visual restoration is poor mainly because of the massive light-evoked activation of retinal neurons, irrespective of the physiological segregation of visual information in ON and OFF channels responsible for contrast sensitivity and spatial resolution. Here, we show that a recently characterized membrane-targeted photoswitch, Ziapin2, which intercalates within the neuronal membrane and bidirectionally modulates its capacitance and excitability, is capable of reinstating, in degenerate retinas, the complexity of the physiological responses to light stimuli that are implemented by a healthy retina. We tested the ex vivo effects of Ziapin2 on blind retinal explants from rd10 mice and RCS rats, two distinct genetic models of photoreceptor degeneration, by recording light-evoked responses from retinal ganglion cells (RGCs) with patch-clamp and high-density multielectrode arrays. Thanks to its dual effect on intrinsic excitability, Ziapin2 reinstated brisk and sluggish ON, OFF, and ON-OFF responses in RGCs evoked by full-field or patterned stimuli, accompanied by the reactivation of excitatory and inhibitory conductances impinging on RGCs. Pharmacological dissection of retinal processing revealed that the light-dependent effects of Ziapin2 occurred at the bipolar cell level, followed by reactivation of light computation in the entire retinal network. When tested in vivo, a single intravitreal injection of Ziapin2 in fully blind 6-month-old rd10 mice restored light-driven behaviour and optomotor reflexes, with concomitant activation of RGC populations similar to sighted animals. The results indicate that Ziapin2 is a promising molecule for reinstating physiological visual responses at late stages of retinal degeneration.

Malattie genetiche dell'occhio

Retinite pigmentosa; RP;

UN FOTOINTERRUTTORE MIRATO ALLA MEMBRANA RIPRISTINA LE RISPOSTE FISIOLOGICHE ON/OFF ALLA LUCE NELLA RETINA DEGENERATA

La mancanza di terapie efficaci per la Retinite Pigmentosa ha spinto a sviluppare strategie per sostituire i fotorecettori morti, come l'optogenetica e le protesi retiniche. Tuttavia, il recupero visivo è limitato a causa dell'attivazione indiscriminata dei neuroni retinici, senza rispettare la segregazione fisiologica dei canali ON e OFF, cruciali per contrasto e risoluzione spaziale. Qui dimostriamo che Ziapin2, un fotoswitch che modula l'eccitabilità neuronale, può ripristinare risposte fisiologiche alla luce in retine degenerate. Test ex vivo su retine cieche di topi rd10 e ratti RCS, registrati con patch-clamp e array multielettrodo, mostrano che Ziapin2 ristabilisce risposte ON, OFF e ON-OFF rapide e lente nelle cellule gangliari retiniche (RGC), riattivando le conduttanze eccitatorie e inibitorie. L'analisi farmacologica indica che gli effetti di Ziapin2 avvengono a livello delle cellule bipolari, riattivando l'intera rete retinica. Nei test in vivo, una singola iniezione intravitreale in topi rd10 ciechi di 6 mesi ha ripristinato il comportamento guidato dalla luce e i riflessi optomotori, con un'attivazione delle RGC simile agli animali vedenti. I risultati suggeriscono che Ziapin2 è una molecola promettente per il ripristino delle risposte visive fisiologiche nelle fasi avanzate della degenerazione retinica.

170

Genetic eye disease

Leber congenital amaurosis

Retinitis pigmentosa

GAINING INSIGHT INTO THE ROLE OF NONCODING RNAS IN INHERITED RETINAL DISEASE BY RNA-SEQ-BASED APPROACHES

Capasso Dalila[1], P. Brandi[1], G. Petrogiannakis[1], K. A. Ruiz-Ceja[1] M. Zawadzka[1], S. Negueruela[1], S. Santamaria Guillen[1], M. Pizzo[1] F. Capolongo[1], S. Banfi[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22GM03; Banfi Sandro

Inherited retinal diseases (IRDs) are among the most frequent causes of genetic blindness in the Western world. They display high genetic heterogeneity with almost 300 causative genes identified, which a) renders their molecular diagnosis challenging and b) seriously hampers the rapid development of gene-specific therapeutic approaches that can be readily available to a significant number of patients. A deeper knowledge on the contribution of regulatory noncoding RNAs (both microRNAs (miRNAs) and long noncoding RNAs) to the pathogenic mechanisms underlying IRDs is expected to significantly improve both diagnostic efficacy and therapeutic options for this group of diseases. We aimed at exploiting RNA-seq approaches to: 1) reconstruct the architecture of the human retina miRNome with the final goal to identify miRNAs with a potential mutation-independent therapeutic role in IRDs; and 2) identify, by co-expression analysis, long noncoding RNAs expressed in the human retina that potentially contribute to the control of IRD gene expression. To achieve these goals, we made extensive use of RNA-seq datasets (both newly generated and already available) to determine the expression levels and co-expression features of noncoding RNAs in human retina, across a high number of individuals. As a results, we generated a miRNA expression atlas of the human retina and identified several of them whose expression modulation is endowed with a putative protective role in vivo on photoreceptor degeneration progression. Moreover, we identified a subset of photoreceptor-specific long noncoding RNAs significantly co-expressed with IRD genes and potentially involved in their expression regulation. All of these long noncoding RNAs are predicted to play a role in photoreceptor-related functions. These results highlight the value of transcriptome analysis to start dissecting the role of regulatory noncoding RNAs in retinal biology and to uncover their contribution to IRD pathogenesis.

Malattie genetiche dell'occhio

Amaurosi congenita di Leber; LCA;

Retinite pigmentosa; RP;

STUDIO DEL RUOLO DI RNA NON CODIFICANTI NELLE PATOLOGIE RETINICHE EREDITARIE MEDIANTE APPROCCI DI RNA-SEQ

Le patologie retiniche ereditarie (IRD) sono tra le cause più frequenti di cecità genetica del mondo Occidentale. Sono caratterizzate da un'alta eterogeneità genetica, con più di 300 geni causativi identificati, il che complica le procedure di diagnosi molecolare e ostacola il rapido sviluppo di approcci terapeutici gene-specifici applicabili ad un numero significativo di pazienti. Una conoscenza più approfondita del contributo di RNA non codificanti (sia microRNA (miRNA) che long noncoding RNA) nei meccanismi patogenetici alla base delle IRD potrebbe migliorare in modo significativo l'efficacia diagnostica e le possibilità terapeutiche per questo gruppo di patologie. Lo scopo di questo progetto è utilizzare approcci omici per: 1) identificare miRNA con un possibile ruolo terapeutico mutazione/gene-indipendente per le IRD; e 2) identificare long noncoding RNA espressi nella retina umana che potrebbero svolgere un ruolo nella patogenesi delle IRD. Per raggiungere questi obiettivi, abbiamo utilizzato dataset di RNA-seq per determinare i livelli di espressione e co-espressione di RNA non codificanti in campioni di retina umana provenienti da un'ampia coorte di individui. Il risultato è stato la generazione di un atlante di espressione di miRNA da retina umana e l' identificazione di un ampio numero di miRNA la cui modulazione ha mostrato durante esperimenti in vivo un potenziale effetto protettivo sulla progressione della degenerazione dei fotorecettori. Inoltre, abbiamo identificato una serie di long noncoding RNA specificamente espressi nei fotorecettori e che sono co-espressi con geni IRD. Questi ultimi sono predetti avere un ruolo in alcune funzioni specifiche dei fotorecettori in fisiologia e patologia. I nostri risultati evidenziano il valore dell' analisi trascrittomica per decifrare il ruolo di RNA non codificanti nella biologia della retina e per scoprire il loro contributo alla patogenesi delle IRD.

171

Genetic eye disease

Leber hereditary optic neuropathy

Autosomal dominant optic atrophy

MODULATING MIR-181A/B TO TREAT MITOCHONDRIAL OPTIC NEUROPATHIES: A MUTATION-INDEPENDENT STRATEGY

Indrieri Alessia[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22MT01; Indrieri Alessia

Mitochondrial optic neuropathies (MONs) are a group of mitochondrial diseases (MDs) characterized by degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) and optic nerve atrophy, leading to blindness. Among MONs, Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) and Dominant Optic Atrophy (DOA) are the most common, caused by mutations in different nuclear or mitochondrial genes. Therapeutic options are limited, and genetic heterogeneity represent a challenge for gene/mutation-specific treatments in a substantial fraction of patients. Therefore, gene/mutation-independent strategies targeting common pathways underlying RGC damage may offer promising alternatives. MicroRNAs are a potential therapeutic tool due to their ability to regulate multiple pathways, coordinating their activity. We previously demonstrated that the inactivation of miR-181a/b exerts protective effects in MD models, including LHON, by modulating mitochondrial biogenesis and mitophagy. To explore this as a therapeutic strategy for MONs, we generated an Adeno-Associated Viral (AAV) vector expressing a miRNA sponge designed to bind and inhibit miR-181a/b activity. The miR-181a/b sponge was first tested in chemical (rotenone) and genetic (Ndufs4KO) mouse models of LHON. Remarkably, mice treated with AAV-miR-181a/b sponge showed increased mitochondrial turnover and significant improvement in visual function. We also tested the effect of the sponge in DOA models. Interestingly, the miR-181a/b sponge enhanced mitochondrial biogenesis, reduced fragmentation, and decreased apoptosis in OPA1-deficient cells. Finally, we showed that AAV-miR-181a/b sponge significantly ameliorates visual function in Opa1+/Q285STOP mice. Importantly, the therapy also demonstrated high specificity and an excellent safety profile in the mouse retina. These results suggest that AAV-mediated miR-181a/b sponge therapy could be a promising gene/mutation-independent approach for MONs, with the potential for clinical translation.

Malattie genetiche dell'occhio

Neuropatia ottica ereditaria di Leber; Atrofia ottica di Leber; LHON;

Atrofia ottica autosomica dominante; DOA;

MODULAZIONE DI MIR-181A/B PER IL TRATTAMENTO DELLE NEUROPATIE OTTICHE MITOCONDRIALI: UNA STRATEGIA INDIPENDENTE DALLA MUTAZIONE

Le neuropatie ottiche mitocondriali (MONs) sono un gruppo di malattie mitocondriali (MDs) caratterizzate dalla degenerazione delle cellule gangliari retiniche (RGCs) e dall'atrofia del nervo ottico. La Neuropatia Ottica Ereditaria di Leber (LHON) e l'Atrofia Ottica Dominante (DOA) sono le MON più comuni, causate da mutazioni in vari geni nucleari o mitocondriali. Le opzioni terapeutiche per le MON sono limitate e l'eterogeneità genetica rappresenta un ostacolo per le strategie gene o mutazione specifiche, rendendole inefficaci per una significativa parte dei pazienti. Pertanto, strategie indipendenti dalla mutazione, mirate a vie comuni coinvolte nel danno delle RGCs, potrebbero offrire alternative promettenti. I microRNA rappresentano un potenziale strumento terapeutico grazie alla loro capacità di regolare più vie cellulari in modo coordinato. Abbiamo precedentemente dimostrato che l'inattivazione dei miR-181a/b esercita effetti protettivi in modelli di LHON, modulando la biogenesi mitocondriale e la mitofagia. Per esplorare questa strategia terapeutica, abbiamo generato un vettore virale adeno-associato (AAV) che esprime un inibitore dei miR-181a/b (miR-181a/b sponge). L'AAV-miR-181a/b sponge Il miR-181a/b sponge è stato testato in modelli murini di LHON, sia chimici che genetici, inducendo un aumento del turnover mitocondriale e un significativo miglioramento della funzione visiva. Inoltre l'inibizione dei miR-181a/b aumenta la biogenesi mitocondriale, riduce la frammentazione e diminuisce l'apoptosi nelle cellule deficienti di OPA1 (modello di DOA). Infine, abbiamo dimostrato che l'AAV-miR-181a/b sponge migliora significativamente la funzione visiva dei topi Opa1+/Q285STOP. Inoltre la terapia ha mostrato un eccellente profilo di sicurezza ed un un'elevata specificità nella retina murina. Questi risultati suggeriscono che la terapia con AAV-miR-181a/b sponge potrebbe rappresentare un approccio promettente per le MONs con potenziale applicazione clinica

172

Genetic eye disease

Schnyder corneal dystrophy

UBIAD1 AND FERROPTOSIS, EXPLORING A CURE FOR SCHNYDER CORNEAL DYSTROPHY

P. Lugato[1], E. Zambon[1], M. Santoro[1], R. Castro[1]

[1]Padova, Università Di Padova

Project: GGP20003; Santoro Massimo

Schnyder Corneal Dystrophy (SCD) is a rare autosomal dominant genetic disease characterized by high penetrance, that leads to cholesterol accumulation in the cornea, and eventually visual loss. Currently, there are no therapies to prevent or slow down the disease, and the only option is cornea transplantation. SCD is associated with specific mutations on the UBIAD1 (UBiA prenyltransferase Domain-containing protein-1) gene, a prenyltransferase that catalyzes the synthesis of CoQ10. Asparagine-102 substitution with a serine (N102S) is the most frequently altered UBIAD1 mutation in SCD patients. Ubiad1 and CoQ10 plays an important role by suppressing ferroptosis, an iron-dependent programmed cell death characterized by lipid peroxidation We obtained samples from patients diagnosed with corneal opacification and performed genomic DNA sequencing of the UBIAD1 gene. From 4 samples obtained we observed 2 patients with the N102S UBIAD1 variant. We used a genetic Knock-in model carrying the murine analog mutation of the UBIAD1 gene (N100S) to study the role of ferroptotic cell death in the context of SCD. We measured plasma levels of CoQ9 (the murine analog of CoQ10 in humans) and observed a decrease with age but not across different genotypes. Using an in vitro cell culture model, we transduced a plasmid construct containing an EGFP-tagged version of wild type or mutated N102S UBIAD1 in cervical epithelial immortalized cells (HeLa) and observed increased levels of cytosolic ROS and lipid peroxidation. Ex vivo isolated MEFs from mice with wild type (WT) Ubiad1 gene, heterozygous, and homozygous Ubiad1 N100S, showed increased lipid peroxides levels in knock-in mice compared with the WT counterpart. We are currently characterizing the effects of increased cholesterol using HFD and in combination with the LDLr KO mice to parse out the role of supplemented cholesterol in the progression of SCD. Identifying UBIAD1-based mechanisms will lead to developing novel SCD therapies.

Malattie genetiche dell'occhio

Distrofia corneale di Schnyder; Distrofia corneale cristallina di Schnyder; Distrofia corneale cristallina; SCCD; SCD;

UBIAD1 E FERROPTOSIS: ALLA RICERCA DI UNA CURA PER LA DISTROFIA CORNEALE DI SCNHYDER.

La Distrofia Corneale di Schnyder (SCD) è una malattia genetica rara autosomica dominante ad alta penetranza, che comporta l'accumulo di colesterolo nella cornea e cecità. Al momento non esistono terapie per prevenire o rallentare la progressione della malattia e l'unica opzione disponibile è il trapianto di cornea. La Distrofia di Schnyder è associata a mutazione a livello del gene Ubiad1 (UBiA prenyltransferase Domain-containing protein-1), una prenil-transferasi che catalizza la sintesi del CoQ10. La mutazione più frequente è una sostituzione dell'asparagina 102 con una serina. La ferroptosi è un tipo di morte cellulare programmata, caratterizzata dalla perossidazione dei lipidi di membrana, nella quale CoQ10 gioca un ruolo chiave inibendo il processo agendo come un antiossidante di membrana endogeno. Abbiamo ottenuto campioni da pazienti diagnosticati con opacificazione della cornea, ed abbiamo sequenziato il gene Ubiad1 dal DNA genomico. Da 4 campioni analizzati, siamo riusciti ad individuare 2 pazienti con la variante N102S. Abbiamo utilizzato un modello murino con il knock-in della mutazione N100S (analogo della mutazione N102S negli umani) per studiare il ruolo della ferroptosi nella patologia. Abbiamo misurato i livelli plasmatici di CoQ9 (l'analogo murino di CoQ10 negli umani), osservando una diminuzione con l'età, ma nessuna differenza tra i diversi genotipi. Utilizzando un modello in vitro abbiamo trasdotto un vettore contenente la variante WT e N102S di UBIAD1 fusa con una eGFP in cellule immortalizzate di epitelio cervicale (HeLa) osservando un aumento dei livelli di ROS citosolici e perossidazione lipidica. MEF isolati ex vivo da topi con mutazione N100S in eterozigosi e omozigosi hanno inoltre mostrato un aumento in perossidazione lipidica in confronto con con MEF WT. Stiamo inoltre caratterizzando gli effetti di aumentati livelli di colesterolo indotti da HFD in combinazione con LDLr KO per studiare il ruolo del colesterolo in SCD.

173

Genetic eye disease

Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft lip/palate syndrome (EEC syndrome)

TOWARDS CUSTOMIZED ALLELE-SPECIFIC CRISPR/CAS GENE EDITING FOR THE TREATMENT OF OCULAR SURFACE DISORDER IN EEC SYNDROME

De Rosa Laura[1], A. Fabrizi[1], K. Russo[1], S. Rosignoli[2], A. Paiardini[2] M. De Luca[1], S. Rinaldo[2], S. Zacchino[1]

[1]Modena, Università Di Modena E Reggio Emilia
[2]Roma, Università Di Roma La Sapienza

Project: GGP20088; De Luca Michele

Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Cleft Lip (EEC) syndrome is a rare, dominantly inherited genetic disorder caused by TP63 mutations. Patients often exhibit skeletal abnormalities such as polysyndactyly and cleft lip palate. In most cases, the depletion of limbal stem cells leads to progressive blindness. While surgical interventions can address skeletal deformities, there remains a critical unmet medical need for corneal blindness, a condition that severely diminishes the quality of life for those affected. Here, we propose an allele-specific gene editing approach to correct the R280C (C>T) TP63 mutation associated with ocular defects. By leveraging the proximity of an -NGG PAM sequence near the C>T mutation, we designed a guide RNA (gRNA) for SpCas9 to target the mutant allele selectively. For comparison, the ribonucleoprotein (RNP) complex was electroporated into primary keratinocytes from EEC patients and healthy human keratinocytes. Since the only difference between the two alleles is the R280C mutation, healthy keratinocytes provided a stringent test for off-target effects of SpCas9. Our analyses showed no off-target editing in normal keratinocytes while achieving highly efficient knockout of the mutant allele in EEC-derived cells. These results highlight the ability of the SpCas9+gRNA complex to selectively and precisely target the mutated allele. Furthermore, given p63's crucial role in stem cell proliferation and differentiation, we confirmed that editing occurred specifically in the mutated allele of EEC epidermal stem cells. To ensure safety, we are investigating (1) potential off-target sites using multiple approaches, confirming the absence of unintended edits, and (2) the transcriptome profile of edited EEC cells. These findings suggest the feasibility of using CRISPR/Cas9 technology to specifically knock out TP63 mutations, thereby restoring p63 activity and offering a potential therapeutic strategy to address blindness in EEC patients.

Malattie genetiche dell'occhio

Sindrome EEC; Ectrodattilia - displasia ectodermica - labiopalatoschisi;

VERSO UN'EDITING GENETICO CRISPR/CAS ALLELE-SPECIFICO PERSONALIZZATO PER IL TRATTAMENTO DEI DISTURBI DELLA SUPERFICIE OCULARE NELLA SINDROME EEC.

La sindrome EEC è un raro disturbo genetico dominante causato da mutazioni in TP63, caratterizzato da anomalie scheletriche (polisinodattilia, labiopalatoschisi) e, spesso, cecità progressiva dovuta alla perdita di cellule staminali limbari. Sebbene la chirurgia corregga le deformità scheletriche, manca un trattamento efficace per la cecità corneale, che compromette gravemente la qualità della vita. Proponiamo un editing genetico allele-specifico per correggere la mutazione R280C (C>T) di TP63, sfruttando una sequenza -NGG PAM vicina al sito mutato per progettare un gRNA per SpCas9 mirato all'allele mutante. Il complesso RNP è stato elettroporato in cheratinociti di pazienti EEC e soggetti sani per valutare gli effetti off-target. Le analisi hanno mostrato un'efficiente eliminazione dell'allele mutante nei cheratinociti EEC, senza modifiche indesiderate nei cheratinociti sani, confermando la precisione dell'editing SpCas9+gRNA. Inoltre, data l'importanza di p63 nella proliferazione delle cellule staminali, abbiamo verificato che l'editing ha interessato specificamente l'allele mutato nelle cellule staminali epidermiche dei pazienti. Per garantire la sicurezza, stiamo esaminando (1) i siti off-target, confermando l'assenza di modifiche indesiderate, e (2) il profilo trascrittomico delle cellule EEC modificate. I risultati suggeriscono la fattibilità dell'uso della tecnologia CRISPR/Cas9 per correggere mutazioni in TP63, ripristinando l'attività di p63 e offrendo una possibile strategia terapeutica per la cecità nei pazienti con la sindrome EEC.

174

Genetic eye disease

Stargardt disease

MUTATION-INDEPENDENT GENOME EDITING APPROACHES FOR TREATMENT OF STARGARDT DISEASE

Trapani Ivana[1], F. Fioretto[1], E. Pugni[1], M. Sansonetti[1], A. Casciello[1] M. Cascone[1], F. Razzano[1], N. Mazzaro[1], M. Lupo[1], E. Marrocco[1] E. Tenderini[1], X. Bujanda Cundin[1], G. Gambardella[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22MFU10; Trapani Ivana

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 1) sequence-specificity, that limits its applicability to diseases with high allelic heterogeneity; 2) 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 (AAV) vector-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. Accordingly, we have developed multiple candidate sets of AAV-Abca4 vectors for targeting either the murine or the human ABCA4 gene. We side-by-side compared the different approaches in vitro, in both murine and human cell lines, and found that they effectively mediate template integration at the endogenous locus, resulting in ABCA4 expression. Subretinal delivery of the AAV-based genome editing approaches in the retina of Abca4-/- mice results in targeted DNA template integration and reconstitution of Abca4 expression in transduced photoreceptors at levels that were found to ameliorate the STGD1 phenotype in Abca4-/- mice. Further evaluation of the efficacy of our strategies in human iPSC-derived 3D retinal organoids is ongoing.

Malattie genetiche dell'occhio

Malattia di Stargardt; Stargardt 1; Fundus flavimaculatus;

Approcci innovativi dell'editing del genoma per il trattamento della Malattia di Stargardt

L'editing genomico tramite il sistema CRISPR-Cas9 è un campo della ricerca biomedica che sta guadagnando un interesse crescente per il trattamento di diverse malattie. Tuttavia, gli approcci classici di editing genomico presentano ancora alcune limitazioni che hanno finora ostacolato lo sviluppo di approcci efficaci di editing genetico per diverse malattie ereditarie della retina, inclusa la forma più comune di degenerazione maculare ereditaria, la malattia di Stargardt (STGD1), causata da oltre 1200 diverse mutazioni nel gene ABCA4, specifico della retina.

Pertanto, in questo progetto, il nostro obiettivo è sviluppare nuove strategie di editing genomico basate su vettori virali adeno-associati (AAV) per l'integrazione di lunghi frammenti di DNA nel gene ABCA4, al fine di correggere multiple mutazioni utilizzando un unico frammento correttivo di DNA. Per ottenere l'integrazione del frammento correttivo, abbiamo pianificato di esplorare diversi meccanismi di riparo del DNA attivi nei fotorecettori, che rappresentano le cellule bersaglio per il trattamento della STGD1.

A tale scopo, abbiamo sviluppato diversi set di vettori AAV-Abca4 per correggere sia il gene ABCA4 murino che umano. Abbiamo confrontato in parallelo le diverse strategie in vitro, sia in linee cellulari murine che umane, e abbiamo osservato che queste risultano in efficace l'integrazione nel locus endogeno, portando all'espressione di ABCA4. La somministrazione sottoretinica degli approcci di editing genomico basati su AAV nella retina di topi Abca4-/- risulta in efficiente integrazione del frammento correttivo di DNA nel locus Abca4 endogeno e ricostituzione dell'espressione di Abca4 nei fotorecettori, a livelli che risultano in efficacia terapeutica. Sulla base di tali risultati promettenti è attualmente in corso un'ulteriore valutazione dell'efficacia delle nostre strategie in organoidi retinici 3D derivati da iPSC umane.

175

Genetic gastroenterological disease

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy

DONOR: MODELING CHRONIC INTESTINAL PSEUDO-OBSTRUCTION WITH RAD21-DEPENDENT MOLECULAR MECHANISMS

Bonora Elena[1]

[1]*Bologna, Università di Bologna*

Project: GMR23T1033; De Giorgio Roberto

Chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO) is a severe gut dysmotility disorder mimicking a mechanical obstruction. Our group identified in a recessive form of CIPO the homozygous missense change p.A622T in RAD21. RAD21 is expressed in mitotic and post-mitotic tissues, including neurons of the enteric nervous system (ENS), and coordinates cell transcription as part of the cohesin multiprotein complex. We generated a rad21 conditional knock-in mouse (rad21KIA626T) expressing mutant Rad21 under the Wnt1 promoter, to test whether the p.A626T change (homologous to human p.A622T) affects ENS morpho-functional integrity thereby leading to gut dysmotility. Immunofluorescence analysis in the small (jejunum)and large intestine showed that the total number of myenteric neurons did not change in homozygous rad21KIA626T vs. wild-type mice (WT), but ChAT-positive neurons were fewer (rad21KIA626T 19.33±2.94 vs. WT 35.56±4.10; P=0.015 jejunum; rad21KIA626T 20.14±2.66 vs. WT 40.94±7.52; P=0.026 colon). Synaptophysin immunolabeling revealed a significant decrease staining in mutant mice vs. WT in the small (P= 0.0003) and large (P<0.0001) intestine, indicating reduced synaptic connectivity. Compared to WT, there was an increased gut transit time in mutant mice (260.5±20.9 vs. 190.0±12.3 min; P=0.0213), with a reduction in mean active force (P=0.0087) and motility index (P=0.0022) from ex-vivo organ bath contractility analysis. Bulk RNA-seq studies of mutant vs. WT tissues (jejunum) revealed 33 differentially expressed transcripts with FDR<0.05,, including genes involved in splicing (Gemin4), neuronal microtubule formation (Tppp) and gut permeability (Cldn2). In conclusion, the rad21KIA626T mouse is reminiscent of the clinical phenotype caused by RAD21 mutation, with evidence of a selective intestinal cholinergic neuronal depletion affecting intestinal transit and motility.

Malattie genetiche gastroinstestinali

Pseudo-ostruzione intestinale cronica; CIPO; POIC; Miopatia Visiscerale familiare; Megadudeno e/o megacisti; Miopatia ereditaria da viscere cave; miopatia familiare da viscere cave;

DONOR: MODELING DELLA PSEUDO-OSTRUZIONE INTESTINALE CRONICA DOVUTA AI MECCANISMI MOLECOLARI DIPENDENTI DA RAD21

La pseudo-ostruzione intestinale cronica (POIC) è un grave disturbo della motilità intestinale che mima un'ostruzione meccanica. Il nostro gruppo ha identificato in una forma recessiva di POIC la variante missenso in omozigosi p.A622T in RAD21. RAD21 è espresso nei tessuti mitotici e post-mitotici, compresi i neuroni del sistema nervoso enterico (SNE), e coordina la trascrizione cellulare come parte del complesso multiproteico di coesione. Abbiamo generato un topo knock-in condizionale rad21 (rad21KIA626T) che esprime la formas mutata di Rad21 sotto il promotore Wnt1, per verificare se il cambio p.A626T (omologo al p.A622T umano) influenza l'integrità morfo-funzionale dello SNE, portando così alla dismotilità intestinale. L'analisi di immunofluorescenza nell'intestino tenue (digiuno) e colon ha mostrato che il numero totale di neuroni mienterici non cambiava nei topi omozigoti rad21KIA626T rispetto ai topi wild-type (WT), ma i neuroni ChAT-positivi erano meno (rad21KIA626T 19,33±2,94 rispetto ai topi WT 35,56±4,10; P=0,015 digiuno; rad21KIA626T 20,14±2,66 rispetto a WT 40,94±7,52 P=0,026 colon). Il segnale in immunofluorescenza della sinaptofisina ha rivelato una significativa diminuzione nei topi mutanti rispetto al WT nell'intestino tenue (P = 0,0003) e crasso (P <0,0001), indicando una ridotta connettività sinaptica. Rispetto al WT, è stato osservato un aumento del tempo di transito intestinale nei topi mutati (260,5±20,9 vs. 190,0±12,3 min; P=0,0213), con una riduzione della forza media (P=0,0087) e dell'indice di motilità (P=0,0022) dall'analisi della contrattilità ex vivo. Studi di RNA-seq su tessuti mutati rispetto a tessuti WT (digiuno) hanno rivelato 33 trascritti differenzialmente espressi con FDR <0,05, inclusi geni coinvolti nello splicing (Gemin4), nella formazione di microtubuli neuronali (Tppp) e nella permeabilità intestinale (Cldn2). In conclusione, il topo rad21KIA626T riproduce il fenotipo clinico causato dalla mutazione RAD21.

176

Genetic gastroenterological disease

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy

ER INVOLVEMENT IN VISCERAL MYOPATHY ONSET

Viti Federica[1], "C. Picco[1], P. Garbati[1], R. Alfieri[2], R. Barbieri[1] M.G. Faticato[1], R. Magrassi[1], M. De Rosa[2], I. Ceccherini[1]

[1]Genova, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GSA22Q001; Viti Federica

The ACTG2-R257C variant is responsible for one of the most recurrent and severe forms of visceral myopathy (VSCM), an ultra-rare, life-threatening genetic disease causing the impairment of intestinal peristalsis. The molecular mechanism underlying its onset has not been clearly elucidated yet. Mutations affecting the ACTG2 gene seem to compromise cell contraction ability. Our previous studies, carried out on commercial human intestinal smooth muscle cell transfected to express ACTG2R257C, suggested - from RNAseq data e calcium imaging - the possible involvement of the endoplasmic reticulum (ER) and the unfolding protein response (UPR). To better explore this hypothesis, we validated such findings on primary smooth muscle cells (SMCs) isolated from affected patients (2 independent lines) and controls (7 independent lines). Results partially confirmed the involvement of the UPR: we observed a larger ER, a greater amount of oxidative stress and, sporadically, the up regulation of UPR markers in the contraction of affected lines, which does not emerge in contraction of controls samples. Calcium imaging experiments also confirmed results obtained on transfected cells: VSCM-affected cells stimulated with Carbachol displayed significantly lower calcium levels in contraction compared to controls. When using Thapsigargin to block SERCA pump, there was a small (non-significant) difference in calcium released from intracellular stores between VSCM-affected and control cells. In the light of these encouraging results, in the next future we will increase the number of primary cell lines by strengthening National/International collaborations. Moreover, edited cell lines harbouring the mutation are being developed. Finally, we are starting to administer UPR modulator drugs in primary cell lines (in a drug-repurposing perspective), to evaluate their effectiveness in restoring physiological features in vitro, with potential applications in a pilot clinical study.

Malattie genetiche gastroinstestinali

Pseudo-ostruzione intestinale cronica; CIPO; POIC; Miopatia Visiscerale familiare; Megadudeno e/o megacisti; Miopatia ereditaria da viscere cave; miopatia familiare da viscere cave;

COINVOLGIMENTO DI ER NELL'INSRGENZA DELLA MIOPATIA VISCERALE

La variante ACTG2-R257C è responsabile di una delle forme più ricorrenti e gravi di miopatia viscerale (VSCM), una malattia genetica ultra rara e pericolosa che causa la compromissione della peristalsi intestinale. Il meccanismo molecolare alla base della sua insorgenza non è stato ancora totalmente chiarito. Le mutazioni che colpiscono il gene ACTG2 sembrano compromettere la capacità di contrazione cellulare. Nostri studi preliminari, condotti su cellule muscolari lisce (SMC) intestinali umane commerciali trasfettate per esprimere ACTG2-R257C, suggerivano - da dati RNAseq e imaging del calcio - il possibile coinvolgimento del reticolo endoplasmatico (ER) e della unfolded protein response (UPR). Per approfondire questa ipotesi, abbiamo convalidato tali risultati su SMC primarie, isolate da pazienti affetti (2 linee) e controlli (7 linee). I risultati hanno parzialmente confermato il coinvolgimento dell'UPR: abbiamo osservato un ER più grande, una maggior livello di stress ossidativo e, sporadicamente, la upregolazione dei marcatori UPR nella contrazione delle linee affette, che non emerge nella contrazione dei campioni di controllo. Anche gli esperimenti di imaging del calcio hanno confermato anche i risultati ottenuti sulle cellule trasfettate: le cellule affette da VSCM stimolate con Carbachol hanno mostrato livelli di calcio significativamente più bassi in contrazione rispetto ai controlli. Quando si utilizza Thapsigargin per bloccare la pompa SERCA, è stata riscontrata una piccola differenza (non significativa) nel calcio rilasciato dai depositi intracellulari tra le cellule affette da VSCM e quelle di controllo. In futuro aumenteremo il numero di linee cellulari primarie rafforzando le collaborazioni nazionali/internazionali. Inoltre, si stanno sviluppando linee cellulari editate per indurre la mutazione. Infine, stiamo iniziando a somministrare farmaci modulatori dell'UPR su cellule primarie, in prospettiva di potenziali studi clinici pilota.

177

Genetic gastroenterological disease

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy

STRUCTURAL BASES OF ACTG2-DEPENDENT SMOOTH MUSCLE MYOPATHIES - DRUGGABILITY OF ACTG2 FILAMENT POCKET

Chiappori Federica[1], L. Airaghi[2], M. Bollati[2], F. Viti[3], M. de Rosa[2]

[1]Segrate, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[3]Genova, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GSA23K003; de Rosa Matteo

"Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction (CIPO) aka Visceral Myopathy (VSCM; OMIM#155310) is a rare and orphan genetic disease characterized by impaired intestinal peristalsis, requiring lifelong total parenteral nutrition. The most recurrent pathogenic mutations in ACTG2, encoding γ-enteric smooth muscle actin, include R40C, R178H/C, and R257C [PMID: 33294969]. These variants alter actin cytoskeletal dynamics, disrupting filament structure. Our recent findings identify a pocket in the wild-type (wt) ACTG2 filament, near R257, which is absent in mutant filaments. This pocket enables an interaction between chains, suggesting a potential site for pharmacological stabilization. This study aims to evaluate the druggability of (mutated) ACTG2, in the context of novel explorative pharmacological strategies. In particular, we want to identify small molecules able to bind wt and ACTG2 mutants, to restore the chains interaction thus stabilizing the mutated filament. We have been applying a virtual high throughput screening protocol to dock a library of 18000 approved small molecules (FDA, DBa, TTDa, NIH and TF_target, obtained from ZINC db), against the filament in the wt form, as well as in the three mutant forms, R40C, R178H and R257C. The screening returned a subset of 38 molecules with an estimated Ki lower than 1 nM for the wt, these were further analyzed by a more accurate docking screening protocol, to check their capability to bind both wt and mutants. Among this subset we want to select molecules able to interact to both chains forming the cavity. Best binders according to the in silico analysis will be experimentally evaluated in actin polymerization and depolyperization assays, using the purified proteins. Moreover, we plan, using the phalloidin binding pocket as binding

site, to screen the same small molecule dataset and commercially available phalloidin analogues, to identify a molecule able to stabilize the filament conformation despite the mutation."

Malattie genetiche gastroinstestinali

Pseudo-ostruzione intestinale cronica; CIPO; POIC; Miopatia Visiscerale familiare; Megadudeno e/o megacisti; Miopatia ereditaria da viscere cave; miopatia familiare da viscere cave;

BASI STRUTTURALI DELLE MIOPATIE DELLA MUSCOLATURA LISCIA ACTG2-DIPENDENTI - TARGETTABILITÀ DELLA TASCA DEL FILAMENTO ACTG2

La pseudo-ostruzione intestinale cronica (CIPO), altrimenti miopatia viscerale (VSCM; OMIM#155310), è una malattia genetica rara e orfana caratterizzata da ridotta peristalsi intestinale, che richiede nutrizione parenterale per tutta la vita. Le mutazioni patogene più ricorrenti in ACTG2, che codifica per l'actina del muscolo liscio γ-enterico, includono R40C, R178H/C e R257C [PMID: 33294969]. Queste alterano la dinamica citoscheletrica dell'actina, interrompendo la struttura del filamento. Le nostre recenti analisi identificano una tasca nel filamento ACTG2 wild-type (wt), vicino a R257, assente nei filamenti mutanti. Questa tasca consente un'interazione tra catene, suggerendo un potenziale sito per la stabilizzazione farmacologica. Questo studio mira a valutare la targettabilità dell'ACTG2 (mutato), nel contesto di nuove strategie farmacologiche. S'intende identificare piccole molecole capaci di legare ACTG2 wt e mutanti per ripristinare l'interazione delle catene e stabilizzare il filamento mutato. Abbiamo applicato un protocollo di screening virtuale ad alto rendimento per testare una libreria di 18000 piccole molecole approvate (FDA, DBa, TTDa, NIH e TF_target, ottenute da ZINC db), contro il filamento wt e nelle tre forme mutanti, R40C, R178H e R257C. Lo screening ha restituito 38 molecole con un Ki stimato inferiore a 1nM che sono state rianalizzate per verificare la loro capacità di legare sia il wt che i mutanti, selezionando molecole in grado di interagire con entrambe le catene formanti la cavità. I migliori ligandi secondo l'analisi in silico saranno valutati sperimentalmente in saggi di polimerizzazione/depoliperizzazione dell'actina, su proteine purificate. Inoltre, intendiamo analizzare lo stesso dataset, utilizzando la tasca di legame della falloidina come sito di legame, includendo analoghi della falloidina disponibili in commercio, per identificare una molecola in grado di stabilizzare la conformazione del filamento nonostante la mutazione.

178

Genetic respiratory disease

Cystic fibrosis

TARGETING IL-17 SIGNALLING TO MODULATE INFLAMMATION AND ENHANCE HOST DEFENCE IN CYSTIC FIBROSIS LUNG INFECTIONS

Lorè Nicola[1], C. Ferrari[1], F. Saliu[1], F. Nicola[1], C. Chernichero[1] D. Guidone[2], D. Cirillo[1], L.J.V. Galietta[2]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele"
[2]Naples, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: GMR23T1036; Lorè Nicola

Objectives: Cystic fibrosis (CF) is a rare genetic disease that affects several organs, with major complications observed in the lung. In CF lung IL-17 inflammatory cytokines signal through the IL17RA/RC receptor complex play a critical role in pulmonary defence against CF pathogens. Among CF pathogens, Pseudomonas aeruginosa and Mycobacterium abscessus, are cause of severe chronic pulmonary disease in people with CF (pwCF). Here, we want to unravel the therapeutic potential of targeting the IL-17 to limit immunopathological responses, without altering host defence during chronic infection with CF pathogens. Methods: We infected il17rc-/- mice and wt controls with P. aeruginosa or M. abscessus strains, exploiting preclinical mouse model of chronic lung infection. In addition, we are performing in vitro infection on primary CF human bronchial epithelial cells under air-liquid condition (CF-HBE) with/without M. abscessus infection exploiting single-cell RNAseq technologies. Results: We observed that mice lacking il17rc display a higher susceptibility to CF pathogens, including P. aeruginosa and M. abscessus. Moreover, the depletion of il17rc during chronic infection with P. aeruginosa (28 days) did not alter the percentage of neutrophils and CD4+IFN+ cellular recruitment, while increased levels of CD4+IL-17+ cells. We also focused our attention on the role of IL-17RC in modulating immunity during M. abscessus chronic infection. We determined that il17rc -/- condition display an altered host resistance to M. abscessus infection, while increased pathogenic cells (CD4+ IL-17+) associated with IL-17 mediated response. Moreover, infection with CF-HBE cells treated with or without IL-17RA/RC ligands during bacterial infection, is under investigation. Conclusion: Overall, we expect to identify new mechanisms and provide pre-clinical proof for limiting immunopathological processes occurring during CF chronic infections.

Malattie genetiche respiratorie

Fbrosi Cistica; FC; mucoviscidosi;

MIRARE AL SEGNALE IL-17 PER MODULARE L'INFIAMMAZIONE E POTENZIARE LA DIFESA DELL'OSPITE NELLE INFEZIONI POLMONARI DA FIBROSI CISTICA.

Obiettivi: La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica rara con gravi complicazioni a livello polmonare. Nei polmoni affetti da FC, le citochine infiammatorie IL-17 segnalano attraverso il complesso recettoriale IL17RA/RC, svolgendo un ruolo cruciale nella difesa polmonare contro i patogeni FC. Tra questi, Pseudomonas aeruginosa e Mycobacterium abscessus sono responsabili di gravi malattie polmonari croniche nei pazienti con FC. In questo studio, miriamo a svelare il potenziale terapeutico del targeting di IL-17 per ridurre l'immunopatologia senza compromettere la difesa dell'ospite durante le infezioni croniche da patogeni FC. Metodi: Abbiamo infettato i topi il17rc-/- e i controlli wild-type con ceppi di P. aeruginosa o M. abscessus, sfruttando un modello murino preclinico di infezione polmonare cronica. Inoltre, stiamo conducendo infezioni in vitro su cellule epiteliali bronchiali umane primarie di pazienti con CF (CF-HBE) coltivate in condizioni aria-liquido, con/senza infezione da M. abscessus, sfruttando tecnologie di single-cell RNAseq. Risultati: Abbiamo osservato che i topi il17rc-/- mostrano una maggiore suscettibilità ai patogeni FC, inclusi P. aeruginosa e M. abscessus. Inoltre, la deplezione di il17rc durante un'infezione cronica da P. aeruginosa (28 giorni) non ha alterato la percentuale di neutrofili totali, ma ha aumentato i livelli di cellule CD4+IL-17+. Abbiamo anche approfondito il ruolo di IL-17RC nella modulazione dell'immunità durante l'infezione cronica da M. abscessus. La resistenza a M. abscessus risulta alterata nei topi il17rc-/-, con un aumento delle cellule patogene (CD4+ IL-17+) associate alla risposta mediata da IL-17. Inoltre, stiamo attualmente analizzando l'infezione di cellule CF-HBE trattate con o senza ligandi di IL-17RA/RC durante l'infezione batterica.

Conclusione: Ci aspettiamo di identificare nuovi meccanismi e fornire prove precliniche per limitare l'immunopatologia nelle infezioni croniche CF.

179

Genetic respiratory disease

Cystic fibrosis

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF THE BASIC DEFECT IN CYSTIC FIBROSIS AIRWAY EPITHELIA

Borrelli Anna[1], "A. Venturini[1], D. Guidone[1], M. Genovese[1] M. De Santis[1], M. Renda[1], L. J.V. Galietta[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22CBDM10; Galietta Luis Juan Vicente

Epithelial cells of the airways play a defensive role against environmental pathogens through the "muco-ciliary clearance" (MCC) process, in which motile cilia of ciliated cells rhythmically beat immersed in the airway surface liquid (ASL) that covers and lubricates the airway surface. MCC removed microbes that are trapped in the mucus secreted by goblet cells. Transepithelial ion transport is important in modulating hydration, viscosity, and pH of the ASL. MCC is compromised in cystic fibrosis (CF), a genetic disease caused by defective function of the CFTR chloride channel. Loss of chloride secretion in CF causes airway surface dehydration with enhanced mucus viscosity. This condition leads to microbial colonization and chronic inflammation. Our overall goal is to find novel pharmacological strategies to restore MCC in CF. We pursue this goal by: i) developing new pharmacological correctors to target CF mutations causing CFTR mistrafficking; ii) identifying small molecules to address premature termination codons (PTCs); iii) improving MCC through the modulation of alternative ion channels and transporters. Regarding PTCs, we have recently identified by high-throughput screening a small set of inhibitors of the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, the process that degrades mRNA transcripts carrying a PTC. These molecules can be useful, in combination with read-through agents, to correct the defects caused by PTCs. Regarding alternative targets, we found that inflammatory stimuli in vitro mimicking the conditions of CF airways negatively impact mucociliary function by increasing periciliary fluid viscosity via activation of ENaC, ATP12A, and SLC26A4 proteins. We are currently investigating how pharmacological modulation of these targets can normalize ASL properties.

Malattie genetiche respiratorie

Fbrosi Cistica; FC; mucoviscidosi;

NUOVE STRATEGIE FARMACOLOGICHE PER LA CORREZIONE DEL DIFETTO DI BASE IN FIBROSI CISTICA

Le cellule epiteliali delle vie aeree svolgono un ruolo cruciale nella difesa contro i patogeni che possono raggiungere l'apparato respiratorio attraverso l'aria inspirata. Un importante meccanismo di difesa è il trasporto muco-ciliare, in cui i microbi sono intrappolati dal muco ed eliminati attraverso il battito delle ciglia che ricoprono l'epitelio. L'efficienza del trasporto muco-ciliare dipende dal grado di idratazione della superficie epiteliale, condizione che, a seguito della perdita di funzione della proteina CFTR, viene alterata nei pazienti con fibrosi cistica (FC). Nelle vie respiratorie di tali pazienti si osserva di conseguenza colonizzazione microbica e infiammazione cronica. Il nostro obiettivo generale è lo sviluppo di nuovi approcci farmacologici per ripristinare il trasporto muco-ciliare nella FC. Questo obiettivo viene perseguito attraverso due strategie: i) l'identificazione di composti chimici che possono ripristinare la sintesi e/o la funzione della proteina CFTR mutata; ii) il miglioramento del trasporto muco-ciliare attraverso la modulazione di bersagli terapeutici alternativi. Per la prima strategia, stiamo valutando diversi composti che agiscono in maniera specifica a seconda del tipo di mutazione. Alcuni, chiamati correttori, agiscono su mutazioni che causano problemi di maturazione della proteina CFTR. Altri invece agiscono sulle mutazioni nonsenso che causano la produzione di una proteina CFTR tronca. Per quanto riguarda invece la seconda strategia, abbiamo scoperto che stimoli infiammatori, quali quelli che si osservano nelle vie aeree dei pazienti FC, hanno un impatto negativo sul trasporto muco-ciliare aumentando la viscosità del muco tramite l'attivazione delle proteine ENaC, ATP12A e SLC26A4. Stiamo attualmente valutando la possibilità di inibizione farmacologica di tali proteine quale strategia terapeutica alternativa nella FC.

180

Genetic respiratory disease

Cystic fibrosis

Rescue of Mutant CFTR Chloride Channels by a Mimetic Peptide Targeting the A-Kinase Anchoring Function of PI3K?.

Della Sala Angela[1], J. Conti[2], A. Loffreda[3], A. Raimonti[3] C. Tacchetti[3], P. Melotti[2], C. Sorio[2], E. Hirsch[1], A. Ghigo[1]

[1]Torino, Università Di Torino
[2]Verona, Università Di Verona
[3]Milano, Istituto San Raffaele Pisana - IRCCS

Project: GGP20079; Ghigo Alessandra

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the CFTR gene, which encodes a cAMP-activated Cl- channel. The approval of CFTR modulators has opened the possibility of targeting the basic molecular defects underlying CF. Nevertheless, these molecules fail to fully restore the activity of CFTR mutants, and patients with rare mutations are not eligible for these treatments. We previously conceived a cell-permeable PI3Kγ mimetic peptide (PI3Kγ MP) that, by targeting the scaffold activity of PI3Kγ, drives a localized increase in cAMP ensuing for PKA-mediated phosphorylation and opening of wild-type CFTR while synergizes with CFTR modulators in rescuing the function of the most common mutant, F508del-CFTR. Here, we aim at demonstrating that the peptide can be exploited to rescue rare class III-IV CFTR mutants with gating/conductance defects. Preliminary data revealed that PI3Kγ MP rescues the opening of the rare class IV mutant, R334W, that is currently not eligible for modulator treatment. Short-circuit currents (ISC) measurements in intestinal organoids bearing the frameshift mutation 2184insA and the R334W allele shows that acute application of PI3Kγ MP increases CFTR conductance up to 6 and 12 folds when applied alone or in association with forskolin, respectively. In contrast, Ivacaftor, the potentiator used for CFTR variants with gating defects fails to restore the conductance of the channel. Intriguingly, in 2184insA/R334W organoids the peptide retains the ability to increase ISC in the presence of a CFTR inhibitor with the residual current returning to baseline after addition of inhibitors of basolateral Ca2+-activated

K+ channels and of the Na-K-Cl cotransporter, which are known to increase the electrochemical driving force for luminal Cl- secretion. These results uncover the PI3Kγ MP as an effective means of rescuing the activity of the rare R334W variant through a direct action on the CFTR protein and an indirect effect on the electrical driving force.

Malattie genetiche respiratorie

Fbrosi Cistica; FC; mucoviscidosi;

RECUPERO DEL CANALE DEL CLORO CFTR MUTATO MEDIANTE UN PEPTIDE MIMETICO MIRATO ALLA FUNZIONE DI ANCORAGGIO DELLA A-CHINASI DI PI3K?.

La fibrosi cistica (CF) è causata da mutazioni nel gene CFTR, che codifica un canale del cloro (Cl^-) attivato dal cAMP. L'approvazione di modulatori di CFTR ha aperto nuove possibilità terapeutiche, mirando ai difetti molecolari alla base della malattia. Tuttavia, questi farmaci non ripristinano completamente l'attività delle varianti mutate di CFTR e non sono disponibili per pazienti con mutazioni rare. Abbiamo precedentemente sviluppato un peptide mimetico di PI3Kγ (PI3Kγ MP), permeabile alle cellule, che, interagendo con l'attività scaffold di PI3Kγ, induce un aumento localizzato di cAMP, favorendo la fosforilazione mediata da PKA e l'apertura del canale. Inoltre, il peptide agisce in sinergia con i modulatori di CFTR nel recupero della funzione della mutazione più comune, F508del-CFTR. In questo studio, dimostriamo che PI3Kγ MP può essere sfruttato per recuperare mutazioni rare di classe III-IV di CFTR, caratterizzate da difetti di apertura o conduttanza. Dati preliminari mostrano che PI3Kγ MP ripristina l'apertura della mutazione rara di classe IV, R334W, attualmente non idonea al trattamento con modulatori. Le misurazioni delle correnti a corto circuito (ISC) in organoidi intestinali portatori dell'allele R334W rivelano che l'applicazione acuta di PI3Kγ MP aumenta la conduttanza di CFTR fino a 6 e 12 volte, rispettivamente, se applicato da solo o in associazione con forskolina. Al contrario, Ivacaftor, un potenziatore per CFTR, non riesce a ripristinare la conduttanza del canale. Inoltre, in presenza di inibitore di CFTR il peptide mantiene la capacità di aumentare l'ISC, con corrente residua che ritorna ai livelli basali dopo aggiunta di inibitori dei canali K^+ attivati dal Ca^{2+} e Na-K-Cl, noti per aumentare la forza elettrochimica di secrezione di Cl^- nel lume. Questi risultati suggeriscono che PI3Kγ MP può essere efficace per il recupero della mutazione rara R334W, agendo direttamente su CFTR e modulando la forza elettrochimica di trasporto ionico."

181

Genetic bone disease

Autosomal recessive malignant osteopetrosis

SINGLE CELL TRANSCRIPTOME OF SPONTANEOUSLY CIRCULATING HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS SUPPORTS LENTIVIRAL MEDIATED GENE THERAPY FOR TCIRG1-OSTEOPETROSIS

Villa Anna[1], V. Capo[1], E. Zonari[1], F. Bedin[1], V. Iannello[1], M. Barcella[1], A. Zecchillo[1], I. Merelli[1], M.M. Naldini[1], B. Gentner[1]

[1]Milano, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)

Project: TGT22C18; Villa Anna

TCIRG1-defective autosomal recessive osteopetrosis (ARO) patients show high counts of circulating hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and defective osteoclast functions, leading to dense bones and reduction of bone marrow space. We are developing lentiviral vector (LV) gene therapy (GT) as an alternative to allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation, relying on the ex vivo manipulation of circulating CD34+ (cCD34+) cells. However, ARO cCD34+ cells are exposed to normoxia and inflammatory molecules that can impact on their stemness. We performed single cell RNA sequencing on CD34+ cells of 3 ARO patients and 3 healthy donors (HD) at steady state and after ex vivo GT and UM171-based expansion. We identified 20 clusters, spanning from primitive HSCs to committed progenitors. At steady-state, ARO cCD34+ cells contain primitive HSCs and multipotent progenitors (MPPs) similarly to HD, but they showed lower content of megakaryocyte/erythroid-biased MPPs in favour of lympho-myeloid primed progenitors. In addition, we observed high frequency of B, dendritic and granulo-monocyte cell progenitors, suggesting that in ARO the lack of adequate BM niches induces circulation of populations normally retained within the BM. After UM171-mediated expansion, we observed maintenance of primitive HSC and MPP subsets in both ARO and HD CD34+ cells, in line with the long-term engrafting and repopulating capacity of the expanded product in NSG mice. UM171-expansion also resulted in the increase of myeloid progenitors, that will contribute to the differentiation of gene-corrected osteoclasts in ARO patients after GT. Notably, no skewing of subset composition was observed after LV transduction. In conclusion, single cell transcriptomic analysis of ARO cCD34+ reveals the peculiar features of HSPC in ARO. Differential gene expression will provide data to optimize therapies and suggest novel pathways regulating CD34+ egress from hematopoietic niches.

Malattie genetiche dell'osso

Osteopetrosi maligna autosomica recessiva; Osteopetrosi maligna infantile;

ANALISI SINGLE CELL TRANSCRIPTOMIC DELLE CELLULE EMATOPOIETCHE STAMINALI CIRCOLANTI NEL SANGUE PERIFERICO SUPPORTANO LA TERAPIA GENICA PER LA CURA DELLA OSTEOPETROSI

I pazienti affetti da ostepetrosis da difetto in TCIRG1 mostrano un alto numero di cellule staminali ematopoietiche circolanti nel sangue periferico e sono caratterizzati da osteoclasti con difetto funzionale che porta ad avere ossa dense con mancanza di spazio del midollo osseo. In questo progetto come alternativa al trapianto allogenico abbiamo sviluppato una piattaforma di terapia genica mediata da un vettore lentivirale associato ad una espansione in vitro delle HSPC circolanti utilizzando UM171. Abbiamo pertanto svolto degli studi di single cell transcriptomica sulle cellule trasdotte ed espanse ottenute da 3 pazienti affetti da TCIRG1 osteopetrosis, che hanno evidenziato caratteristiche peculiari e simile alle cellule del cord blood. In parallelo abbiamo svolto studi in vitro and in vivo che hanno dimostrato la capacità di queste cellule di mantenere stemness, la capacità di differenziarsi nelle diverse linee del sistema ematopoietico e la capacità di engraftare a lungo termine nei topi NSG.

182

Genetic bone disease

Fibrodysplasia ossificans progressiva

EXPLORING THE ROLE OF SPP1 IN MACROPHAGE-OSTEOGENIC CELL CROSSTALK AND ITS INVOLVEMENT IN HETEROTOPIC OSSIFICATION IN FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA

Brunelli Silvia[1], R. Gamberale[1], M. Bergamaschi[1], R. Bocciardi[2] C. D'Orlando[1]

[1]Monza, Università Di Milano Bicocca
[2]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS

Project: GMR24T1043; Brunelli Silvia

Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) is a rare congenital disorder caused by mutations in the ACVR1 gene, leading to heterotopic ossification (HO) in soft tissues. This study investigates the role of SPP1 (osteopontin) in macrophage-osteogenic cell interactions and its contribution to HO progression in FOP, aiming to uncover pathways linking SPP1 to HO and identify novel therapeutic targets.

FOP manifests early, resulting in severe disability and reduced life expectancy. Current therapies, such as Activin-A inhibitors, have limitations, emphasizing the need for alternative strategies. Inflammation, characterized by elevated monocytes and macrophages (MPs), plays a critical role in FOP pathology. Using single-cell transcriptomics on muscle tissue from FOP and control mice at 5 and 7 days post-HO induction, we observed an increased presence of MPs in FOP mice at both intervals and a rise in fibro/adipogenic progenitors (FAPs) by day 7.

SPP1 emerged as a key factor, being significantly upregulated in FOP MPs. As a small integrin-binding glycophosphoprotein, SPP1 is known to influence embryogenesis, wound healing, tumorigenesis, and fibrosis. Our findings show that FOP MP supernatants accelerate osteogenic differentiation in FOP FAPs, an effect replicated by recombinant SPP1. Additionally, we observed increased MMP14 in MPs and elevated Activin-A and TGF-β expression in FOP FAPs.

By elucidating the role of SPP1 in FOP, this research seeks to identify therapeutic targets that could prevent or mitigate abnormal bone growth. Such advancements hold promise for improving treatment options and the quality of life for individuals with this debilitating condition.

Malattie genetiche dell'osso

Fibrodisplasia Ossificante Progressiva; FOP; Miosite ossificante progressiva; Malattia dell'uomo di pietra;

STUDIO DEL RUOLO DI SPP1 NELL'OSSIFICAZIONE ETEROTOPICA NELLA FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA

La Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) è una rara malattia congenita causata da mutazioni nel gene ACVR1, che portano alla formazione di ossificazioni eterotopiche (HO) nei tessuti molli. Questo studio indaga il ruolo di SPP1 (osteopontina) nelle interazioni tra macrofagi e cellule osteogeniche e il suo contributo alla progressione delle HO nella FOP, con l'obiettivo di individuare i meccanismi che collegano SPP1 alle HO e identificare nuovi target terapeutici.

La FOP si manifesta precocemente, causando grave disabilità e una ridotta aspettativa di vita. Le terapie attuali, come gli inibitori di Activin-A, presentano limiti, evidenziando la necessità di approcci alternativi. L'infiammazione, caratterizzata da un aumento di monociti e macrofagi (MP), svolge un ruolo cruciale nella patologia della FOP. Attraverso la trascrittomica a singola cellula su tessuto muscolare di topi FOP e di controllo, a 5 e 7 giorni dall'induzione di HO, abbiamo osservato un aumento dei MP nei topi FOP in entrambi gli intervalli temporali e un incremento dei progenitori fibro/adipogenici (FAP) al giorno 7.

SPP1 è emerso come un fattore chiave, significativamente sovraregolato nei MP dei topi FOP. SPP1 è una piccola glicofosfoproteina legante le integrine, nota per il suo ruolo nell'embriogenesi, nella guarigione delle ferite, nella tumorigenesi e nella fibrosi. I nostri risultati mostrano che i sovranatanti dei MP FOP accelerano la differenziazione osteogenica nei FAP FOP, un effetto replicato dalla somministrazione di SPP1 ricombinante. Inoltre, abbiamo osservato un aumento di MMP14 nei MP e un'espressione elevata di Activin-A e TGF-β nei FAP FOP.

Comprendere il ruolo di SPP1 nella FOP potrebbe consentire l'identificazione di nuovi target terapeutici per prevenire o ridurre la crescita ossea anomala. Questi progressi potrebbero portare allo sviluppo di trattamenti più efficaci, migliorando la qualità di vita dei pazienti affetti da questa condizione debilitante.

183

Genetic bone disease

Fibrodysplasia ossificans progressiva

INVESTIGATING THE INTERPLAY BETWEEN ACVR1/ALK2 SIGNALLING AND AUTOPHAGY IN FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA (FOP)

L. Coculo[1], M. Wits[2], I. Mariani[1], G. Fianco[1], S. Cappato[3] R. Bocciardi[3] , N. Pedemonte[3], E. Volpe[4], S. Rinaldo[5], F. Cutruzzolà[5] D. Trisciuoglio[6], C. Gabellini[7], M. Pucello[6], G. Sanchez-Duffhues[8] M.J. Goumans[2], V. Stagni[6]

[1]Rome, Institute of Molecular Biology and Pathology, National Research Council (CNR), 00185, Rome, Italy
[2]Leiden, Department of Cell & Chemical Biology, Leiden University Medical Center, 2333, ZC Leiden, The Netherlands.
[3]Genova, UOC Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genoa, Italy
[4]Rome, Molecular Neuroimmunology Unit, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Via del Fosso di Fiorano 64, Rome, 00143, Italy
[5]Rome, Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, Piazzale Aldo Moro 5, 00185, Rome, Italy
[6]Rome, Institute of Molecular Biology and Pathology, National Research Council (CNR), 00185, Rome, Italy
[7]Pisa, Università Di Pisa
[8]Oviedo, 8Nanomaterials and Nanotechnology Research Center (CINN), Spanish National Research Council (CSIC), Health Research Institute of Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Asturias, Spain

Project: GSA23I001; Stagni Venturina

An activating heterozygous missense mutation in a Bone morphogenetic protein (BMP) type I kinase receptor, ALK2/ACVR1 (Activin receptor IA/activin-like kinase 2) is found in nearly all patients with the genetic disorder Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP; MIM #135100). The mutant ALK2R206H receptor exhibits loss of auto inhibition of BMP signalling and, differently from the wild type, may be activated by activins. Consequently, the downstream chondrogenic signalling is enhanced, underlying heterotopic ossification (HO) within soft connective tissues. Despite several investigational treatments are being evaluated in clinical trials, to date there is no widely available cure for FOP and the cellular and molecular mechanisms underlying this disease are still being unveiled. Herein, we show a close interplay between ALK2R206H mutant receptor signalling and dysregulation of the autophagic flux under hypoxic conditions. Mechanistically, reduced autophagic flux correlates with increased stability of mutant ALK2

receptor, thereby sustaining mutant receptor signalling. Of note, we demonstrated that Rapamycin inhibits chondrogenic differentiation in FOP cells in an autophagy dependent manner. Consistently, other pharmacological autophagy inducers, like Spermidine, can delay ALK2R206H driven chondrogenic differentiation in vitro. More importantly, we confirmed these data in cells derived from FOP patients. Overall, this study clarified the complex signalling network regulated by aberrant ALK2R206H mutant receptor signalling, and pointed out the attention of how new combined strategies for FOP treatment are urgently needed.

Malattie genetiche dell'osso

Fibrodisplasia Ossificante Progressiva; FOP; Miosite ossificante progressiva; Malattia dell'uomo di pietra;

STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA LA VIA DI SEGNALAZIONE AUTOFAGICA E DEL RECETTORE ACVR1/ALK2 NELLA FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA (FOP)

Una mutazione puntiforme eterozigote attivante in un recettore chinasi di tipo I delle proteine morfogenetiche ossee (BMP), ALK2/ACVR1 (recettore dell'activina IA/chinasi simile all'activina 2), è presente in quasi tutti i pazienti affetti dalla malattia genetica ultra rara: Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP; MIM #135100). Il recettore mutante ALK2R206H mostra una perdita di auto inibizione del segnale BMP e, diversamente dal recettore ALK2WT, può essere attivato dalla citochina activin A. Di conseguenza, il segnale condrogenico a valle risulta potenziato, determinando l'ossificazione eterotopica (HO) nei tessuti connettivi molli. Nonostante diversi trattamenti sperimentali siano in fase di valutazione negli studi clinici, ad oggi non esiste una cura disponibile per la FOP e i meccanismi cellulari e molecolari alla base di questa malattia sono ancora in fase di scoperta. In questo studio, dimostriamo per la prima volta l' interazione tra il segnale del recettore mutante ALK2R206H e una deregolazione del flusso autofagico in condizioni ipossiche. Dal punto di vista meccanicistico, la riduzione del flusso autofagico è correlata con una maggiore stabilità del recettore mutante ALK2, che contribuisce all'iper attivazione dello stesso. È importante sottolineare che abbiamo dimostrato che la Rapamicina inibisce il differenziamento condrogenico in maniera dipendente dall'autofagia, in cellule esprimenti il recettore mutante. Coerentemente, altri induttori farmacologici dell'autofagia, come la Spermidina, possono ritardare il differenziamento condrogenico guidato da ALK2R206H in vitro. Ancora più rilevante, abbiamo confermato questi dati in cellule derivate da pazienti FOP. Nel complesso, questo studio contribuisce alla comprensione della complessa rete di segnalazione molecolare regolata dall'attivazione anomala del recettore mutante ALK2R206H e sottolinea l'urgenza di nuove strategie terapeutiche combinate per il trattamento della FOP.

184

Genetic bone disease

Osteogenesis imperfecta

A NEW ZEBRAFISH MUTANT TO INVESTIGATE THE IN VIVO FUNCTION OF SUCO IN SKELETAL DEVELOPMENT AND OSTEOBLASTOGENESIS

S. Cotti[1], A. Forlino[1]

[1]Pavia, Università Di Pavia

Project: GJC22002; Forlino Antonella

SUCO is an ubiquitous endoplasmic reticulum transmembrane protein of unknown function. Recently, loss-of-function mutations in SUCO have been described in a patient diagnosed with recessive osteogenesis imperfecta (OI), having multiple fractures and severe osteopenia. Suco-/- mice exhibit acute onset skeletal defects, impaired bone formation and spontaneous fractures. Interestingly, their osteoblasts present downregulation of Col1, Ocn and Alp, but the levels of Runx2 and Sp7 are normal. This suggests a failure of osteoblasts maturation and a reduction in collagen synthesis, but the responsible mechanism remains to be understood. To deeply investigate the in vivo function of SUCO, we generated a suco-/- zebrafish carrying a missense mutation in exon 1, resulting in a premature stop codon in the protein. Preliminary qPCR analysis revealed a 50% reduction of suco expression in suco-/- zebrafish compared to WT. Differently from mice, mutant zebrafish reach adulthood and show a severe reduction in standard length compared to WT from 3 up to 8 months of age (p<0.001). At the level of the vertebral column, suco-/- have a wider angle between the neural arches and vertebrae (p<0.001) and display vertebral bodies disproportion that worsens with aging and eventually turns into skeletal malformations. The presence of bone fractures is proved by the numerous calli in the mutant arches and spines. Compared to WT, the angle of the head hump is greater in suco-/- (p<0.05), indicating head abnormalities. The initial characterization of suco-/- zebrafish highlights important similarities with the patient and confirms the relevance of Suco in bone development. A deeper phenotypic and molecular characterization of mutant zebrafish using transgenic bone-specific reporter lines will clarify the function of Suco in osteoblastogenesis and bone formation. Moreover, this zebrafish model will contribute to the understanding of the pathological mechanism of a novel and uncharacterized OI form

Malattie genetiche dell'osso

Osteogenesi imperfetta; OI; Malattie delle osssa fragili; malattia delle ossa di vetro;

CREAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI UN NUOVO MODELLO ZEBRAFISH PER LO STUDIO IN VIVO DI SUCO NELLO SVILUPPO SCHELETRICO E NELL'OSTEOBLASTOGENESI

SUCO è una proteina ubiquitaria transmembrana del reticolo endoplasmatico con funzione sconosciuta. Recentemente, mutazioni con perdita di funzione nel gene SUCO sono state descritte in un paziente con diagnosi di osteogenesi imperfetta (OI) recessiva, con fratture multiple e grave osteopenia. I topi knock out per Suco-/- presentano gravi difetti scheletrici, ridotta formazione ossea e fratture spontanee. I loro osteoblasti presentano una ridotta espressione di Col1, Ocn e Alp, ma i livelli di Runx2 e Sp7 sono normali. Ciò suggerisce una compromessa maturazione degli osteoblasti e una riduzione della sintesi del collagene, ma il meccanismo responsabile è ancora sconosciuto. Per studiare in modo approfondito la funzione di SUCO in vivo, abbiamo generato un modello zebrafish (suco-/-) con una mutazione missenso nell'esone 1, responsabile per la formazione di un codone di stop prematuro nella proteina. L'espressione di Suco nei pesci knock out è risultata ridotta del 50%. A differenza dei topi, gli zebrafish suco-/- raggiungono l'età adulta, ma sono più corti rispetto ai WT (p<0,001). A livello della colonna vertebrale, i mutanti hanno un angolo più ampio tra gli archi neurali e le vertebre (p<0,001) e mostrano una sproporzione dei corpi vertebrali che peggiora con l'invecchiamento e alla fine si trasforma in malformazioni scheletriche. La presenza di fratture ossee è testimoniata dai numerosi calli negli archi e nelle spine dei mutanti. Inoltre, malformazioni craniche sono evidenti nei pesci knock out.

Gli zebrafish suco-/- s riproducono alcune delle caratteristiche descritte nel paziente confermando la rilevanza di Suco nello sviluppo osseo. Una caratterizzazione fenotipica e molecolare più approfondita utilizzando linee reporter transgeniche specifiche per l'osso chiarirà la funzione di Suco nell'osteoblastogenesi e nella formazione ossea. Inoltre, questo modello contribuirà alla comprensione del meccanismo patologico di una forma di OI nuova e non caratterizzata.

185

Genetic vascular disease

Hereditary hemorrhagic telangiectasia

Characterizing new molecular targets to struggle vessel instability in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia

Climent Salarich Montserrat[1], A. Sbalchiero[1], L. Lambroia[2], L. Cassinelli[3], F. Pagella[3], S. Introini[3], F. Sirchia[4], C. Olivieri[4] L. Elia[2]

[1]Pieve Emanuele, Humanitas University
[2]Rozzano, Humanitas Research Hospital
[3]Pavia, Policlinico San Matteo Fondazione - IRCCS
[4]Pavia, Università Di Pavia

Project: GJC23034; Climent Salarich Montserrat, Pagella Fabio Giuseppe

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) is a rare vascular disorder characterized by aberrant blood vessel formation with abnormal phenotype of endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs). HHT is caused by pathogenic variants in genes encoding key components of the endothelial TGF-β/BMPs signaling pathway, ENG and ALK1. This condition compromises not only ECs function but also differentiation and migration of SMCs toward the endothelium, thereby altering SMC-EC interactions. Both cell types play a crucial role in vascular homeostasis. ECs regulate vascular tone, permeability and inflammation, while SMCs ensure vessel integrity by dynamically switching their phenotype in response to physiological and environmental demands.

Through single-cell RNA sequencing of patient-derived biopsies and healthy controls data, we aim to identify the different cellular types and gene expression patterns that characterize HHT vascular malformation to understand the cause underlying the disease at the molecular level.

Our analyses revealed different ECs sub-populations specific in HHT, highlighting distinct dysregulated genes that could drive the macroscopic clinical feature of disease (arteriovenous malformations). Moreover, SMCs also showed substantial differences in gene expression profiles compared to healthy samples. Specifically, we found up-regulated genes associated with collagen, integrins, extracellular matrix, PDGF signaling pathways, while down-regulated genes were related to metabolism, contraction and oxidation. Among the highly up-regulated genes, we identified several unknown genes (Tdark), two of which have potential to significantly impact the phenotypic switch of SMCs.

The aim of this project is to study and characterize these Tdarks altered in vascular HHT cells to develop strategies aimed at restoring vascular function through state-of-the-art techniques and cellular phenotypic studies.

Malattie genetiche vascolari

Teleangectasia emorragica ereditaria; HHT; Malattia di Rendu-Osler; Malattia di Rendu-Osler-Weber;

CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI BERSAGLI MOLECOLARI PER CONTRASTARE L'INSTABILITÀ VASCOLARE NELLA TELEANGECTASIA EMORRAGICA EREDITARIA

La Teleangectasia Emorragica Ereditaria (HHT) è una malattia genetica rara, caratterizzata da vasi sanguigni disfunzionali. Le cellule coinvolte, endoteliali (ECs) e muscolari lisce (SMCs), presentano un fenotipo anomalo. La patologia è causata da varianti patogenetiche nei geni ALK1 ed ENG, componenti chiave della via di segnalazione endoteliale TGF-β/BMPs. Questo altera non solo la funzione delle ECs, ma anche la differenziazione e la migrazione delle SMCs verso l'endotelio, compromettendo l'interazione SMC-EC. Entrambi i tipi cellulari hanno un ruolo cruciale nell'omeostasi vascolare: le ECs regolano il tono vascolare, la permeabilità e l'infiammazione, mente le SMCs garantiscono l'integrità del vaso, adattando dinamicamente il proprio fenotipo in risposta a stimoli fisiologici e ambientali.

Effettuando il scRNA-seq, su biopsie di pazienti e controlli sani, l'obiettivo è identificare i diversi tipi cellulari e i profili di espressione genica che caratterizzano le malformazioni vascolari HHT, per comprenderne le cause molecolari.

Abbiamo individuato sottopopolazioni specifiche di ECs HHT con geni disregolati potenzialmente coinvolti nella formazione delle malformazioni arterovenose. Inoltre, le SMCs HHT mostrano alterazioni significative rispetto ai controlli sani nell'espressione di geni associati a collagene, integrine, matrice extracellulare e alle vie di segnalazione PDGF, mentre osserviamo una diminuzione di geni associati al metabolismo, alla contrazione e all'ossidazione. Tra i geni iper-espressi, emergono diversi geni sconosciuti (Tdark), due dei quali potrebbero avere un impatto significativo sulla transizione fenotipica delle SMCs. L'obiettivo di questo progetto è studiare e caratterizzare questi Tdark alterati nelle cellule vascolari HHT, al fine di sviluppare strategie mirate al ripristino della funzione vascolare, attraverso tecniche all'avanguardia e studi fenotipici cellulari.

186

Genetic vascular disease

Cerebral cavernous malformation

BMI1 INHIBITION REDUCES LESION BURDEN AND BLOCKS DISEASE PROGRESSION IN A CHRONIC MOUSE MODEL OF CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION

A. Leoni[1], M. Trovato[1], M. Valentino[1], G. Rossetti[1], M. Pagani[1]

[1]Milano, IFOM ETS - Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare

Project: GMR24T1146; Pagani Massimiliano

Cerebral Cavernous Malformation (CCM) is a neurovascular disease characterized by the formation of capillary-venous vascular lesions known as cavernomas. Such lesions develop from the clonal expansion of a subset of brain-resident endothelial progenitor cells. Both sporadic and familial forms of CCM exist. Familial CCM is a rare disease with a prevalence of 0.02%, and is typically associated with mutations in either Ccm1, Ccm2 or

Ccm3 genes. Cavernomas are prone to develop intracerebral hemorrhages leading to severe neurological damage. The current gold standard is surgical resection of cavernomas and symptom management, with no pharmacological treatments available. Our group recently discovered that the Polycomb group protein BMI1 is aberrantly upregulated in endothelial cells lining human cavernomas, crucially contributing to their transcriptional rewiring. We showed that pharmacological inhibition of BMI1 with the PTC209 inhibitor ameliorates multiple pathological phenotypes, both in vitro and in an acute mouse model of CCM, suggesting BMI1 as a promising therapeutic target for CCM treatment. Nevertheless, the safety of PTC209 in human patients has not been fully assessed yet. Notably, the BMI1 inhibitor Unesbulin has been positively evaluated in terms of safety and efficacy in several clinical trials for the treatment of hard-to-treat cancers. Here, we implemented a slow-progression chronic mouse model of CCM to recapitulate more closely the onset and progression of cavernomas in human patients, and evaluated the effects of Unesbulin. We found that treatment with Unesbulin significantly reduces lesion burden, impacting both de novo lesion formation and, most importantly, arresting the progression of pre-established cavernomas. These findings, and the favorable risk-benefit profile that the drug has demonstrated in humans, support its potential as a therapeutic approach to block cavernomas progression, offering critical benefits for patients' quality of life.

Malattie genetiche vascolari

Malformazione cavernosa cerebrale

INIBIZIONE DI BMI1 RIDUCE LE LESIONI E BLOCCA LA PROGRESSIONE DELLA MALATTIA IN UN MODELLO MURINO CRONICO DI MALFORMAZIONE CAVERNOSA CEREBRALE

La malformazione cavernosa cerebrale (CCM) è una malattia neurovascolare caratterizzata dalla formazione di lesioni capillari-venose note come cavernomi. Queste si sviluppano dall'espansione clonale di un sottogruppo di progenitori endoteliali residenti nel cervello. Esistono sia forme sporadiche che familiari della patologia; quest'ultima è una malattia genetica rara tipicamente associata a mutazioni nei geni Ccm1, 2 e 3. I cavernomi prevedono lo sviluppo di emorragie cerebrali e gravi danni neurologici. L'attuale gold-standard è la resezione chirurgica dei cavernomi e la gestione dei sintomi, senza che siano disponibili trattamenti farmacologici. Il nostro gruppo ha di recente scoperto che la proteina BMI1 del gruppo Polycomb è espressa ad alti livelli nelle cellule endoteliali dei cavernomi, contribuendo in modo cruciale al loro rewiring trascrizionale. Abbiamo dimostrato che l'inibizione farmacologica di BMI1 con l'inibitore PTC209 migliora vari fenotipi patologici sia in vitro che in un modello murino acuto di CCM, suggerendo BMI1 come potenziale bersaglio terapeutico nel trattamento dei cavernomi. La sicurezza di PTC209 nell'uomo non è stata ancora valutata in modo esaustivo. Al contrario, l'inibitore di BMI1 Unesbulin è stato valutato positivamente in termini di sicurezza in studi clinici sul trattamento di tumori. Di recente, abbiamo implementato un modello murino cronico di CCM a lento sviluppo, per meglio riprodurre l'insorgenza e la progressione dei cavernomi nei pazienti, e valutare gli effetti di Unesbulin. I risultati mostrano che questo trattamento riduce significativamente il carico di lesioni, incidendo sulla formazione di nuovi cavernomi e soprattutto portando all'arresto della progressione di quelli preformati. Questi risultati, e il profilo favorevole che il farmaco ha mostrato nell'uomo, supportano il suo potenziale utilizzo terapeutico per bloccare la progressione dei cavernomi, offrendo benefici critici per la qualità di vita dei pazienti.

187

Genetic vascular disease

Rare lymphatic system anomaly

Hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia-renal defect syndrome

PLVAP AS A NOVEL PLAYER FOR LYMPHATIC MALFORMATIONS IN THE SOX18- VEGFC REGULATORY NETWORK

S. Truppello[1], M. Di Fuorti[1], L. Bettinelli[1], C. Sacchi[1], M. Pallini[1] A. Fantin[1], M. Beltrame[1]

[1]Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale

Project: GSA23D004; Beltrame Monica

Primary lymphedema, classified among lymphatic malformations, is caused by an underlying genetic defect that affects lymphatic function causing fluid imbalance and swelling in various parts of the body. A number of causal genes have been identified so far, including SOX18, which encodes a transcription factor of the SOXF group. Mutations in SOX18 underlie recessive and dominant forms of Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia (HLT) and Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia-Renal defect (HLTR) syndrome. The penetrance of lymphedema can be variable even in patients affected by mutations in the same gene, as is the case for SOX18. We believe that exploring the function in lymphatic development of other genes in the regulatory network of this key transcription factor will help in shedding light on the genetic backgrounds that might impact in lymphatic disease conditions. We are currently studying PLVAP, downstream of SOX18, as its role in lymphatic function is largely unexplored. Plasmalemma vesicle–associated protein (PLVAP, PV-1) is a single-pass transmembrane domain glycoprotein with a recognized role in the formation of diaphragms in endothelial cells. Mutations in PLVAP have been associated with a protein-losing enteropathy in human patients. Our approach combines the use of zebrafish, which allows non-invasive in vivo analyses of vascular and lymphatic system development, and human primary lymphatic endothelial cells (LECs) in culture, for a better understanding of key cellular properties and biochemical events in response to VEGFC, an essential growth factor for lymphatics. We are performing knockdown experiments both in vivo and in vitro and characterizing a mutant in plvapb, one of the two plvap genes in zebrafish. Our data point to defects in lymphatic development when plvapb is either knocked down or mutated. Defects in mutants are less severe, possibly due to genetic compensation. Lymphatic defects are increased when VEGFC signaling is perturbed.

Malattie genetiche vascolari

anomalie rare del sistema linfatico

Ipotricosi - linfedema - telangectasia

PLVAP COME NUOVO GENE IMPLICATO IN MALFORMAZIONI LINFATICHE NELL'ASSE REGOLATIVO SOX18/VEGFC

Il linfedema primario è causato da un difetto genetico che compromette la funzione del sistema linfatico, causando un accumulo di liquidi e gonfiore in varie parti del corpo. Tra i geni coinvolti c'è SOX18, che è associato alla sindrome di Ipotricosi-Linfedema-Telangiectasia (HLT)/Ipotricosi-Linfedema-Telangiectasia-deficit Renale (HLTR). La gravità del linfedema può variare anche tra persone con mutazioni dello stesso gene, come nel caso di SOX18. Crediamo che studiare altri geni legati a SOX18 possa

aiutarci a capire meglio le cause genetiche delle malattie linfatiche. Attualmente stiamo studiando il gene PLVAP, che si trova sotto il controllo di SOX18. Un suo ruolo nella funzione linfatica è largamente inesplorato. PLVAP è una proteina che contribuisce alla formazione di particolari strutture sulla superficie delle cellule dei vasi sanguigni. Mutazioni in PLVAP sono state legate a una malattia che fa perdere proteine attraverso l'intestino. Per studiare PLVAP, usiamo dei piccoli pesci detti zebrafish, che ci permettono di osservare lo sviluppo dei vasi sanguigni e linfatici in modo non invasivo, e cellule umane del sistema linfatico coltivate in laboratorio. In questo modo possiamo capire meglio come il sistema linfatico risponde a VEGFC, un importante fattore di crescita linfatico, quando PLVAP è ridotto o assente. Stiamo effettuando esperimenti sia sui pesci zebrafish che sulle cellule umane, studiando una mutazione nel gene plvapb, presente nei pesci. I nostri risultati mostrano che la riduzione o la mutazione di plvapb causano difetti nello sviluppo linfatico, anche se questi sono meno gravi nei mutanti, presumibilmente grazie a compensazione genetica. I difetti linfatici aumentano quando il segnale di VEGFC è alterato.

188

Genetic hematologic disease

Beta-Thalassemia

HYPERACTIVE ERYTHROPOIESIS INDUCED BY HEMATOPOIETIC TFR2 DELETION CORRECTS GLUCOSE ABNORMALITIES IN ?-THALASSEMIC MICE

Nai Antonella[1], S.M. Di Modica[1], E. Tanzi[1], M. Pettinato[1], A. Pagani[1], L. Silvestri[1]

[1]Milan, Università Vita Salute San Raffaele

Project: GMR23T1037; Nai Antonella

Alterations of glucose metabolism are common complications of β-thalassemia, hematologic disorder characterized by anemia, ineffective erythropoiesis (IE) and iron overload. Despite metabolic alterations are usually ascribed to organs dysfunction because of iron accumulation, β-thalassemia carriers, who do not experience iron overload, have a higher risk of developing glucose abnormalities compared to the general population. Therefore, we hypothesized that factors other than iron contribute to this phenomenon and that IE might play a pivotal role. The iron sensor Transferrin Receptor 2 (TFR2) is a negative regulator of erythropoietin signalling, whose hematopoietic inactivation ameliorates anemia and IE in β-thalassemia models, likely increasing the metabolic activity of erythroid cells. Here, we evaluated whether hematopoietic Tfr2 deletion, stimulating erythropoiesis and promoting erythroid glucose consumption, improves metabolic abnormalities in β-thalassemia. In line with patients' data, thalassemic Hbbth3/+ mice were hyperglycemic both in basal conditions and after 16 hours of starvation, without changes in circulating insulin. Interestingly, blood glucose levels inversely correlated with red blood cell count. In contrast, hyperactive erythropoiesis in Tfr2-deficient mice was associated to reduced glycemia and improved response to a glucose tolerance test. Of note, transcriptomic analysis showed an increased expression of glucose, glutamine and amino acid transporters and glycolytic genes in Tfr2-deficient erythroblasts, mainly at the most terminal stages of maturation, indicating that glucose uptake and metabolism strongly support terminal erythroid differentiation. Overall, these results suggest that increased glucose consumption by the Tfr2-deficient hyperactive erythropoiesis reduces systemic glucose levels, thus correcting hyperglycemia in β-thalassemic mice, thus offering novel potential therapeutic avenues for managing the disease.

Malattie genetiche ematologiche

Beta talassemia;

L'IPERATTIVAZIONE DELL'ERITROPOIESI INDOTTA DALLA MANCANZA DI TFR2 NELLE CELLULE EMATOPOIETCHE CORREGGE I DIFETTI METABOLICI DI TOPI ?-TALASSEMICI

La β-talassemia, disordine caratterizzato da anemia, eritropoiesi inefficace (IE) e sovraccarico di ferro, è frequentemente accompagnata da alterazioni del metabolismo del glucosio, generalmente attribuite alla tossicità del ferro. I portatori di β-talassemia—che non presentano sovraccarico di ferro—mostrano però un rischio più elevato di sviluppare diabete rispetto alla popolazione generale, suggerendo che fattori diversi dal ferro possano contribuire, con un potenziale ruolo chiave per l'IE.

Il Recettore della Transferrina 2 (TFR2) è un sensore del ferro e regolatore negativo del segnale dell'eritropoietina. La delezione di Tfr2 nel compartimento ematopoietico migliora anemia ed IE in modelli murini di β-talassemia, probabilmente aumentando l'attività metabolica delle cellule eritroidi. In questo studio, abbiamo indagato se la delezione ematopoietica di Tfr2, stimolando l'eritropoiesi e promuovendo il consumo di glucosio, migliorarasse le alterazioni metaboliche associate alla β-talassemia.

In linea con i dati clinici, i topi talassemici mostrano iperglicemia senza variazioni significative nei livelli di insulina circolante, con una correlazione inversa tra i livelli ematici di glucosio ed il numero di globuli rossi. Al contrario, i topi con delezione di Tfr2 e eritropoiesi iperattiva presentano minore glicemia e migliore tolleranza al glucosio. Gli eritroblasti Tfr2-deficienti presentano un'aumentata espressione di geni coinvolti nel metabolismo del glucosio, soprattutto nelle fasi terminali della maturazione, suggerendo che un maggiore assorbimento e metabolismo del glucosio siano fondamentali per sostenere il differenziamento eritroide. In conclusione, i nostri dati mostrano che l'aumentato consumo di glucosio indotto dall'eritropoiesi iperattiva possa correggere le alterazioni metaboliche della talassemia, offrendo nuove potenziali strategie terapeutiche per la gestione della patologia.

189

Genetic hematologic disease

Beta-Thalassemia

OPTIMIZED TRANSDUCTION OF MPB CD34+ CELLS INCREASES TRANSDUCTION EFFICIENCY AND VCN WHILE PRESERVING STEMNESS: TOWARDS A PHASE IIB CLINICAL TRIAL OF GENE THERAPY FOR TDT BETA-THALASSEMIA.

Scaramuzza Samantha[1], M.R. Lidonnici[1], C. Rossi[1], M. Storto[1] G. Chianella[1], C. Asperti[1], S. Marktel[1], M.P. Cicalese[1], G. Consiglieri[1], C. Quintarelli[2], M. Gunetti[3], M. Radrizzani[1], F. Ciceri[4], F. Locatelli[2], A. Aiuti[1], G. Ferrari[1]

[1]Milano, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[2]Roma, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS

[3]Milano, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù - IRCCS
[4]Milano, IRCCS San Raffaele Scientific Institute

Project: TGT22C07; Ferrari Giuliana

"ß-thalassemia is a disorder due to mutations in the ß-globin chain gene causing a reduced or absent production of hemoglobin A, leading to severe anemia and lifelong transfusion dependence. Ex vivo hematopoietic stem cell (HSC) gene therapy is an effective alternative cure to allogeneic bone marrow transplantation. In 2015, we started a clinical trial based on autologous mobilized HSC transduced by the GLOBE vector. Results from the long term follow up study show a persistent and polyclonal engraftment of genetically engineered cells in most of the patients leading to a significant reduction in transfusion requirement in adult patients while the pediatric population includes both transfusion independent and dependent patients. Overall, the results highlighted the need for a robust in vivo vector copy number/cell (VCN) to achieve the complete correction of anemia. Thus, we improved the manufacturing by using transduction enhancers while reducing the culture time. The combination of CSH and PGE2, in refined culture conditions, resulted in higher VCN and transduction efficiency compared to the previously used protocol, maintained long-term following transplantation in immunodeficient mice, indicating targeting of repopulating HSC. Importantly, evaluation by RNAseq analysis showed absence of significant transcriptional differences between CSH plus PGE2 treated vs untreated CD34+ cells with an upregulation of pathways involved in the maintenance of healthy stem cell pool. The optimized protocol has been scaled-up and cell manufacturing tested by Tiget process development laboratory and GLP toxicology and biodistribution study in immunodeficient mice has shown preclinical safety. The manufacturing of the drug product will be performed by the GMP facility of Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG). The clinical trial application submission, sponsored by Fondazione Telethon, with Ospedale San Raffaele and OPBG as treatment centers, is planned by 3Q25."

Malattie genetiche ematologiche

Beta talassemia;

OTTIMIZZAZIONE DELLA TRASDUZIONE DELLE CELLULE CD34 PER AUMENTARE L'EFFICIENZA DI TRASDUZIONE PRESERVANDONE LA STAMINALITÀ: VERSO UN NUOVO TRIAL FASE II DI TERAPIA GENICA PER TDT BETA-TALASSEMIA.

La ß-talassemia è una malattia causata da mutazioni nel gene della ß-globina che causano una produzione ridotta o assente di emoglobina A e determina anemia e continua necessità di trasfusioni. La terapia genetica rappresenta una valida alternativa al trapianto di midollo osseo. Nel 2015, abbiamo iniziato un trial clinico basato sull'uso di cellule staminali ematopietiche (CSE) CD34+ ingegnerizzate con il vettore GLOBE. I risultati ottenuti mostrano la persistenza di queste cellule nel tempo nella maggioranza dei pazienti con una riduzione di volume e frequenza delle trasfusioni nei pazienti adulti mentre la popolazione pediatrica comprende sia pazienti ancora trasfusione dipendenti sia pazienti che hanno smesso di trasfondere. Nell'insieme i dati raccolti sottolineano la necessità di aumentare il numero di copie di vettore integrato per cellula (VCN) per avere una completa correzione dell'anemia. Per questo il metodo di trasduzione è stato implementato usando molecole in grado di aumentare i VCN riducendo nello stesso tempo i tempi. Tra le condizioni testate, la combinazione di CsH e PGE2 in condizioni ottimizzate ha dimostrato una maggiore efficienza di trasduzione e la capacità di ripopolare il sistema ematopoietico di topi immunodeficienti. Inoltre, l'analisi molecolare tramite RNAseq ha dimostrato l'assenza di differenze significative fra le cellule CD34+ non trattate e quelle trattate con CsH e PGE2 con una regolazione positiva dei pathway coinvolti nel mantenimento della staminalità. Il protocollo ottimizzato è stato riprodotto su larga scala nel laboratorio di sviluppo al TIGET e le cellule testate in studi di tossicologia e biodistribuzione. La produzione per uso clinico sarà effettuata presso L'Officina Farmaceutica dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG). La sottomissione per l'approvazione del nuovo trial clinico sponsorizzato da Fondazione Telethon con Ospedale San Raffaele e OPBG come centri per il trattamento è prevista per il 3Q25.

190

Genetic hematologic disease

Beta-Thalassemia

Sickle cell anemia

DRUGS REPURPOSING OF MOLECULES MODULATING HUMAN DELTA GLOBIN GENE EXPRESSION VIA A MODEL OF TRANSGENIC FETAL LIVER CELLS: IMPLICATIONS FOR BETA-HEMOGLOBINOPATHY THERAPEUTICS.

**Congiu Michela[1], M. Simbula[1], M.F. Manchinu[1], S. Olla[1]
S. Vaccargiu[1], D. Poddie[1], M.S. Ristaldi[1]**

[1]Monserrato, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche

Project: GGP20046; Ristaldi Maria

Beta-hemoglobinopathies such as beta-thalassemia and sickle cell disease are severe genetic blood disorders affecting the beta globin chain of hemoglobin A (α2β2). The activation of the delta globin, the non-alpha globin of HbA2 (α2δ2), could be a possible approach to improve the clinical severity of these pathologies. The therapeutic potential of delta globin has been demonstrated in previous studies in a mouse model of Beta-thalassemia and sickle cell disease. This study evaluated delta globin gene activation by small molecules in erythroid cells isolated from transgenic murine fetal liver. A screening of 119 molecules, selected for their potential in drug repurposing, was carried out without prior selection based on specific pathways of interest. Three candidates, Nexturastat, Stattic, and Palbociclib, were found to have high efficacy on Delta globin expression. Palbociclib also proved effective in increasing gamma globin expression. All of these compounds have pharmacokinetic profiles beneficial for clinical application, providing potential inducer agents of HbA2, which could have a therapeutic effect in the treatment of beta-hemoglobinopathies.

Malattie genetiche ematologiche

Beta talassemia;

Drepanocitosi; Anemia a cellule falciformi;

RIPOSIZIONAMENTO DI MOLECOLE CHE MODULANO L'ESPRESSIONE GENICA DELLA DELTA GLOBINA UMANA ATTRAVERSO UN MODELLO DI CELLULE ERITROIDI TRANSGENICHE: IMPLICAZIONI PER LA TERAPIA DELLE BETA-EMOGLOBINOPATIE

Le Beta-emoglobinopatie, come la Beta-talassemia e l'anemia falciforme, rappresentano gravi disordini genetici del sangue che

interessano la catena beta globinica dell'emoglobina A ($\alpha_2\beta_2$). L'attivazione della delta globina, componente non alfa dell'HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), è stata ipotizzata come un potenziale approccio terapeutico per mitigare la gravità clinica di queste patologie. L'efficacia terapeutica della delta globina è stata dimostrata in studi precedenti, in modelli murini di Beta-talassemia e anemia falciforme. Il presente studio ha valutato l'attivazione del gene della delta globina mediante piccole molecole in cellule eritroidi isolate da fegato fetale murino transgenico. È stato effettuato uno screening di 119 molecole, selezionate per il loro potenziale nel riposizionamento farmacologico, senza una selezione preliminare basata su specifiche vie di interesse. Tre molecole, Nexturastat, Stattic e Palbociclib, hanno mostrato un'elevata efficacia nell'espressione della delta globina. Inoltre, il Palbociclib ha incrementato anche l'espressione della gamma globina. Tutti i composti identificati possiedono profili farmacocinetici vantaggiosi per un'applicazione clinica, suggerendo il loro potenziale ruolo come induttori di HbA2. Questi risultati indicano una possibile strategia terapeutica per il trattamento delle Beta-emoglobinopatie.

191

Genetic hematologic disease

Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura

CELL-BASED THERAPY FOR CONGENITAL THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Caroli Annalina[1], M. Varinelli[1], P. Rizzo[1], L. Longaretti[1], S. Sartori[2] L. Poggi[2], S. Conti[1], D. Rottoli[1], P. Trionfini[1], S. Tomasoni[1]

[1]Bergamo, Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS
[2]Trento, Università Di Trento

Project: GGP20073; Tomasoni Susanna

Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (cTTP) is an ultrarare recessive syndrome characterized by microangiopathic haemolytic anaemia, thrombocytopenia, and organ ischemia linked to microvascular occlusive thrombi. The pathology is caused by mutations in the von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease ADAMTS13, produced by liver cells, leading to impaired cleavage of unusually large vWF multimers, resulting in platelet deposition and microthrombi formation. The current treatment consists of therapeutic and prophylactic plasma infusions but is complicated by allergic reactions and the risk of infections associated with high morbidity and mortality. Our project aims to develop a new therapeutic approach based on the generation of transplantable universal liver organoids that are invisible to the patient's immune system and able to release constant therapeutic levels of ADAMTS13 into the bloodstream. In order to accomplish this objective, we have generated a heterologous hypoimmunogenic iPSC cell line (hypo-iPSC) by deleting the B2M and CIITA genes that are essential for the correct surface expression of HLA-I and HLA-II proteins. The hypo-iPSCs were successfully differentiated to hepatic endoderm-like cells (HNF4α+ AFP+), endothelial-like cells (vWF+ CD144+) and stellate-like cells (PDGFR-β+ VIM+ PCDH7+). Once grown together in a 3D structure, the three cell types formed a mature and functional hepatic organoid able to secrete ADAMTS13, albumin and Factor H. The organoid was highly vascularized, and fenestrated endothelial cells were visualized by electron microscopy. We generated a cTTP zebrafish model, carrying a biallelic 5bp insertion in the 3rd exon of ADAMTS13 showing a mild TTP phenotype, and we fine-tuned an effective transplantation technique. The liver organoids were transplanted into cTTP zebrafishes which were analysed at 1, 2, 7 and 14 days after transplantation. Their successful engraftment was confirmed by PAS and immunofluorescence analyses.

Malattie genetiche ematologiche

Porpora trombotica trombocitopenica congenita; Deficit congenito di ADAMTS-13; TTP congenita; TTP familiare; Sindrome di Upshaw-Schulman;

TERAPIA CELLULARE PER LA PORPORA TROMBOTICA TROMBOCITOPENICA CONGENITA

La porpora trombotica trombocitopenica congenita (cTTP) è una malattia genetica grave e molto rara. All'origine della malattia c'è la carenza della proteina ADAMTS13 prodotta dalle cellule stellate del fegato e rilasciata nel sangue dove taglia i lunghi multimeri di von Willebrand (vWF). In carenza di ADAMTS13, i multimeri di vWF si accumulano sulla superficie dei vasi sanguigni causando la formazione di microtrombi. Questo provoca la frammentazione dei globuli rossi, una riduzione del numero di piastrine e ischemia in diversi organi. I pazienti vengono trattati con infusioni di plasma, che sono generalmente efficaci, ma danno complicanze quali reazioni allergiche e anafilattiche e rischi di infezione. Lo scopo del nostro progetto consiste nello sviluppo di un nuovo approccio terapeutico basato sulla generazione di un "mini-fegato" universale, invisibile al sistema immunitario del paziente e in grado di rilasciare in circolo livelli terapeutici di ADAMTS13, proteggendo il paziente da eventuali ricadute. A tale scopo, abbiamo generato una linea cellulare iPSC ipoimmunogenica eliminando l'espressione delle proteine HLA-I e HLA-II coinvolte nella risposta immunitaria. Queste cellule sono state differenziate in tre tipi cellulari del fegato: progenitori degli epatociti, cellule endoteliali e cellule stellate. Le cellule ottenute sono state coltivate insieme in condizioni 3D per formare un mini-fegato funzionante, capace di produrre ADAMTS13 e altre proteine plasmatiche rilevanti per la funzione epatica, quali albumina e fattore H. Il mini-fegato ottenuto presenta una fitta rete vascolare e le tipiche fenestrature delle cellule endoteliali epatiche. Abbiamo generato un modello sperimentale nel pesce zebra (Adamts13-/-) con un fenotipo simile ai pazienti TTP e siamo riusciti a mettere a punto una tecnica di trapianto efficace. Mediante colorazioni istologiche e analisi in immunofluorescenza, abbiamo confermato la presenza del mini-fegato fino a 2 settimane dal trapianto.

192

Genetic hematologic disease

Dyskeratosis congenita

Selective control of DNA damage response at telomeres as an innovative therapeutic approach for Dyskeratosis Congenita

Oppezzo Alessia[1], S. Sepe[1], A. Mancheno-Ferris[1], A. Conti[2] E. Marinelli[1], G. Cicio[1], V. Cancila[3], A. Castellini[1], M. Cabrini[1] R. Pallavi[4], F. Rossiello[1], S. Boggio[1], A. di Lillo[1], I. Rosso[1], S. Tavella[1] L. Trastus[1], P.G. Pelicci[1], R. Di Micco[2], F. Buffa[1], C. Tripodo[1] F. d'Adda di Fagagna[1]

[1]Milano, IFOM ETS - Istituto Fondazione di Oncologia Molecolare
[2]Milano, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[3]Palermo, Università Di Palermo
[4]Milano, Istituto Europeo Di Oncologia - IRCCS

Project: GMR23T2007; d'Adda di Fagagna Fabrizio

Dyskeratosis Congenita (DC) is a multi-system disorder characterized

by bone marrow failure (BMF), pulmonary fibrosis and cancer. The current standard treatment for BMF is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, but this procedure carries substantial risks and does not address the broader symptoms of DC, highlighting the need for new therapies. DC is linked to mutations in 18 genes responsible for telomere maintenance, causing critically short and dysfunctional telomeres. We have shown that dysfunctional telomeres are actively transcribed to generate telomeric non-coding RNAs (tncRNAs) which are essential to recruit DNA Damage Response (DDR) factors at damaged telomeres, thus fueling DDR and causing cellular senescence initiation and maintenance. We have developed telomeric antisense oligonucleotides (tASOs) to specifically target these tncRNAs, inhibiting DDR activation at dysfunctional telomeres. Using a telomerase-deficient (Terc-/-) mouse model which bears critically short telomeres and mirrors DC symptoms, including immune dysfunction, we have shown that tASOs treatment can restore tissue and organ function. Our unpublished data demonstrate that tASOs suppress DDR in the hematopoietic organs of Terc-/- mice without extending telomere length, thereby reducing senescence burden and inflammation. Additionally, tASOs treatment prevented immune dysfunction, restoring immune cell balance and improving tissue structure in bone marrow and spleen. After treatment, we observed DDR inhibition, restoration of cell quiescence and improved fitness of hematopoietic stem and progenitor cells in vitro and in vivo. Moreover, tASOs were effective in increasing the ex vivo colony forming ability of human hematopoietic stem cells from aged donors, validating their beneficial effects also on human cells. These findings suggest that targeting DDR at damaged telomeres in vivo could offer significant therapeutic benefits for DC, particularly in the hematopoietic system.

Malattie genetiche ematologiche

Discheratosi Congenita; CD; DKC; Sindrome di Zinsser-Engman-Cole;

CONTROLLO SELETTIVO DELLA RISPOSTA AL DANNO AL DNA AI TELOMERI COME APPROCCIO TERAPEUTICO INNOVATIVO PER LA DISCHERATOSI CONGENITA

La Discheratosi Congenita (DC) è una malattia multisistemica caratterizzata da insufficienza midollare, fibrosi polmonare e cancro, causata da mutazioni in 18 geni coinvolti nel mantenimento dei telomeri, che porta a telomeri corti e disfunzionali. Il trattamento attuale, basato sul trapianto di cellule staminali ematopoietiche, presenta rischi elevati e non affronta i sintomi sistemici, evidenziando la necessità di nuove terapie. Abbiamo dimostrato che i telomeri danneggiati producono RNA non codificanti telomerici (tncRNA), che attivano la risposta al danno del DNA (DDR), promuovendo la senescenza cellulare. Per colpire specificamente questi tncRNA, abbiamo sviluppato oligonucleotidi antisenso telomerici (tASO) che inibiscono l'attivazione del DDR ai telomeri danneggiati. Utilizzando un modello murino privo di telomerasi (Terc-/-) che rispecchia i sintomi della DC, inclusa la disfunzione immunitaria, abbiamo dimostrato che i tASO sopprimono il DDR negli organi ematopoietici dei topi Terc-/- senza allungarne i telomeri, riducendo senescenza e infiammazione. Inoltre, il trattamento con tASO ha prevenuto la disfunzione immunitaria, ripristinando l'equilibrio delle cellule immunitarie e migliorando la struttura tissutale nel midollo osseo e nella milza. Dopo il trattamento, abbiamo osservato l'inibizione del DDR, il ripristino della quiescenza cellulare e un miglioramento della vitalità delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche sia in vitro che in vivo. Inoltre, i tASO si sono dimostrati efficaci nell'aumentare la capacità di formazione di colonie ex vivo delle cellule staminali ematopoietiche umane provenienti da donatori anziani, confermando i loro effetti benefici anche sulle cellule umane. Questi risultati suggeriscono che l'inibizione del DDR ai telomeri danneggiati in vivo potrebbe offrire significativi benefici terapeutici per la DC, in particolare nel sistema ematopoietico.

193

Genetic hematologic disease

Hemophilia A

DENDRITIC CELL PATHWAYS IN GENE THERAPY EFFICACY IN HEMOPHILIA

Fallarino Francesca[1], M. Gargaro[1], G. Mencarelli[1], G. Manni[1], D. Ricciuti[1], A. Pinzi[1], B. Pieroni[1], F. Sarnari[1], A. Follenzi[2], F. Antony[2]

[1]Perugia, Università Di Perugia
[2]Torino, Università Del Piemonte Orientale "A. Avogadro "

Project: GMR22T1081; Fallarino Francesca

One of the most challenging complications of the therapy in Hemophilia A (HA), a bleeding disorder primarily caused by mutations in the F8 gene, is the development of inhibitory alloantibodies against the infused FVIII protein, as well as immune responses against viral vectors and the F8 transgene used in gene therapies. Dendritic cells (DCs), key regulators of both innate and adaptive immunity, play a central role in maintaining the delicate balance between immune activation and tolerance. These cells act as environmental sensors that can either promote immune activation or induce tolerance. Our recent findings indicate that metabolic pathway sensors and amino acid catabolism are critical in regulating immune tolerance to the FVIII protein. Inhibition of these pathways leads to heightened immune responses against the administered FVIII protein. In an ongoing project, we are utilizing engineered in vitro and in vivo models to investigate the cellular, intra-, and intercellular signaling networks involved in immune tolerance during FVIII-based GT with lentiviral vectors. Notably, we have identified a subset of inflammatory DCs (i.e. cDC2) that drive immune responses to FVIII gene therapies, while also uncovering effector mechanisms involving regulatory T cell subsets and pathways related to amino acid catabolism and microbiota-derived metabolites that contribute to tolerance. Our findings suggest that inhibiting inflammatory pathways or enhancing tolerance-inducing pathways could significantly improve the long-term efficacy and response to gene therapies in Hemophilia A.

Malattie genetiche ematologiche

Emofilia A; Deficit congenito del fattore VIII; Deficit congenito di F8; Deficit congenito di FVIII;

VERSO L'IDENTIFICAZIONE DEI PATHWAY NELLE CELLULE DENDRITICHE CONDIZIONANO L'EFFICACIA DELLA TERAPIA GENICA NELL'EMOFILIA

Una delle complicazioni più critiche nella terapia dell'Emofilia A (HA), un disturbo emorragico causato principalmente da mutazioni nel gene F8, è lo sviluppo di alloanticorpi inibitori contro la proteina FVIII infusa, oltre alle risposte immunitarie dirette contro i vettori virali o il transgene F8 utilizzati nelle terapie geniche. I meccanismi di segnalazione che regolano queste risposte immunitarie sono ancora poco compresi Le cellule dendritiche (DC), regolatori chiave dell'immunità

innata e adattativa, svolgono un ruolo centrale nel mantenere il delicato equilibrio tra attivazione immunitaria e tolleranza. Queste cellule agiscono come sensori ambientali che possono sia promuovere l'attivazione immunitaria sia indurre tolleranza. I nostri risultati recenti indicano che i sensori di vie metaboliche e il catabolismo degli amminoacidi sono elementi cruciali nella regolazione della tolleranza immunitaria verso la proteina FVIII. In un progetto in corso, stiamo utilizzando modelli ingegnerizzati in vitro e in vivo per indagare le reti di segnalazione cellulari, intra- e intercellulari nelle DCs coinvolte nella tolleranza immunitaria durante la terapia genica con vettori lentivirali esprimenti il F8. In particolare, abbiamo identificato un sottogruppo di DC infiammatorie che promuove la risposta immunitaria contro la terapia genica con F8, mentre abbiamo individuato meccanismi effettrici che coinvolgono sottotipi di cellule T regolatorie e vie metaboliche legate al catabolismo degli amminoacidi e ai metaboliti derivati dal microbiota che contribuiscono alla tolleranza. I nostri dati suggeriscono che l'inibizione delle vie infiammatorie o il potenziamento delle vie che inducono la tolleranza potrebbero migliorare significativamente l'efficacia a lungo termine e la risposta alle terapie geniche per l'Emofilia A.

194

Genetic hematologic disease

Hemophilia A

TRANSLATIONAL CORRECTION APPROACHES TARGETING NONSENSE MUTATIONS IN HEMOPHILIA A (TRANSLEIGHT)

M.F. Testa[1] , R. Tarantino[1], D. Balestra[1], V. Barbieri[1], P. Ferraresi[1] B. Lunghi[1], A. Martucci[1], L. Peretto[1], E. Tonetto[1], J.D. Lueck[2] F. Bernardi[1], M. Pinotti[1], A. Branchini[1]

[1]Ferrara, Università Di Ferrara
[2]Rochester, University of Rochester School of Medicine and Dentistry

Project: GMR23T2177; Branchini Alessio

Nonsense mutations, inserting premature termination codons (PTCs) and thus impairing protein synthesis by, are associated with severe human disease, including the deficiency of coagulation (co) factor (F)VIII (Hemophilia A, HA). Small-molecule correctors (Smc) are tailored to productively suppress disease-causing PTCs, thus restoring protein synthesis, with potential therapeutic implications. We aim at restoring biosynthesis/secretion of functional FVIII by Smc engineered to recode frequent F8 TGA PTCs (n=12), representative of a high proportion (>45%) of HA patients. Expression of PTC-bearing FVIII fused with Gaussia luciferase (FVIII-GL) in HEK293 and endothelial cells showed secreted luciferase activity, mimicking FVIII traces arising from spontaneous suppression (readthrough) and predicted to produce full-length FVIII by inserting amino acid subsets. Importantly, a high degree of suppression (60-95% of wild-type FVIII-GL) over basal levels after Smc correction resulted in significantly higher secreted luciferase activity (p<0.0001) in comparison with untreated PTC-bearing constructs, corresponding to restored secreted levels of FVIII-GL in both cellular models. Preliminary data on FVIII expressed in the native sequence revealed FVIII secretion and cofactor activity at relevant levels after Smc treatment, supporting restored biosynthesis of full-length FVIII with properties resembling those of functional wild-type FVIII. Our first data propose these small molecules as novel correction approach for suppression of PTCs, to faithfully introduce the original amino acid and restore biosynthesis/secretion of functional wild-type FVIII. This preliminary set of data opens the way for an innovative therapeutic approach in the field of hemophilia, which might be translated to other PTCs-caused diseases.

Malattie genetiche ematologiche

Emofilia A; Deficit congenito del fattore VIII; Deficit congenito di F8; Deficit congenito di FVIII;

APPROCCI DI CORREZIONE DI MUTAZIONI NONSENSO ASSOCIATE ALL'EMOFILIA A (TRANSLEIGHT)

Le cosiddette mutazioni "nonsenso" (3 sottotipi), che alterano la sintesi proteica interrompendola prematuramente, sono associate a forme gravi di malattie, come nel caso della carenza di fattore (F)VIII della coagulazione (Emofilia A). Piccole molecole correttrici (small-molecule correctors, Smc) sono in grado di correggere questo tipo di mutazione ripristinando la sintesi proteica, con potenziali implicazioni terapeutiche. Lo scopo del nostro progetto è quello di ripristinare la produzione di FVIII, grazie a queste piccole molecole ingegnerizzate, alterata in presenza del sottotipo di mutazione "nonsenso" più frequente, che nell'insieme rappresenta una proporzione rilevante di pazienti (>45%) affetti da Emofilia A. Primi studi in due diversi modelli cellulari di Emofilia A hanno mostrato come queste piccole molecole siano in grado di ripristinare a livelli rilevanti la produzione di FVIII sia in termini di proteina che di attività coagulante, aspetti determinanti per correggere il difetto dato dalle mutazioni, che in assenza di "correttore" producono quantità insufficienti o nulle di FVIII. Questi dati iniziali aprono la strada per un approccio terapeutico innovativo nel campo dell'emofilia, il quale ha potenzialità traslazionali per essere applicato ad altre patologie umane causate da mutazioni "nonsenso".

195

Genetic hematologic disease

Omenn syndrome

EMBRYONIC LYMPHOCYTES CONTRIBUTE TO A GENETIC FORM OF AUTOIMMUNE INFLAMMATION

Ditadi Andrea[1]

[1]Milan, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)

Project: TGT22C06; Ditadi Andrea

Omenn Syndrome (OS) is a rare hematological disorder, caused by hypomorphic mutations in genes involved in B-/T-cell receptor (BCR/TCR) rearrangement that result in impaired lymphocyte development and immunodeficiency. Notwithstanding, few T-cell clones enriched in self-reactive specificities expand in peripheral tissues, where they trigger severe inflammation and autoimmune reactions. Interestingly, residual OS lymphocytes display characteristics proper of embryonic lymphocytes that emerge before, and independently from, hematopoietic stem cells (HSCs). This prompted us to hypothesize whether OS autoreactive T-cells are generated in the embryo independently from HSCs. Here we show that in the Rag2R229Q/R229Q OS mouse model, embryonic but not adult bone marrow-derived hematopoietic progenitors can generate T-cells. T-lymphopoiesis can be rescued in adult OS blood progenitors via their Lin28-mediated reprogramming to an embryonic-like state. Remarkably, when transplanted in

immunodeficient mice, embryonic-like OS progenitors trigger tissue morphological alterations and inflammation in the large intestine of the recipients, recapitulating the typical OS inflammatory phenotype. Our study describes the previously unappreciated contribution of embryonic progenitors to the pool of autoreactive infilitrating T-cells, providing a novel platform for both the detailed study of human autoimmune disorders and the design of more targeted therapies.

Malattie genetiche ematologiche

Sindrome di Omenn; OS; Immunodeficienza combinata con ipereosinofilia;

LINFOCITI EMBRIONALI CONTRIBUISCONO AD UNA FORMA GENETICA DI AUTOIMMUNITÀ

La Sindrome di Omenn (OS) è un raro disturbo ematologico causato da mutazioni ipomorfe in geni coinvolti nel riarrangiamento dei recettori delle cellule B e T (BCR/TCR), che determinano un difetto nello sviluppo dei linfociti e un'immunodeficienza. Tuttavia, pochi cloni di cellule T, arricchiti in specificità auto-reattive, si espandono nei tessuti periferici, innescando una grave infiammazione e reazioni autoimmuni.

I linfociti residui di OS presentano caratteristiche tipiche dei linfociti embrionali, che emergono prima e indipendentemente dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC). Questo ci ha portato a ipotizzare che le cellule T auto-reattive di OS possano essere generate nell'embrione indipendentemente dalle HSC. Qui dimostriamo che, nel modello murino OS Rag2R229Q/R229Q, i progenitori ematopoietici embrionali, ma non quelli derivati dal midollo osseo adulto, sono in grado di generare cellule T. La linfopoiesi delle cellule T può essere ripristinata nei progenitori ematici adulti di OS attraverso la loro riprogrammazione mediata da Lin28 verso uno stato simile a quello embrionale.

Quando trapiantati in topi immunodeficienti, i progenitori OS in stato embrionale provocano alterazioni morfologiche nei tessuti e infiammazione nell'intestino crasso dei riceventi, riproducendo il tipico fenotipo infiammatorio di OS. Il nostro studio descrive il contributo, finora non riconosciuto, dei progenitori embrionali al pool di cellule T auto-reattive infiltranti, fornendo una nuova piattaforma per lo studio dettagliato dei disturbi autoimmuni umani e lo sviluppo di terapie più mirate.

196

Genetic hematologic disease

Severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency

FROM BONE MARROW CHANGES TO BREAKTHROUGH GENE THERAPY: ADDRESSING ADENOSINE DEAMINASE 2 DEFICIENCY

Bulté Dimitri[1], C. Rigamonti[1], F. Barzaghi[2] E. Pettinato[1], C. Visconti[2], M. Gattorno[3], C. Dufour[3], A. Aiuti[1],A. Mortellaro[1]

[1]Milano, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[2]Milano, IRCCS San Raffaele Scientific Institute
[3]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS

Project: TGT22C15; Mortellaro Alessandra

Background: Deficiency of adenosine deaminase 2 (DADA2) is a lethal immune disorder marked by vasculopathy, immunodeficiency, and hematological issues. Anti-TNF therapy manages inflammation but does not correct the underlying immune and blood abnormalities, leaving patients at risk for severe complications. Allogeneic hematopoietic stem progenitor cell (HSPC) transplantation can be curative but is limited by donor availability and severe risks. Lentiviral vector (LV)-mediated gene therapy (GT) with ADA2- corrected HSPCs offers a promising alternative, but a thorough understanding of DADA2 effects on the hematopoietic system and bone marrow (BM) niche is essential for its success. This study aims to characterize the BM in DADA2 patients and assess the potential of LV-mediated GT. Methods: We analyzed HSPCs and mesenchymal stromal cells (MSCs) in the BM of 18 DADA2 patients. GT studies involved transducing patients' HSPCs with LV-ADA2 and evaluating their clonogenicity, differentiation, and in vivo engraftment. Results: DADA2 patients had significantly reduced primitive HSCs and progenitor cells, with impaired clonogenicity and differentiation. These defects, evident even in asymptomatic patients, indicate early BM disruption. MSCs showed signs of early senescence, DNA damage, and reduced proliferation, reflecting a compromised BM niche. GT restored ADA2 activity in HSPCs, maintaining normal clonogenic and differentiation abilities. In vivo, the GT-treated cells demonstrated effective engraftment, long-term survival, and hematopoietic reconstitution in immunodeficient mice. Conclusion: Our study highlights for the first time significant BM abnormalities in DADA2 across various disease severities, emphasizing the need for careful monitoring. LV-mediated GT effectively restores ADA2 function in patients' HSPCs, presenting a viable therapeutic option that overcomes the limitations of current treatments and offers a potential curative approach for DADA2 patients.

Malattie genetiche ematologiche

Immunodeficienza combinata grave da deficit di adenosina deaminasi; SCID; Deficit di ADA; Deficit di adenosina deaminasi;

DALLE ALTERAZIONI DEL MIDOLLO OSSEO ALLA TERAPIA GENICA: IL CASO DEL DEFICIT DI ADENOSINA DEAMINASI 2

Contesto: La deficienza di adenosina deaminasi 2 (DADA2) è un grave disturbo immunitario caratterizzato da vasculopatia, immunodeficienza e problemi ematologici. La terapia anti-TNF controlla l'infiammazione ma non corregge le anomalie immunoematologiche, lasciando i pazienti a rischio di complicanze. Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSPC) può essere curativo ma presenta limitazioni e rischi. La terapia genica (GT) mediata da lentivirus (LV) con HSPC corrette per ADA2 rappresenta un'alternativa promettente, ma è essenziale comprendere a fondo gli effetti della DADA2 sul midollo osseo (BM). Questo studio caratterizza il BM nei pazienti DADA2 e valuta il potenziale della GT mediata da LV. Metodi: Nel BM di 18 pazienti DADA2, abbiamo analizzato HSPC e cellule stromali mesenchimali (MSC). Trasducendo le HSPC con LV-ADA2 abbiamo valutato clonogenicità, differenziamento e attecchimento in vivo. Risultati: I pazienti con DADA2 mostravano una riduzione significativa delle HSC primitive e delle progenitrici, e alterata capacità clonogenica e di differenziamento. Anche nei pazienti asintomatici, i difetti indicano un'alterazione precoce del BM. Le MSC presentavano senescenza, danni al DNA e proliferazione ridotta, suggerendo una nicchia compromessa. La GT ha ripristinato l'attività di ADA2 nelle HSPC, preservando capacità clonogeniche e differenziative. Nei topi immunodeficienti, le cellule trasdotte hanno mostrato efficace attecchimento e ricostituzione ematopoietica a lungo termine. Conclusione: Il nostro studio evidenzia per la prima volta le anomalie significative nel BM dei pazienti con DADA2, indipendentemente dalla gravità clinica e sottolineando la necessità di un monitoraggio

attento. La GT mediata da LV ripristina l'attività di ADA2 nelle HSPC, rappresentando una valida opzione terapeutica che supera i limiti dei trattamenti attuali e offre un potenziale approccio curativo.

197

Genetic hematologic disease

Shwachman-Diamond syndrome

FUNCTIONAL IMPACT OF THE EIF6 N106S MUTATION IN SHWACHMAN-DIAMOND SYNDROME: EFFECTS ON PROTEIN SYNTHESIS AND RIBOSOME BIOGENESIS

D'Andrea Giacomo[1], **S. Biffo**[1], **I. Ferrari**[1]

[1]*Milano, Fondazione Istituto Nazionale Di Genetica Molecolare (Ingm)*

Project: GGP20008; Biffo Stefano

Translation is the decoding of an mRNA into a protein and can be divided in three stages: initiation, elongation, termination. In eukaryotes, initiation is regulated by initiation factors (eIFs). After the 40S ribosomal subunit scans the mRNA 5' untranslated region (5'UTR) and positions at the optimal initiation codon, the 60S subunit joins to form the active 80S ribosome for translation. eIF6 was identified for its ability to bind 60S subunits and block inactive 80S formation. In mammals, eIF6 levels regulate initiation. N106S mutation in yeast TIF6 (eIF6 orthologue) rescues the lethal phenotype caused by SDO1 (SBDS orthologue) loss, implicating eIF6 in Shwachman-Diamond Syndrome (SDS). SDS is a rare autosomal recessive disorder characterized by pancreatic insufficiency, skeletal abnormalities, bone marrow failure, and increased myeloid neoplasm risk. It's caused by biallelic mutations in the SBDS gene, disrupting ribosome biogenesis, leading to developmental and hematologic deficiency. eIF6 N106S mutation was installed in HEK293T cells using Prime Editing. The mutation was introduced in heterozygosity with ~25% efficiency. Mutated cells showed no significant viability differences compared to control cells. However, with reduced SBDS expression, eIF6 N106S cells exhibited a stronger decrease in SBDS protein, suggesting functional rescue of the SBDS protein function. Puromycin incorporation assays showed decreased protein synthesis in SBDS-depleted conditions. Polysome profiling revealed an accumulation of 80S monosomes, indicating a defect in translation initiation or ribosome recycling. Future studies will investigate the molecular effects of the eIF6 N106S mutation using RiboSeq to identify affected gene programs and determine if it rescues translation defects. Ribosome footprint analysis could reveal codon usage differences and ribosomal fidelity. Sequencing ribosomal RNA will explore disruptions in pre-rRNA maturation.

Malattie genetiche ematologiche

Sindrome di Shwachman-Diamond; Insufficienza del pancreas e disfunzione del midollo osseo; Sindrome di Shwachman; Sindrome di Shwachman-Bodian-Diamond; SDS;

IMPATTO FUNZIONALE DELLA MUTAZIONE EIF6 N106S NELLA SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND: EFFETTI SULLA SINTESI PROTEICA E SULLA BIOGENESI DEI RIBOSOMI

La traduzione è la decodifica di un mRNA in proteina, divisa in tre fasi: inizio, allungamento, terminazione. Negli eucarioti, l'inizio è regolato dai fattori di inizio (eIF). Dopo che la subunità ribosomiale 40S si è posizionata sul codone di inizio di un mRNA, la subunità 60S si unisce per formare il ribosoma 80S attivo per la traduzione. eIF6 è stato identificato per la sua capacità di legarsi alla subunità 60S e bloccare la formazione dell'80S attivo, suggerendo un ruolo nella traduzione. Nell'uomo i livelli di eIF6 regolano l'inizio. La mutazione N106S nel gene TIF6 di lievito (ortologo di eIF6) compensano il fenotipo letale causato dall'assenza di SDO1 (ortologo di SBDS), implicando eIF6 nella Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS). La SDS è una rara malattia autosomica recessiva caratterizzata da insufficienza pancreatica esocrina, deficit di crescita e aumento di neoplasie mieloidi. È causata da mutazioni bialleliche nel gene SBDS, che alterano la biogenesi ribosomiale e la sintesi proteica, portando a difetti dello sviluppo e complicazioni ematologiche. La mutazione eIF6 N106S, identificata nella SDS, è stata modellata in cellule HEK293T utilizzando Prime Editing. La mutazione è stata introdotta in eterozigosi con circa il 25% di efficienza. Le cellule eterozigoti non hanno mostrato differenze significative di vitalità rispetto ai controlli. Tuttavia, quando l'espressione di SBDS è stata ridotta, le cellule eIF6 N106S hanno mostrato una maggiore riduzione nei livelli di proteina SBDS, suggerendo una interazione funzionale tra i due fattori. Gli esperimenti di incorporazione della puromicina hanno mostrato una diminuzione della sintesi proteica in condizioni di deplezione di SBDS. L'analisi dei profili polisomiali ha rivelato un accumulo di monosomi 80S, indicando un difetto nell'inizio della traduzione o nel riciclo del ribosoma. In futuro, esperimenti di RiboSeq potrebbero identificare adattamenti nell'utilizzo di coloni e nella fedeltà dei ribosomi.

198

Genetic hematologic disease

Sickle cell anemia

17R-Resolvin D1 protects against sickle cell related inflammatory cardiomyopathy in humanized mice

E. Federti[1], **L. De Franceschi**[1], **A. Recchiuti**[2]

[1]*Verona, Università Di Verona*
[2]*Chieti, Università Degli Studi "G. D'annunzio" Chieti - Pescara*

Project: GGP20116; De Franceschi Lucia

Sickle cell disease (SCD) is a severely debilitating hereditary red cell disorder and affects millions of people worldwide. Cardiovascular disease has been recognized as the main cause of death in adults with sickle cell disease (SCD). Although the exact mechanism linking SCD to cardiomyopathy remains elusive, a possible role of subclinical acute transient myocardial ischemia during acute sickle cell related vaso-occlusive-crisis (VOCs) has been suggested. We approached SCD cardiomyopathy by integrated omics using humanized SS mice exposed to hypoxia/reoxygenation stress (H/R), mimicking acute VOCs. We then examined the effect of 17R-Resolvin-D1 (17R-RvD1), a member of the specialized pro-resolving lipid mediator superfamily, administration on H/R activated pro-fibrotic and pro-angiogenic pathways. In SS mice, cardiac pro-inflammatory pathways, intersecting proteins and miRNA involved in pro-fibrotic signaling initiate a neutrophil-driven cardiac hypertrophic response similar to that observed in maladaptive acute myocardial infarction. This might be favored by local unresolved inflammatory response. Indeed, we found that 17R-RvD1, (i) modulates miRNAome; (ii) prevents the activation of NF-kBp65; (iii) protects against the H/R induced activation of both PDGFB-R and TGF-'1/Smad2-3 canonical

pathways; (iv) reduces the expression of HIF dependent pro-angiogenic signaling; (v) decreases the H/R induced pro-apoptotic cell signature. Collectively our data support the novel role of unresolved inflammation in SCD related cardiomyocyte dysfunction in response to H/R stress, mimicking acute sickle cell VOCs. Our study contributes to a better understanding of basic underlying mechanisms and providing evidence for protective effects of 17R-RvD1 on SCD related cardiovascular disease.

Malattie genetiche ematologiche

Drepanocitosi; Anemia a cellule falciformi;

IL TRATTAMENTO CON 17RVD1 E' PROTETTIVO RISPETTO ALLO SVILUPPO DELLA CARDIOMIOPATIA RELATA ALLA DREPANOCITOSI IN MODELLO MURINO UMANIZZATO

L'anemia falciforme o drepanocitosi e' una malattia monogenica dei globuli rossi gravemente invalidante e colpisce milioni di persone in tutto il mondo. Il coinvolgimento cardiaco relato alla depanocitosi e' la primcipale causa di morte nei pazienti falcemici. Sebbene l'esatto meccanismo responsabile di questa cardiomiopatia non sia ancora noto, un possibile ruolo dell' ischemia subacuta e' stato invocato nei pazienti con drepanocitosi durante gli eventi vaso-occlusivi acuti (VOCs). In questo progetto ci siamo avvicinati a questa problematica utlizzando un approccio di omica integrata in un modello murino umanizzato per anemia falciforme esposto ad uno stress di ipossia/ reossigenazione (I/R) che a tutti gli effetti mima la VOCs. In questo setting abbiamo poi valutato l'effetto del trattamento con 17R-Resolvin D1, membro della superfamiglia dei lipidi pro-risolutivi. In trattamento con 17R-Resolvin D1 e' stato in grado di prevenire l'attivazione indotto da I/R di vie di segnale pro-fibrotico e pro-angiopatico a livello cardiaco. Queste pathway intersecano proteine e miRNA coinvolti nel signali pro-infiammatorio che innesca una risposta miocardica pro-fibrotica guidata dai neutrofili tissutali. Il trattamento con 17R-Resolvin D1 (i) modula in MiRNOMA; (ii) previene l'attivazione di NF-KB p65; (iii) protegge contro l'attivazione delle pathway pro-fibrotiche PDFGB e TGFb mediat; (iv) reduce il segnale HIF mediato di neo-angiogenesi; e (v) riduce il pattern cellularepro-apoptotico innescato da I/R. Pertanto i nostri dati dimostrano un nuovo ruolo di "unresolved inflammation" (infiammazione non risolta) nella disfunzione del cardiomiocita in risposta a I/R in un modello di anemia falciforme. Pertanto, il nostro studio contribuisce a comprendere meglio i meccanismi che sottendono lo sviluppo della cardiomiopatia relata alla drepanocitosi e fornisce nuove evidenze del ruolo protettivo del trattamento con 17R-Resolvin D1 nella drepanocitosi.

199

Genetic hematologic disease

Wiskott-Aldrich syndrome

NANOENGINEERED 3D CULTURE SUBSTRATE ENABLES SUPERIOR LONG-TERM AND POLYCLONAL ENGRAFTMENT OF GENETICALLY ENGINEERED HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS

Midena Federico[1], L. Alessandrini[1], C. Conci[2], M. Barcella[1], F. Gazzo[1], E. Jacchetti[2], F. Benedicenti[1], E. Carsana[1], R. Vacca[1] S. Arévalo[1], E. Zonari[1], F. Ferrua[1], L. della Volpe[1], G. Farina[1] M. Fiumara[1], F. Fraschetta[1], K. Giannetti[1], T. Tavella[1], S. Ferrari[1] M. Radrizzani[1], I. Merelli[1], B. Gentner[1], L. Naldini[1],A. Aiuti[1]

E. Montini[1], M.T. Raimondi[2], R. Di Micco[1]

[1]Milano, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[2]Milano, Politecnico Di Milano

Project: TGT22C05; Di Micco Raffaella

Engineering of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) for gene therapy applications requires ex vivo culture to deliver the editing reagents and achieve a sizable fraction of engineered cells. However, ex vivo culture inadvertently leads to differentiation, proliferative stress, and DNA damage, resulting in stem cell dysfunction and potentially threatening clinical success. Given the limitations of traditional 2D cultures, we employed a biocompatible 3D scaffold to provide mechanical support to HSPCs and counteract culture stress. Thus, we found that 3D culture improved HSPC multi-lineage differentiation and engraftment capacity by leveraging mechanobiological control over nuclear morphology, cytoskeleton organization, metabolism, and DNA integrity. Moreover, this system enabled efficient genetic engineering across multiple platforms, including Cas9/AAV6-mediated gene editing, base- and prime-editing, and lentiviral gene addition. Most importantly, this 3D scaffold increased the clonal output and long-term persistence of engineered cells upon xenotransplantation, conceivably enabling more efficient and safer therapeutic applications. Finally, we validated our findings in a clinically relevant setting by implementing our system into the clinically approved gene therapy protocol for Wiskott-Aldrich Syndrome. Using patient-derived samples and GMP-compliant vectors and reagents, we found superior engraftment and clonal complexity of 3D cultured-engineered cells compared to traditional 2D culture. Overall, our results highlight the importance of 3D interactions for the maintenance of HSPC biological properties during ex vivo manipulation and have the potential to translate into clinical outcomes like improved efficacy, faster recovery post-transplant, and increased clonal complexity with reduced risk of potential long-term development of clonal hematopoiesis.

Malattie genetiche ematologiche

sindrome di Wiskott Aldrich; WAS; sindrome eczema-trombocitopenia-immunodeficienza;

ATTECCHIMENTO POLICLONALE A LUNGO TERMINE DI CELLULE EMATOPOIETICHE STAMINALI GENETICAMENTE INGEGNERIZZATE SU UN SUBSTRATO 3D

L'ingegneria di cellule staminali e progenitrici ematopoietiche per applicazioni di terapia genica richiede una coltura ex vivo per veicolare i reagenti di ingegneria e ottenere una frazione considerevole di cellule modificate. Tuttavia, la coltura ex vivo porta inavvertitamente a differenziamento, stress proliferativo e danni al DNA, con conseguente disfunzione delle cellule staminali e potenziale perdita di efficacia clinica. Date le limitazioni delle colture 2D tradizionali, abbiamo impiegato un substrato 3D biocompatibile per fornire supporto meccanico alle cellule e contrastare lo stress della coltura. Così, abbiamo scoperto che la coltura 3D migliorata il potenziale di differenziamento e l'attecchimento delle cellule sfruttando il controllo meccanobiologico sulla morfologia nucleare, l'organizzazione del citoscheletro, il metabolismo e l'integrità del DNA. Inoltre, questo sistema consente un'ingegneria genetica efficiente su più piattaforme, tra cui l'editing genetico con Cas9/AAV6, base- e prime-editing e vettori lentivirali. Ancora più importante, questo scaffold 3D ha aumentato la produzione clonale e la persistenza a lungo termine delle cellule ingegnerizzate dopo xenotrapianto. Infine, abbiamo convalidato i nostri risultati in un contesto clinicamente rilevante implementando il nostro sistema nel protocollo di terapia genica per la sindrome di Wiskott-Aldrich. Utilizzando campioni derivati dai pazienti e vettori e reagenti

conformi a GMP, abbiamo confermato un attecchimento e una complessità clonale superiori delle cellule ingegnerizzate coltivate in 3D. Nel complesso, i nostri risultati evidenziano l'importanza delle interazioni 3D per il mantenimento delle proprietà biologiche delle cellule durante la manipolazione ex vivo e hanno il potenziale di consentire applicazioni terapeutiche più efficaci e sicure.

200

Rare blood disorders

Juvenile myelomonocytic leukemia

Acute myeloid leukemia

EMBRYONIC HEMATOPOIETIC STEM AND PROGENITOR CELLS SHOW DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITY TO LEUKEMIC TRANSFORMATION UPON ACQUISITION OF JMML-ASSOCIATED KRASG12D MUTATION

Barone Cristiana[1], G. Quattrini[1], A. Muratore[1], G. Zambelli[1]
F. Timoteo-Ferreira[1], R. Orsenigo[1], C. D'Orlando[1], D. D'Aliberti[1]
B. Vergani[1], M. Naghavi[1], T. Durfort[1], S. De Marco[1], C. Bianchi[1]
R. Menever[1], S. Brunelli[1], R. Piazza[1], L. Belver[2], G. Gaipa[3]
E. Azzoni[1]

[1]Monza, Università Di Milano Bicocca
[2]Barcellona, Josep Carreras Leukaemia Institute
[3]Monza, Fondazione Tettamanti Onlus

Project: GJC22013; Azzoni Emanuele

Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) is a rare myeloproliferative neoplasm of early childhood, caused by a mutation in the RAS pathway. JMML is clinically heterogeneous and often originates prenatally, but the precise identity of disease propagating cells is still unclear. To investigate the cellular origin of JMML, we generated a preclinical model (Cdh5-CreERT2:: KrasLSL-G12D::R26tdTomato transgenic mice) in which we can selectively target the KrasG12D to distinct subset of hematopoietic progenitors emerging from Cdh5+ hemogenic endothelium during embryonic development. Here, we demonstrate that embryonic hematopoietic progenitors show differential susceptibility to JMML-associated mutations. Targeting KrasG12D to erythromyeloid progenitors (EMPs), emerging at E7.5, results in a low-penetrance myeloproliferative disorder with late onset, suggesting that EMPs are not the main cells of origin of JMML. Unexpectedly, targeting KrasG12D to fetal-restricted hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), emerging at E8.5, or HSCs emerging at E10.5, caused lethal fetal anemia, due to defective erythroid differentiation, more severe if targeted to fetal HSPCs. To circumvent embryonic lethality, we induced KrasG12D in a mosaic-like fashion in HSPCs at E8.5 or HSCs at E10.5, which caused a fully penetrant leukemic phenotype in adult mice with a strong increase in the myelo-monocytic lineage, more aggressive and transplantable when induced the latter. These data suggest that both fetal-restricted HSPCs and HSCs could be involved in the pathogenesis of JMML, and that disease heterogeneity could be partially explained by variability in the cell of origin. We are currently analyzing the molecular and epigenetic changes KrasG12D-linked. Moreover, our preliminary data suggest that patients-derived JMML HSPCs exhibit features of enhanced inflammation, so we are investigating its role in disease onset and/ or progression using our mouse model and JMML humanized mice model (PDX).

Malattie rare del sangue

Leucemia mielomonocitica giovanile; Leucemia mielomonocitica cromica giovanile; JMML;

Leucemia Mieloide Acuta; AML

LE CELLULE STAMINALI E PROGENITRICI EMATOPOIETICHE EMBRIONALI MOSTRANO SUSCETTIBILITÀ DIFFERENZIALE A TRASFORMAZIONE LEUCEMICA IN SEGUITO ALL'ACQUISIZIONE DELLA MUTAZIONE KRASG12D ASSOCIATA ALLA JMML

La leucemia mielomonocitica giovanile (JMML) è una rara neoplasia mieloproliferativa infantile, causata da mutazioni nella via RAS. La JMML è clinicamente eterogenea e spesso ha origine prenatale, ma l'identità precisa delle cellule che propagano la malattia rimane ancora incerta. Per studiarne l'origine cellulare, abbiamo sviluppato un modello murino (Cdh5-CreERT2::KrasLSL-G12D::R26tdTomato) che ci permette di attivare la mutazione KrasG12D in specifici progenitori ematopoietici embrionali. Mostriamo che i progenitori eritro-mieloidi (EMPs, E7.5) hanno bassa suscettibilità alla JMML, poiché la mutazione in questi porta solo a una lieve espansione mieloide tardiva. Al contrario, l'attivazione di KrasG12D nei progenitori ematopoietici e nelle cellule staminali ematopoietiche HSPCs fetali (E8.5) o nelle HSCs (E10.5) provoca grave anemia embrionale letale per un difetto nella differenziazione eritroide. Per aggirare questa letalità, abbiamo indotto la mutazione a mosaico negli HSPCs a E8.5 o nelle HSCs a E10.5, riuscendo in questo modo ad ottenere JMML pienamente penetrante nei topi adulti, con espansione mielo-monocitica aggressiva e trapiantabile, più severa se indotta nelle HSCs. I nostri dati suggeriscono che sia gli HSPCs fetali che le HSCs possano contribuire alla JMML e che l'eterogeneità della malattia possa dipendere dalla cellula d'origine. Stiamo analizzando le alterazioni molecolari ed epigenetiche associate alla mutazione KrasG12D. Inoltre i nostri dati preliminari indicano che gli HSPCs dei pazienti JMML mostrano infiammazione aumentata. Stiamo quindi indagando il ruolo dell'infiammazione nell'insorgenza e progressione della JMML usando il nostro modello murino e un modello umanizzato (PDX).

201

Rare blood disorders

Myeloproliferative neoplasm

Essential thrombocythemia

UNVEILING MED12L: A POTENTIAL NOVEL ORCHESTRATOR OF PLATELET DYSFUNCTION IN MYELOPROLIFERATIVE MYELOID NEOPLASMS

M. Brindisi[1], L. Crisafulli[1], M. Zampini[2], M. Liturri[2], E. Riva[2]
A. Campagna[2], M. Bacci[2], L. Lanino[2], M. Ubezio[2], G. Todisco[3]
G. Maggioni[2], A. Russo[2], N. Manes[2], D. Ventura[2], N. Pinocchio[2]
D. Strina[1], L. Susani[1], M.G. Della Porta[3], F. Ficara[1]

[1]Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche
[2]Rozzano, Milan, Humanitas Research Hospital
[3]Pieve Emanuele, Milan, Humanitas University

Project: GJC21072; Ficara Francesca

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are rare chronic blood disorders initiated by mutations in hematopoietic stem cells (HSC), characterized by increased production of platelets (PLT) or

erythrocytes. Managing treatment, staging, and disease progression prediction remains challenging, increasing public health costs and the risk of thrombotic events or leukemic evolution. Here, we investigated MED12L, a component of the Mediator complex involved in the transcription of HSC genes, envisioning a role in MPN. To assess the physiologic role of MED12L, we employed Med12l KO mice. Additionally, we analyzed MED12L expression in cells from MPN patients and healthy donors (HD). Blood analysis of Med12l KO mice via hemocytometer and flow cytometry revealed several alterations of PLT features including increased mean volume, altered distribution width, increased area and complexity, and higher surface expression of the CD41/CD61 integrin compared to WT. Larger size and complexity suggested defects in PLT maturation, confirmed by a higher frequency of reticulated PLT in Med12l KO mice, as shown by nucleic acid content, and by increased endoplasmic reticulum, as revealed by electron microscopy analysis. FACS analysis of BM cells along the hematopoietic hierarchy showed no differences in Med12l KO compared to WT, suggesting that the increase of reticulated PLT arises from a defect in late-stage development. Of note, scRNAseq data indicate elevated MED12L and almost exclusive expression in PLT within the blood of MPN patients compared to HD, and robust correlation with PLT features. Moreover, BM CD34+ cells from MPN patients exhibited higher MED12L expression than HD. These findings identify MED12L as a novel player in PLT biology and suggest its link to MPN, highlighting its potential as a therapeutic target and biomarker in myeloid neoplasms. Further studies are ongoing to validate these findings and explore the clinical value of MED12L in MPN management.

Malattie rare del sangue

Neoplasie mieloproliferative

Trombocitemia Essenziale

ALLA SCOPERTA DI MED12L: UN NUOVO PROTAGONISTA NELLA DISFUNZIONE PIASTRINICA ASSOCIATA ALLE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono malattie croniche del sangue dovute a mutazioni nelle cellule staminali ematopoietiche (HSC), caratterizzate da aumento della produzione di piastrine (PLT) o degli eritrociti. La gestione della malattia è complessa, con elevati costi sanitari e rischio di eventi trombotici o evoluzione leucemica. In questo studio abbiamo analizzato MED12L, componente del complesso Mediator coinvolto nella trascrizione dei geni delle HSC, ipotizzandone un ruolo nelle MPN. Per valutarne la funzione, abbiamo utilizzato sia un modello murino privo di MED12L (Med12l KO) sia cellule di pazienti MPN e di donatori sani (HD). L'analisi del sangue nei topi Med12l KO ha mostrato alterazioni nelle caratteristiche delle PLT, tra cui aumento di volume medio, larghezza di distribuzione, area e complessità, e della espressione dei marcatori CD41/CD61 rispetto ai WT. L'aumento di dimensioni e complessità suggerisce difetti di maturazione piastrinica, confermati da un'elevata frequenza di piastrine reticolate evidenziata da un alto contenuto di acidi nucleici ed elevato contenuto di reticolo endoplasmatico, come indicato dalla microscopia elettronica. L'analisi delle diverse popolazioni cellulari del midollo osseo non ha rivelato differenze tra Med12l KO e WT, suggerendo che l'aumento di piastrine reticolate derivi da un difetto tardivo nello sviluppo. Dati di sequenziamento a singola cellula mostrano espressione di MED12L elevata e quasi esclusiva delle PLT in pazienti MPN rispetto agli HD, e forte correlazione con caratteristiche piastriniche. Inoltre, le cellule progenitrici del midollo osseo di pazienti MPN esprimono livelli più alti di MED12L rispetto agli HD. Questi risultati identificano MED12L come un nuovo regolatore della biologia delle piastrine, suggerendone il potenziale come biomarcatore e bersaglio terapeutico nelle MPN. Ulteriori studi sono in corso per validare questi risultati ed esplorare il valore clinico di MED12L nella cura delle MPN.

202

Genetic systemic or rheumatologic disease

AL amyloidosis

NANOBODIES AS NOVEL TOOLS TO TARGET CARDIAC LIGHT CHAIN AMYLOIDOSIS

BROGGINI LUCA[1], F. Sonzini[1], M.M. Barzago[2], V. Speranzini[1]
C. Pappone[3], M. Nuvolone[4], G. Palladini[4], L. Diomede[2]
S. Ricagno[1]

[1]MILANO, Università Degli Studi Di Milano Statale
[2]MILANO, Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS
[3]SAN DONATO MILANESE, Policlinico San Donato - IRCCS
[4]PAVIA, Università Di Pavia

Project: GJC23044; Ricagno Stefano, Nuvolone Mario

Systemic immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis is a protein misfolding disease caused by the conversion of immunoglobulin light chains (LC) from their soluble dimeric functional states into highly organized amyloid fibrils. Fibrillar deposition of LCs severely affects organ function and results in poor prognosis for patients, especially when heart involvement is severe. In addition to fibrillar deposition, a further important pathogenic factor is represented by the direct toxicity of soluble pre-amyloid LCs. With the goal of identifying alternative therapeutic strategies to tackle AL amyloidosis, we describe the identification and molecular determination of five llama-derived nanobodies (Nbs) directed to H3, an amyloidogenic LC from an AL patient with severe cardiac involvement. We demonstrated that the Nbs complexed to H3 abolish LC toxicity in the C. elegans in vivo model. We showed that Nbs stabilize H3 native fold and that they bind to their target with affinities in the nanomolar range. Finally, crystal structures of H3-Nb complexes show that Nbs form large interaction surfaces with H3 monomeric variable (VL) domains, stabilizing a partially monomeric LC conformation. Overall, our results show that by the formation of a stabilizing complex between soluble LCs and a specific binder, it is possible to abrogate LC cardiotoxicity; moreover, we picture an unreported partially monomeric LC dimer representing a conformation likely specific for amyloidogenic and toxic LCs. Such conformation may be the one directly responsible for the observed soluble cardiotoxicity or at least an obligate step towards the formation of the toxic species.

Malattie genetiche sistemiche o reumatologiche

Amiloidosi AL; Amiloidosi a catena leggera; Amiloidosi primitiva;

NANOBODIES COME NUOVI STRUMENTI PER COLPIRE L'AMILOIDOSI DA CATENE LEGGERE

L'amiloidosi sistemica da catene leggere di immunoglobuline (AL) è una malattia da mal ripiegamento proteico causata dalla conversione delle catene leggere di immunoglobuline (LC) dai loro stati funzionali dimetrici solubili in fibrille amiloidi altamente organizzate. La deposizione fibrillare delle LC danneggia gravemente la funzione degli organi e porta a una prognosi sfavorevole per i pazienti, specialmente quando il coinvolgimento

cardiaco è grave. Oltre alla deposizione fibrillare, un ulteriore importante fattore patogenetico è rappresentato dalla tossicità diretta delle LC pre-amiloidi solubili. Con l'obiettivo di identificare strategie terapeutiche alternative per affrontare l'amiloidosi AL, descriviamo l'identificazione e la determinazione molecolare di cinque nanobodies (Nb) derivati dal lama, diretti contro H3, una LC amiloidogenica di un paziente con AL e grave coinvolgimento cardiaco. Abbiamo dimostrato che i Nb complessati con H3 annullano la tossicità delle LC nel modello in vivo di C. elegans. Abbiamo mostrato che i Nb stabilizzano il ripiegamento nativo di H3 e che si legano al loro bersaglio con affinità nanomolare. Infine, le strutture cristallografiche dei complessi H3-Nb mostrano che i Nb formano ampie superfici di interazione con i domini variabili (VL) monomerici di H3, stabilizzando una conformazione parzialmente monomerica della LC. In generale, i nostri risultati mostrano che, mediante la formazione di un complesso stabilizzante tra le LC solubili e un legante specifico, è possibile annullare la cardiotossicità delle LC; inoltre, ipotizziamo l'esistenza di un dimero parzialmente monomerico di LC, mai descritto precedentemente, che rappresenta una conformazione probabilmente specifica per le LC amiloidogene e tossiche. Tale conformazione potrebbe essere quella direttamente responsabile per la cardiotossicità solubile osservata o almeno un passaggio obbligato verso la formazione delle specie tossiche.

203

Genetic systemic or rheumatologic disease

AGel amyloidosis

RATIONAL DESIGN OF INHIBITORS OF GELSOLIN AMYLOID AGGREGATION

de Rosa Matteo[1], L. Diomede[2], M. Bollati[1], K. Pagano[1], L. Ragona[1] S. Pellegrino[3]

[1]*Milano, CNR - Consiglio Nazionale Delle Ricerche*
[2]*Milano, Istituto Di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS*
[3]*Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale*

Project: GMR24T1097; de Rosa Matteo

Mutations in the gelsolin protein are responsible for a rare disease named AGel amyloidosis, where pathogenicity stems from the extracellular aggregation of fragments of the protein. There are no pharmacological therapies against this disease and patients can only rely on palliative treatments, which do not remove the source of toxicity. The underlying mechanism includes misfolding, proteolytic and aggregation events, all potential targets of pharmacological approaches. We chose to focus on the aggregation step of the pathway because it has been validated for similar diseases. Exploiting a structure-based approach, we recently designed and synthesised peptidomimetics that efficiently inhibit the amyloid aggregation of gelsolin fragments in vitro. We also observed that they counter the proteotoxicity associated with gelsolin aggregation in a C. elegans-based assay. Starting from these available hits, we plan to: i) characterize their mechanism of action at a molecular level , ii) develop a transgenic C. elegans model of the disease and use it to test in vivo the available molecules. By the end of the project, we expect to have identified a small library of well characterised molecules already validated on the invertebrate model of AgeI, and to provide a toolbox that could be exploited for other similar diseases.

Malattie genetiche sistemiche o reumatologiche

Amiloidosi AGeI; amiloidosi da gelsomino

PROGETTAZIONE DI INIBITORI DELL'AGGREGAZIONE AMILOIDE DELLA GELSOLINA

Se i tumori sono a volte descritti come una malattia di alcune cellule che le fa impazzire, le amiloidosi, in analogia, possono essere considerata la malattia delle proteine, che perdono la loro forma naturale e funzionale e aggregano. Questi aggregati di proteine crescono nel tempo fino a formare lunghe fibre che si depositano in diversi organi dove causano infiammazione e danni meccanici. Nell'AgeI amiloidosi, la proteina gelsolina eredita questa malattia che ne causa la sua frammentazione. Questi piccoli frammenti si riconoscono e assemblano come una colonna di mattoncini giocattolo. Bloccare questo processo potrebbe prevenire l'evolversi della malattia. Cosa accadrebbe se costruissimo dei mattoncini con le stesse sporgenze superiori dei frammenti di gelsolina ma senza le cavita` inferiori? Questo finto- mattoncino potrebbe unirsi agli altri ma non permettere ulteriori costruzioni? Ispirati da queste domande, abbiamo costruito 3 di questi mattoncini sintetici e 2 si sono mostrati capaci di rendere il processo di impilamento meno efficiente. Sulla base di queste preliminari ma promettenti osservazioni, ci proponiamo di indagare meglio il meccanismo e la struttura di questi mattoncini sintetici ma soprattutto di produrne altri ancora piu` efficaci nel prevenire il processo. Per valutare l'efficacia di questi mattoncini in un contesto biologico, svilupperemo anche un verme che esprime la gelsolina umana, Questo modello animale della malattia, seppur semplice, permetterà di fare un passo avanti dal bancone del laboratorio verso il paziente.

204

Genetic systemic or rheumatologic disease

Oligoarticular juvenile idiopathic arthritis

CHARACTERIZATION OF MIR22HG EXPRESSION AND ROLE IN OLIGOARTICULAR JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS PATIENTS AT DISEASE ONSET

Briasco Federica[1], **S. Pelassa**[1], **F. Raggi**[1], **C. Artale**[1], **C. Rossi**[1] **S.M. Orsi**[2], **F. Orso**[3], **D. Taverna**[4], **M. Gattorno**[1], **A. Consolaro**[1] **M.C. Bosco**[1]

[1]*Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS*
[2]*Genova, Università Di Genova*
[3]*Torino, Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze della Salute, Centro Biotecnologie Molecolari "Guido Tarone"*
[4]*Genova, Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica, Salute Materno-Infantile, Università di Genova*

Project: GJC21089; Bosco Maria Carla

Oligoarticular Juvenile Idiopathic Arthritis (OJIA), the most common form of pediatric rheumatic disease, is characterized by joint immune cell infiltration and synoviocyte proliferation causing inflammation and cartilage erosion. While most patients achieve remission, others exhibit a severe, treatment-refractory course with joint damage and functional impairment. Understanding OJIA molecular pathogenetic mechanisms may provide early biomarkers and therapeutic targets. Recent studies suggest that the long non-coding RNA MIR22HG, plays a role in adult arthritis, showing potential as a biomarker and therapeutic target. However, its expression/

function in OJIA remain unexplored. This study investigates MIR22HG expression in peripheral blood (PB)- and synovial fluid (SF)-derived cells from new-onset OJIA patients, correlation with patient clinical course at follow up and functional role. PB and SF from 30 OJIA patients were collected at onset, and CD14+ monocyte (Mn) and CD14- lymphocyte subsets were isolated. PB from 25 age/gender-matched controls was analyzed in parallel. Fibroblast-like synoviocytes (FLS) were isolated from SF of 8 patients. Cells were phenotypically characterized, and MIR22HG expression analyzed by RT-qPCR. MIR22HG expression was significantly higher in CD14+ than CD14- cells from both patients and controls. However, OJIA patients expressed lower MIR22HG than controls in both subsets with good discriminatory power, and expression correlated with clinical course at follow-up. FLS exhibited an inflammatory synovial sublining phenotype and expressed MIR22HG. To assess MIR22HG function, siRNA-mediated silencing was performed in THP-1 human monocytic and FLS cell lines, resulting in increased apoptosis,IL-6 and IL-1β secretion in THP-1 cells, and IL-6 and IL-8 in FLS. These findings suggest that MIR22HG deregulation in OJIA affects Mn and FLS viability and inflammatory activities, highlighting its potential as a disease biomarker and therapeutic target.

Malattie genetiche sistemiche o reumatologiche

Artrite idiopatica giovanile oligoarticolare

CARATTERIZZAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DEL RUOLO DI MIR22HG NEI PAZIENTI CON ARTRITE IDIOPATICA GIOVANILE OLIGOARTICOLARE ALL'ESORDIO DELLA MALATTIA

L'Artrite Idiopatica Giovanile Oligoarticolare (AIG) è la più comune malattia reumatica pediatrica, caratterizzata da infiammazione e danno articolare. Sebbene molti pazienti vadano in remissione, alcuni sviluppano forme refrattarie. Studiare i meccanismi molecolari dell'AIG potrebbe favorire l'identificazione di biomarcatori e target terapeutici. Recenti studi suggeriscono che il long non coding RNA MIR22HG abbia un ruolo nell'artrite dell'adulto, rendendolo un potenziale biomarcatore. Tuttavia, la sua espressione e funzione nell'AIG sono ancora inesplorate. Questo studio analizza l'espressione di MIR22HG nelle cellule del sangue periferico (PB) e del liquido sinoviale (SF) di pazienti con AIG, valutandone la correlazione con i parametri clinici dopo 1 anno di follow-up e la sua funzione biologica. Sono state isolate cellule mononucleate di PB e SF (PBMC, SFMC) da 30 pazienti con AIG, distinguendo monociti CD14+ e linfociti CD14-. Le PBMC di 25 controlli sani appaiati per età e sesso sono state analizzate. Inoltre, i Fibroblast-like synoviocytes (FLS) sono stati isolati da SF di 8 pazienti. L'espressione di MIR22HG è stata valutata tramite RT-qPCR. I risultati mostrano che MIR22HG è più espresso nei CD14+ rispetto ai CD14- in PBMC e SFMC sia nei pazienti che nei controlli. Tuttavia, nei pazienti con AIG, i livelli di MIR22HG sono inferiori rispetto ai controlli e differiscono tra i diversi decorsi della malattia. Gli FLS, con fenotipo infiammatorio (CD45-/CD90+/PDPN+), esprimono MIR22HG. Per analizzarne la funzione, è stato effettuato il silenziamento di MIR22HG con siRNA in cellule monocitiche THP-1 e FLS. La sua riduzione ha aumentato l'apoptosi e potenziato la secrezione di IL-6 e IL-1β in THP-1, e di IL-6 e IL-8 negli FLS. Questi dati suggeriscono che MIR22HG regola la vitalità cellulare e l'attività infiammatoria di monociti e FLS, evidenziandone il potenziale come biomarcatore e target terapeutico nell'AIG.

205

Genetic systemic or rheumatologic disease

STING-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI)

USE OF KINASE INHIBITORS TO TREAT INTERFERONOPATHIES

Frosio Luca[1], F. La Terza[1], R. M. Barouni[1], S. Barresi[1], S. Volpi[2] G. A. Ramirez[3], A. Manfredi[3], M. Genua[1], R. Ostuni[1]

[1]Milano, San Raffaele Telethon Institute For Gene Therapy (SR-Tiget)
[2]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS
[3]Milano, Università Vita Salute San Raffaele

Project: TGT22C17; Ostuni Renato

Interferonopathies are diseases characterized by excessive production of inflammatory proteins called interferons, whose lack of regulation leads to chronic inflammation in multiple organs. SAVI disease is a rare interferonopathy caused by a mutation in the STING1 gene, which encodes a sensor for microbial DNA and plays a key role in activating inflammatory genes. In this disease, STING1 is uncontrollably active, causing patients to experience a constant state of inflammation, which over time leads to tissue deterioration. Preliminary results from our laboratory have shown that inhibitors of a class of proteins called kinases can reduce interferon production in healthy immune cells. We have discovered that a specific kinase—primarily known for its role in regulating cell division—is also involved in triggering inflammation, such as that associated with SAVI. In response to an inflammatory stimulus, this kinase acts by attaching molecules to DNA at the level of genes encoding interferons, leading to their production. By blocking the kinase activity with the inhibitors, this modification—and thus gene activation—is prevented. In this project, we aim to test the effectiveness of these inhibitors in cells from patients affected by SAVI disease. Given the strong effect observed in healthy cells stimulated with inflammatory molecules, we expect that treating mutated cells with these inhibitors will reduce interferon production, restoring their normal balance. Further analyses will help characterize inflammation regulation in the immune system of these patients, providing a broader understanding of the molecular mechanisms involved and suggesting a potential therapeutic strategy to regulate the inflammatory response in this and other similar diseases.

Malattie genetiche sistemiche o reumatologiche

Vasculopatia associata a STING ad esordio infantile (SAVI)

USO DI INIBITORI DI CHINASI PER IL TRATTAMENTO DI INTERFERONOPATIE

Le interferonopatie sono malattie caratterizzate da una produzione eccessiva di proteine infiammatorie chiamate interferoni, il cui mancato controllo porta a un'infiammazione cronica di numerosi organi. La malattia di SAVI è una interferonopatia rara causata da una mutazione nel gene STING1, che codifica per un sensore del DNA dei microrganismi e che sta alla base dell'attivazione dei geni infiammatori. In questa malattia, STING1 è attivo in modo incontrollato e i pazienti vivono in uno stato di infiammazione costante che a lungo andare causa il deterioramento dei tessuti. Risultati preliminari nel nostro laboratorio hanno mostrato che gli inibitori di una classe di proteine chiamate chinasi sono in grado di abbassare la produzione degli interferoni nelle cellule immunitarie sane. Abbiamo infatti scoperto che una specifica chinasi, a oggi nota principalmente per essere un regolatore della divisione cellulare, è anche coinvolta nell'attivazione dell'infiammazione, come quella associata a SAVI. In presenza di uno stimolo infiammatorio, essa agisce attaccando delle molecole sul DNA delle cellule a livello dei geni che codificano per gli interferoni, portando alla loro produzione. Bloccando l'attività della chinasi con gli inibitori viene

impedita questa modifica, e quindi l'attivazione dei geni. In questo progetto vogliamo testare l'efficacia degli inibitori nelle cellule di pazienti affetti dalla malattia di SAVI. Dato il potente effetto osservato in cellule sane stimolate con molecole infiammatorie, ci aspettiamo che il trattamento delle cellule malate con gli inibitori abbassi la produzione degli interferoni, ristabilendo il loro normale equilibrio. Analisi più approfondite consentiranno di caratterizzare la regolazione dell'infiammazione nel sistema immunitario di questi pazienti, offrendo una visione più ampia dei meccanismi molecolari coinvolti e suggerendo un potenziale terapeutico per regolare la risposta infiammatoria in questa e altre patologie simili.

206

Genetic endocrine disease

Congenital adrenal hyperplasia

BRAIN ORGANOIDS MODELLING OF HORMONAL IMPACT ON NEURODEVELOPMENT TO UNRAVEL THE MOLECULAR BASIS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA NEUROPSYCHIATRIC SYMPTOMS

Caporale Nicolò[1]

[1]*Milano, Università Degli Studi Di Milano Statale*

Project: GJC23036; Caporale Nicolò, Villa Emanuele

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is a genetic disorder caused by the deficiency of the enzyme that synthesize cortisol in the adrenal cortex. This has cascading effects, leading to multiple hormonal imbalances that impact since early developmental stages on neurodevelopment. Despite CAH was first described more than 150 years ago, patients still suffer disease- and treatment-related adverse outcomes, such as neuropsychiatric morbidity. We are elucidating CAH molecular pathogenesis by experimentally manipulating hormonal signaling pathways in vitro. We carried out a massive profiling of cortical brain organoids at the level of bulk (400 samples), multiplexed single cell transcriptomics (about 500.000 cells), immunofluorescence stainings, and steroidomics, upon exposure to hormonal agonists and antagonists of 7 different pathways. This represents a multi-modal atlas of hormonal signaling in human neurodevelopment and allowed us to identify the cell type- and developmental trajectory-specific effects of hormonal pathways' perturbations. We also found the key observation that the transcription factor SP5 (target of the WNT/β-catenin pathway, and associated to cognitive traits by several GWAS) was significantly altered by hormonal imbalances that are relevant for CAH. We are thus analyzing the gene regulatory networks of SP5 as key molecular players for the neuropsychiatric events in CAH, and engineering an inducible cell line to modulate the expression of SP5 and test its ability to revert the molecular and cellular phenotypes induced by hormonal exposure. Finally, we will prioritize drugs, through repurposing strategies, that interact with SP5 and its targets, for pre-clinical validation. Bridging the knowledge gap in the pathogenesis of CAH, we are contributing to advancing our basic knowledge on the role of hormones on brain development, and will propose new therapeutic and preventive approaches for improving patients' quality of life.

Malattie genetiche endocrine

Iperplasia surrenalica congenita;CAH;

ORGANOIDI CEREBRALI PER LO STUDIO DELL'IMPATTO ORMONALE SULLE BASI MOLECOLARI DEI SINTOMI NEUROPSICHIATRICI DELL'IPERPLASIA SURRENALICA CONGENITA

L'iperplasia surrenalica congenita (CAH) è un disturbo genetico causato dalla carenza dell'enzima che sintetizza il cortisolo nella corteccia surrenale. Ciò ha effetti a cascata, portando a molteplici squilibri ormonali che hanno un impatto sin dalle prime fasi dello sviluppo sullo sviluppo neurologico. Nonostante la CAH sia stata descritta per la prima volta più di 150 anni fa, i pazienti soffrono ancora di esiti avversi correlati alla malattia e al trattamento, come la morbidità neuropsichiatrica. Il nostro lavoro ha l'obiettivo di studiare la patogenesi molecolare della CAH attraverso esperimenti con modelli cellulari umani. Abbiamo eseguito una profilazione massiva di organoidi cerebrali corticali a livello di trascrittomica (bluk e a singole cellule), immunofluorescenza e steroidomica, dopo esposizione ad agonisti e antagonisti ormonali di 7 diversi pathways. Ciò rappresenta un atlante multimodale della segnalazione ormonale nello sviluppo neurologico umano e ci ha permesso di identificare gli effetti specifici delle perturbazioni ormonali. Abbiamo da ciò scoperto che il fattore di trascrizione SP5 (bersaglio di WNT/β-catenina e associato a tratti cognitivi da diversi GWAS) è significativamente alterato dalle alterazioni ormonali che sono rilevanti per la CAH. Stiamo quindi analizzando i networks di regolazione genica di SP5 e progettando una linea cellulare ingegnerizzata per modulare l'espressione di SP5 e testare la sua capacità di invertire i fenotipi molecolari e cellulari indotti dall'esposizione ormonale. Colmando il divario di conoscenze sulla patogenesi della CAH, speriamo di caratterizzare in maniera più dettagliata il ruolo degli ormoni nello sviluppo del cervello e proporre nuovi approcci terapeutici e preventivi per migliorare la qualità della vita dei pazienti con CAH.

207

Genetic endocrine disease

Familial infantile gigantism

CLINICAL APPLICATIONS OF CHROMATIN CONFORMATION CAPTURE: 4C-SEQ/HIC DIFFERENTIATES PATHOGENIC AND NEUTRAL DUPLICATIONS AT THE GPR101 LOCUS

Trivellin Giampaolo[1], **F. Brancati**[2], **S. Cannavò**[3], **G. Mantovani**[4] **A. Lania**[1]

[1]*Milan, Humanitas University*
[2]*Aquila, Università Dell'Aquila*
[3]*Messina, Università Di Messina*
[4]*Milan, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico*

Project: GGP20130; Trivellin Giampaolo

X-linked acrogigantism (X-LAG) is a severe form of pituitary gigantism caused by duplications on chromosome Xq26.3 that involve the GPR101 gene. These duplications disrupt the topologically associating domain (TAD) surrounding GPR101, leading to the formation of a neo-TAD, which results in GPR101 misexpression by adopting ectopic enhancers. Given that X-LAG is fully penetrant and heritable, identifying duplications involving GPR101 in prenatal screenings raises significant clinical concerns for both geneticists and affected families. Therefore, understanding the functional

genomic impact of such duplications has critical clinical value, particularly in relation to gene regulation and triplosensitivity traits. To assess the functional impact of GPR101 duplications, we employed chromatin conformation capture techniques (4C-seq and HiC) as clinical tools. We constructed chromatin contact maps for patients with incidentally discovered GPR101 duplications and compared them with data from known X-LAG cases and healthy controls. This allowed us to analyze the integrity of the tissue-invariant GPR101-TAD boundary and the potential for neo-TAD formation. Our analysis revealed that duplications involving GPR101 that preserved the centromeric TAD boundary did not form a pathogenic neo-TAD or adopt ectopic enhancers. As a result, these duplications were classified as benign, excluding a diagnosis of X-LAG and eliminating the need for intensive clinical follow-up. This demonstrates the ability of chromatin conformation capture techniques to refine diagnoses by distinguishing between pathogenic and neutral duplications. The study highlights the critical role of TAD boundaries and chromatin interactions in determining the pathogenicity of copy number variants. This work provides proof-of-concept for using 4C-seq/HiC as a clinical tool to support genetic counseling and clinical decision-making in cases involving potential TADopathies."

Malattie genetiche endocrine

Gigantismo infantile familiare; Acrgigantismo legato all'X; Gigantismo infantile da iperplasia ipofisaria;Gigantismo infantile ereditario; Iperplasia ipofisaria ereditaria; X-LAG;

APPLICAZIONI CLINICHE DELLA CATTURA DELLA CONFORMAZIONE DELLA CROMATINA: 4C-SEQ/HIC DISTINGUE DUPLICAZIONI PATOGENICHE DA NEUTRE AL LOCUS GPR101

L'acrogigantismo legato all'X (X-LAG) è una forma grave di gigantismo ipofisario causata da duplicazioni sul cromosoma Xq26.3 che coinvolgono il gene GPR101. Queste duplicazioni alterano il dominio topologicamente associato (TAD) che include il gene GPR101, portando alla formazione di un nuovo TAD (neo-TAD) che determina un'alterata espressione di GPR101 attraverso l'adozione di enhancer ectopici. Poiché X-LAG è completamente penetrante ed ereditabile, l'identificazione di duplicazioni di GPR101 negli screening prenatali solleva importanti preoccupazioni cliniche per i genetisti e le famiglie coinvolte. Pertanto, comprendere l'impatto funzionale di tali duplicazioni ha un importante valore clinico. Per valutare l'impatto funzionale delle duplicazioni, abbiamo impiegato tecniche di cattura della conformazione della cromatina (4C-seq e HiC). Abbiamo costruito mappe di interazioni cromatiniche per pazienti con duplicazioni di GPR101 scoperte incidentalmente e le abbiamo confrontate con quelle di casi X-LAG e controlli sani. Questo ci ha permesso di analizzare l'integrità del TAD di GPR101 e la potenziale formazione di un neo-TAD. La nostra analisi ha rivelato che le duplicazioni di GPR101 che preservavano il limite centromerico del TAD non formavano un neo-TAD patogeno né adottavano enhancer ectopici. Di conseguenza, tali duplicazioni sono state classificate come benigne, escludendo una diagnosi di X-LAG ed eliminando la necessità di un follow-up clinico intensivo. Questo dimostra la capacità di queste tecniche di affinare le diagnosi distinguendo tra duplicazioni patogeniche e neutre. Lo studio evidenzia il ruolo critico dei confini TAD e delle interazioni cromatiniche nella determinazione della patogenicità delle varianti del numero di copie. Questo lavoro fornisce una prova di fattibilità per l'impiego di 4C-seq/HiC come strumento clinico a supporto della consulenza genetica nei casi che coinvolgono potenziali TADopatie.

208

Genetic tumor / neoplasia

Birt-Hogg-Dubé syndrome

DISSECTING THE ROLE OF THE V-ATPASE IN THE CONTEXT OF BHD SYNDROME

Di Malta Chiara[1], M. Tripari[2]

[1]Pozzuoli, NA, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)
[2]Pozzuoli, NA, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22CBDM08; Di Malta Chiara

"Birt-Hogg-Dubé (BHD) syndrome is a rare autosomal dominant disorder caused by mutations in the FLCN gene, which encodes the tumor suppressor folliculin. Heterozygous carriers are predisposed to fibrofolliculomas, pulmonary cysts, spontaneous pneumothorax, and kidney tumors, the latter being the most severe manifestation. Currently, there are no effective therapies beyond surgical resection, highlighting the need for novel treatment strategies. Folliculin, in complex with FNIP1/2, acts as a GTPase-activating protein (GAP) for RagC/D, regulating mTORC1 activity. Loss of folliculin leads to mTORC1 inactivation, causing constitutive nuclear localization of MiTF-TFE transcription factors (TFEB/TFE3), which in turn drive lysosomal biogenesis, autophagy, and mTORC1 hyperactivation. Persistent activation of these transcription factors is a critical driver of renal cystogenesis and tumorigenesis in both murine models and human patients. Genetic inactivation of TFEB or TFE3 has been shown to fully rescue the renal pathology associated with folliculin loss, underscoring their role as key effectors in BHD syndrome. Recent evidence implicates the vacuolar H+ ATPase (V-ATPase) as a critical regulator of mTORC1 activation by sensing amino acid availability within lysosomes. However, the precise mechanisms underlying this process remain unclear. Our recent and unpublished findings demonstrate that depletion of specific V-ATPase subunits restores proper TFEB/TFE3 localization in BHD cellular models. These findings suggest that modulating V-ATPase activity may represent a novel therapeutic strategy for BHD-associated kidney disease."

Tumori / neoplasie genetici

Sindrome di Birt-Hogg-Dubé; BHD; Fibrofolliculoma con tricodiscoma e acrocordoni;

ANALISI DEL RUOLO DELLA V-ATPASI NEL CONTESTO DELLA SINDROME DI BHD

La sindrome di Birt-Hogg-Dubé (BHD) è una rara malattia autosomica dominante causata da mutazioni nel gene FLCN, che codifica per il soppressore tumorale follicolina. I portatori eterozigoti sono predisposti allo sviluppo di fibrofolliculomi, cisti polmonari, pneumotorace spontaneo e tumori renali. Attualmente, non esistono terapie efficaci oltre alla resezione chirurgica, sottolineando la necessità di strategie terapeutiche innovative. La follicolina, in complesso con FNIP1/2, agisce come proteina attivante le GTPasi (GAP) per RagC/D, regolando l'attività di mTORC1. La perdita di follicolina porta all'inattivazione di mTORC1 e alla localizzazione nucleare costitutiva dei fattori di trascrizione MiTF-TFE (TFEB/TFE3), i quali promuovono la biogenesi lisosomiale, l'autofagia e l'iperattivazione di mTORC1. L'attivazione persistente di questi fattori di trascrizione è un determinante chiave della cistogenesi e tumorigenesi renale, sia nei modelli murini sia nei pazienti affetti da BHD. L'inattivazione genetica di TFEB o TFE3 è in grado di correggere completamente la patologia renale

associata alla perdita di follicolina. Evidenze recenti implicano la pompa vacuolare H+ ATPasi (V-ATPasi) come un regolatore critico dell'attivazione di mTORC1 . Tuttavia, i meccanismi precisi di questo processo rimangono poco chiari. I nostri recenti studi non ancora pubblicati dimostrano che la deplezione di specifiche subunità di V-ATPasi ripristina la corretta localizzazione di TFEB/TFE3 nei modelli cellulari di BHD. Questi risultati suggeriscono che la modulazione dell'attività di V-ATPasi potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per le patologie renali associate alla sindrome di BHD.

209

Other rare diseases

COVID-19

Cystic fibrosis

COVID-19 INFECTION

Cortese Mirko[1], S. Tiano[1], A. Venturini[1], G. Galietta[1]

[1]Pozzuoli, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)

Project: TGM22CBDM12; Cortese Mirko

The global SARS-CoV-2 crisis has highlighted critical gaps in global pandemic preparedness, emphasizing the need for comprehensive studies on infectious diseases and its implications for public health. As COVID-19 continues to pose significant health, economic, and social challenges worldwide, understanding the virus's transmission dynamics, mutation patterns, and interaction with host immune responses is essential for developing effective preventive measures and therapeutic strategies for future pandemics. It has been clearly demonstrated that people with pre-existing conditions and co-morbidities had an increased risks of adverse effects upon SARS-CoV-2 infections. This was especially true for all those pathologies affecting the respiratory tract, such as chronic pulmonary diseases. Individuals with cystic fibrosis (CF) often face compromised respiratory function and heightened susceptibility to respiratory infections. However, it has been shown that CF patients have reduced risk of developing severe COVID-19. Thus, to investigate the interactions between SARS-CoV-2 and pre-existing genetic conditions such as CF, we have analyzed, in collaboration with the group of Luis Galietta, the epithelia of CF patients demonstrating that the protective effect might be ascribed to both physical barriers and innate immune factors. This research can allow us to identify risk factors for specific populations, facilitating tailored healthcare strategies, and improving patient outcomes especially in presence of co-morbidities. Understanding the mechanisms of viral pathogenesis in the context of genetic disorders not only allows a better managment of COVID-19 patients, but also enhances our overall knowledge of viral infections in vulnerable groups.

Altre malattie rare

COVID-19

Fbrosi Cistica; FC; mucoviscidosi;

L'INTERAZIONE MOLECOLARE TRA FIBROSI CISTICA E INFEZIONE DA COVID-19

La crisi globale della SARS-CoV-2 ha evidenziato lacune critiche nella preparazione alle pandemie, sottolineando la necessità di effettuare studi approfonditi sulle malattie infettive e sulle loro implicazioni per la salute pubblica. La comprensione delle dinamiche di trasmissione del virus, dei modelli di mutazione e dell'interazione con le risposte immunitarie dell'ospite è essenziale per sviluppare misure preventive e strategie terapeutiche efficaci per le future pandemie. Sappiamo che condizioni di co-morbidità preesistenti comportano un rischio maggiore di effetti avversi in caso di infezione da SARS-CoV-2, in particolar modo per tutti i soggetti con patologie che interessano le vie respiratorie, come le malattie polmonari croniche. I soggetti affetti da fibrosi cistica (FC) hanno spesso una funzione respiratoria compromessa e una maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie. Tuttavia, è stato dimostrato che i pazienti affetti da FC hanno un rischio ridotto di sviluppare una COVID-19 grave. Pertanto, per indagare le interazioni tra SARS-CoV-2 e condizioni genetiche preesistenti come la FC, abbiamo analizzato, in collaborazione con il gruppo di Luis Galietta, gli epiteli di pazienti affetti da FC, dimostrando che l'effetto protettivo potrebbe essere attribuito sia a barriere fisiche che a fattori immunitari innati. La comprensione dei meccanismi della patogenesi virale nel contesto dei disordini genetici non solo consente una migliore gestione dei pazienti COVID-19, ma anche accresce la nostra conoscenza complessiva delle infezioni virali nei gruppi vulnerabili, permettendo lo sviluppo di strategie terapeutiche efficaci nel trattamento della malattia infettiva.

210

Other rare diseases

Rare cutaneous lupus erythematosus

COMPOSE LI(L)RA1 BALLAD: ENLIGHTEN ITS ROLE IN CUTANEOUS LUPUS ERYTHEMATOSUS

ANDREINI CAMILLA[1], C. Vasco[1], J. Geginat[1,2], M. Gerosa[3,2], R. Caporali[4,2], L. Argolini[4]

[1]Milan, Fondazione Istituto Nazionale Di Genetica Molecolare (Ingm)
[2]Università degli Studi di Milano
[3]Milan, Centro Specialistico Ortopedico Traumatologico Gaetano Pini-CTO,
[4]Milan, Centro Specialistico Ortopedico Traumatologico Gaetano Pini-CTO

Project: GJC22027; Geginat Jens, Vasco Chiara

Leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs) are immunomodulatory receptors that can have activatory or inhibitory functions. They are expressed on myeloid cells and their ligands comprise MHC class 1 molecules and angiopoietin-like proteins (ANGPTL). The LILRA1/LIR-6 receptor is a poorly characterized activatory receptor that is expressed on B cells and is associated with cutaneous lupus erythematosus (CLE). CLE is an autoimmune disease of the skin caused by the overactivation of B cells leading to the production of autoantibodies that can manifest alone or in combination with systemic lupus erythematosus (SLE). We hypothesized that LIR6 may promote B-cell activation and autoantibody production in CLE. Therapeutic antibodies that target receptors on B-cells are successfully used to treat SLE making LIR-6 a potential target for new immunomodulatory therapies. Phenotyping of immune cells in human blood unveiled that LIR6 was highly expressed on monocytes and dendritic cells but its expression was highly variable on B cells and most prominent on naïve B-cells. The inhibitory receptor LIR1 was in contrast highly

expressed on both B-cells and myeloid cells. Surprisingly, in CLE we observed a significantly lower expression of LIR6 on naïve and unswitched memory B-cells. In order to study the dynamics of LIR expression upon B cell activation, we stimulated B-cells with anti-IgM antibodies, CD40L and cytokines. LIR6 was transiently downregulated on activated B-cells 24 hours post stimulation suggesting that the observed down-regulation of LIR6 on B-cells in CLE may reflect ongoing B cell activation. We next performed T-B-cell co-cultures to address the role of LIRs in T-dependent antibody induction. Interestingly, anti-MHC class 1 antibodies that neutralize preferentially LIR1 ligands induced a dose-dependent down-regulation of LIR1 expression on B-cells. The effects of LIR agonists and antagonists on T-cell dependent antibody production is under investigation.

Altre malattie rare

Lupus eritematoso cutaneo raro; CLE;

LA BALLATA DI LI(L)RA1: ILLUMINARE IL SUO RUOLO NEL LUPUS ERITEMATOSO CUTANEO

I recettori leucocitari simili alle immunoglobuline (LIRs) sono molecole che regolano la risposta immunitaria con funzioni che possono essere attivatorie o inibitorie. Si trovano sulle cellule del sistema immunitario innato chiamate “mieloidi” e interagiscono con proteine specifiche (molecole MHC di classe 1 e angiopoietine). Il recettore LILRA1/LIR-6 è un recettore attivatorio poco studiato presente sui linfociti B e associato al lupus eritematoso cutaneo (CLE), una malattia autoimmune della cute. Nel CLE, l’attivazione eccessiva dei linfociti B porta alla produzione di autoanticorpi, causando infiammazione della cute. Questa condizione può manifestarsi da sola o associata al lupus eritematoso sistemico (SLE). Poiché alcune terapie per il SLE mirano ai recettori dei linfociti B, LIR-6 potrebbe essere un nuovo bersaglio per terapie immunomodulatorie. L’analisi delle cellule immunitarie nel sangue umano ha mostrato che LIR6 è molto presente sulle cellule mieloidi mentre sui linfociti B la sua espressione è variabile e più evidente nei linfociti B immaturi. Al contrario, il recettore inibitorio LIR1 è molto espresso sia sui linfociti B che sulle cellule mieloidi. Inaspettatamente, nei pazienti con CLE abbiamo riscontrato una riduzione significativa di LIR6 sui linfociti B immaturi. Per capire meglio come varia l’espressione di LIR6 durante l’attivazione dei linfociti B le abbiamo stimolate in coltura. Dopo 24 ore LIR6 è risultato temporaneamente ridotto suggerendo che la sua diminuzione nei pazienti con CLE potrebbe riflettere l’attivazione dei linfociti B. Infine, abbiamo studiato il ruolo dei recettori LIR nella produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Bloccando i ligandi di LIR1 con anticorpi anti-MHC di classe 1, abbiamo osservato una riduzione dell’espressione di LIR1 sui linfociti B. Attualmente stiamo approfondendo gli effetti stimolatori e inibitori dei ricettori LIR sulla produzione di anticorpi indotta dai linfociti T.

211

Other rare diseases

Systemic sclerosis

211Environmental Triggers in Systemic Sclerosis Pathogenesis: Modulation of Epigenetic Markers and the Role of Human Endogenous Retroviruses

D. Barbuto[1], G. Vacondio[1], L. Beretta[2], C. Bellocchi[2], L. Ferrari[1]

[1]Milan, Università Degli Studi Di Milano Statale

[2]Milano, Fondazione IRCCS Ca’ Granda - Ospedale Maggiore Policlinico

Project: GJC22046; Ferrari Luca, Bellocchi Chiara

Background: Systemic sclerosis (SSc) is a rare, multifactorial autoimmune disease characterized by vascular dysfunction, fibrosis, and autoantibody production. Environmental factors, including airborne pollutants, may contribute to disease onset in genetically susceptible individuals. However, the mechanisms underlying these interactions remain unclear. Studying early disease stages, such as preclinical SSc (PreSSc), is crucial to understanding initial pathogenic events.

Objective: We propose human endogenous retroviruses (HERVs) as epigenetic biomarkers sensitive to environmental triggers and potentially involved in early SSc pathogenesis. HERVs, remnants of ancestral retroviral infections, constitute ~8% of the human genome and act as immune regulators linked to autoimmunity. Their activation is highly responsive to epigenetic modifications, making them ideal candidates to study environmentally induced immune dysregulation in PreSSc.

Methods: We enrolled 26 PreSSc patients at diagnosis, with a second blood sampling scheduled at one and two years. Individual exposure to PM10, PM2.5, NO_2, and O_3 was estimated for each patient. DNA methylation profiling is being conducted on PBMCs using methylome arrays to assess short- and long-term pollutant-induced changes in HERV methylation.

Expected Impact: Our study aims to elucidate the role of HERVs as environmentally responsive epigenetic modulators in PreSSc. Identifying early methylation changes could provide novel insights into SSc etiology and support the identification of potential early biomarkers predictive of disease progression.

Altre malattie rare

Sclerosi Sistemica; SSc

TRIGGER AMBIENTALI NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI SISTEMICA: MODULAZIONE DI MARKER EPIGENETICI E RUOLO DEI RETROVIRUS ENDOGENI UMANI

Background: La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia autoimmune rara e multifattoriale, caratterizzata da disfunzione vascolare, fibrosi e produzione di autoanticorpi. I fattori ambientali, inclusi gli inquinanti atmosferici, possono contribuire all’insorgenza della malattia in individui geneticamente predisposti. Tuttavia, i meccanismi alla base di queste interazioni rimangono poco chiari. Lo studio delle fasi iniziali della malattia, come la sclerosi sistemica preclinica (PreSSc), è cruciale per comprendere gli eventi patogenetici precoci.

Obiettivo: Proponiamo i retrovirus endogeni umani (HERVs) come biomarcatori epigenetici sensibili ai trigger ambientali e potenzialmente coinvolti nella patogenesi precoce della SSc. Gli HERVs, derivati da infezioni retrovirali ancestrali, costituiscono circa l’8% del genoma umano e svolgono un ruolo nella regolazione immunitaria, connesso all’autoimmunità. La loro attivazione è altamente sensibile alle modificazioni epigenetiche, rendendoli candidati ideali per lo studio della disregolazione immunitaria indotta da fattori ambientali nella PreSSc.

Metodi: Abbiamo arruolato 26 pazienti con PreSSc alla diagnosi, con un secondo prelievo di sangue programmato a uno e due anni. Per ciascun paziente è stata stimata l’esposizione individuale a PM10, PM2.5, NO_2 e O_3. Il profilo di metilazione del DNA viene analizzato su PBMCs mediante methylome

arrays per valutare le modificazioni della metilazione degli HERVs indotte dagli inquinanti a breve e lungo termine.

Impatto atteso: Il nostro studio mira a chiarire il ruolo degli HERVs come modulatori epigenetici sensibili ai fattori ambientali nella PreSSc. L'identificazione di alterazioni precoci della metilazione potrebbe fornire nuove conoscenze sull'eziologia della SSc e supportare l'individuazione di potenziali biomarcatori precoci predittivi della progressione della malattia.

212

Undiagnosed diseases with proven genetic origin

Novel neurodevelopmental disorder

LOSS OF FUNCTION OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM MEMBRANE PROTEIN JKAMP UNDERLIES A NEURODEVELOPMENTAL DISORDER

Morleo Manuela[1], P. Chacon-Millan[1], A. Delicato[1], A. Mahmood[1] A. Tirozzi[2]
Telethon Undiagnosed Diseases Program[12],
O.M. Atawneh[3], S. Salah[3], T. Atik[4], E. Avcı[4], E. Badak[4]
N.A. Almontashiri[5], B. Tabarki[6], M. Serafini[7], A. Torella[1],
C. Spampanato[1], I. Monfregola[1], A. Begemann[8], K. Steindl[8]
A. Rauch[8], M. Zweier[8], C. Gonzaga-Jauregui[9], R. Maroofian[10]
M. Zollino[11], F. Del Bene[7], B. Franco[1], R. Venditti[1], A. De Matteis[1], V. Nigro[1]

[1]Naples, Telethon Institute Of Genetics And Medicine (Tigem)
[2]Naples, Università Degli Studi Della Campania Luigi Vanvitelli
[3]Hebron, Palestine, Palestine Red Crescent Society Hospital
[4]Izmir, Turkey, Department of Pediatrics, School of Medicine, Ege University
[5]Al Madinah, Saudi Arabia, Center for Genetics and Inherited Diseases (CGID), Taibah University
[6]Riyadh, Saudi Arabia, Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, Prince Sultan Military Medical City
[7]Paris, France, Sorbonne Universite, INSERM U968, CNRS UMR 7210, Institut de la Vision
[8]Schlieren-Zürich, Switzerland, Institute of Medical Genetics, University of Zürich
[9]Juriquilla, México, International Laboratory for Human Genome Research, National Autonomous University of Mexico
[10]London, UK, Department of Neuromuscular Diseases, UCL Queen Square Institute of Neurology
[11]Rome, Università Cattolica Del Sacro Cuore - Roma
[12] *Naples, Telethon Undiagnosed Diseases Program*

Project: GSP15001-24; Nigro Vincenzo

The endoplasmic reticulum (ER) plays a crucial role in protein synthesis, folding, and the transport of secreted and membrane proteins. Pathogenic variants in genes affecting ER function have been implicated in Mendelian neurodevelopmental disorders (NDDs). Through whole-exome sequencing and collaboration via GeneMatcher, we identified eleven individuals with biallelic loss-of-function variants in JKAMP gene, which encods a seven-transmembrane endoplasmic reticulum (ER)-resident protein. Patients exhibit overlapping clinical features, including intellectual disability, developmental delay, hypotonia, brain abnormalities, microcephaly, seizures, and dysmorphic traits. To investigate the functional consequences of JKAMP depletion, we conducted immunofluorescence, electron microscopy, and biochemical analyses on patient-derived fibroblasts, HeLa, and SH-SY5Y cells. These analyses revealed significant ER enlargement in patient fibroblasts, indicating ER dysfunction. We further explored the impact of JKAMP loss on GPR37, a G protein-coupled receptor (GPCR) which interacts with JKAMP and is exclusively expressed in the brain and involved in oligodendrocyte differentiation and myelination. Loss of JKAMP resulted in impaired GPR37 trafficking, leading to its retention in the ER rather than reaching the plasma membrane, suggesting a potential link between GPCR transport defects and the central nervous system (CNS)-related symptoms observed in patients. To further support the pathogenic role of JKAMP loss, we generated a jkamp zebrafish model using CRISPR-Cas, which exhibited CNS abnormalities consistent with the patient phenotype. These findings provide compelling evidence that biallelic JKAMP loss-of-function variants cause a novel NDD, characterized by GPCR mis-trafficking and contributing to CNS pathology.

Malattie non diagnosticate di provata origine genetica

Nuovo disordine del neurosviluppo

LA PERDITA DI FUNZIONE DELLA PROTEINA DEL RETICOLO ENDOPLASMATICO JKAMP È ASSOCIATA AD UN NUOVO DISORDINE DEL NEUROSVILUPPO

Il reticolo endoplasmatico (ER) svolge un ruolo cruciale nella sintesi, nel ripiegamento e nel trasporto delle proteine della membrana plasmatica e di quelle secrete. Varianti patogenetiche che compromettono la funzionalità dell' ER sono state implicate in disturbi del neurosviluppo. Attraverso il sequenziamento dell'esoma e la collaborazione tra diversi gruppi clinici internazionali connessi tramite GeneMatcher, abbiamo identificato undici individui con varianti bialleliche con perdita di funzione nel gene JKAMP, che codifica per una proteina a sette domini transmembrana localizzata nell' ER, e con quadro clinico sovrapponibile. I pazienti mostrano disabilità intellettiva, ritardo dello sviluppo, ipotonia, anomalie cerebrali, microcefalia, crisi epilettiche e tratti dismorfici. La microscopia elettronica mostra un significativo ingrandimento dell'ER nei fibroblasti dei pazienti, suggerendo un'alterazione della sua funzionalità. Abbiamo analizzato l'impatto della perdita di JKAMP su GPR37, un recettore accoppiato a proteine G (GPCR) espresso esclusivamente nel cervello e coinvolto nel differenziamento degli oligodendrociti e nella mielinizzazione. L' analisi mostra che l'assenza di JKAMP compromette la degradazione e il traffico vescicolare di GPR37, determinandone la ritenzione nell' ER invece del corretto trasporto alla membrana plasmatica, suggerendo un possibile legame tra i difetti nel trasporto dei GPCR e i sintomi a carico del sistema nervoso centrale (SNC) osservati nei pazienti. Abbiamo inoltre generato un modello mutante in zebrafish mediante CRISPR-Cas, che ha mostrato anomalie del SNC coerenti con il fenotipo osservato nei pazienti. Questi risultati forniscono evidenze convincenti che le varianti bialleliche con perdita di funzione in JKAMP determinano un nuovo disordine dello sviluppo, caratterizzato da alterazioni nel traffico dei GPCR.

213

Biobanking and facilities

National Facilities

HUMAN TECHNOPOLE NATIONAL FACILITIES: ENHANCING YOUR RESEARCH THROUGH ADVANCED BIOIMAGE ANALYSIS APPROACHES

Cammarota Eugenia[1], D. E. Dalle Nogare

[1]Milano, Human Technopole

Human Technopole National Facilities (NFs) are newly established research infrastructures that provide access to cutting-edge technologies and know-how in the fields of genomics, genome engineering and disease modelling, structural biology, light imaging and data handling and analysis. The NFs aim to increase the impact of the Italian scientific community at the international level, supporting researchers in the development of multidisciplinary research projects.

The Bioimage Analysis Unit, part of the NF for Data Handling and Analysis, houses a team of experts of light and electron microscopy image analysis as well as a team of software engineers. Its mission is to support researchers in finding high-quality image analysis solutions, including Quality Control (QC), denoising and image restoration, segmentation, and basic quantification for imaging data. It also develops and maintains new open-source image analysis tools that are included in the service portfolio and released to the broader community.

Dedicated support is available for researchers affiliated to Italian Universities, IRCCS and Public Research Entities, who can request free of charge access to the NF services. The access is granted through open calls published during the year on the HT website at https://humantechnopole.it/en/.

214

Biobanking and facilities

Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB)

TNGB ONWARDS: TWO DECADES OF ADVANCING RARE DISEASE BIOBANKING

Casareto Lorena[1], M. Calzolari[1], D. Coviello[2], L. Magistrelli[3], A. Renieri[4], E. Pegoraro[5], M. Sciacco[6], S. Gibertini[6] G. Merla[7], V. Nigro[8], E. Lamantea[9], L. Sangiorgi[1]

[1]Bologna, Istituto Ortopedico Rizzoli (Ior) - IRCCS
[2]Genova, Istituto Giannina Gaslini - IRCCS
[3]Milano, ASST G. Pini-CTO
[4]Siena, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese - Policlinico Le Scotte
[5]Padova, Azienda Ospedale-Università Padova
[6]Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico
[7]S. Giovanni Rotondo, Casa Sollievo Della Sofferenza - Opera Padre Pio IRCCS
[8]Napoli, Università Degli Studi Della Campania Luigi Vanvitelli
[9]Milano, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

Project: GTB18001; Sangiorgi Luca

The Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB, http://biobanknetwork.telethon.it/) is the first Italian non-profit network of RD biobanks founded in 2007 with the mission to support the RD research by providing high-quality biosamples and linked data to the scientific community. TNGB's uniqueness resides in the adoption of a centralised IT platform that enhances sample accessibility and manages the entire network workflow. The platform integrates the partner biobanks enabling standardisation and harmonisation of procedures, creation of the online catalogue and sample access managed via a request control panel, ensuring transparency and equity in accessing samples. The catalogue lists now 130,500 RD samples and over 1,500 RDs. In nearly 20 years, TNGB has distributed over 55,000 samples worldwide for diagnosis and research purposes leading to the publication of over 800 scientific papers and proving thus the TNGB as an invaluable resource in the RD research. TNGB has always been aware of the importance of biobanking as a service for patients, indeed it has delivered several activities for the patient/societal engagement. Patient representatives are indeed included in the TNGB governance and in the sample access process being therefore involved in the drafting of biobank policies, procedures and forms. TNGB's commitment to patient engagement led to the creation of an innovative agreement model allowing sample centralisation and enhancing trust and global access to valuable resources. TNGB, moreover, increases its impact by collaborating with several European RD-realities, such as BBMRI, EuroBioBank, ERDERA and the European Reference Networks. The development of TNGB's infrastructure has demonstrated the critical importance of networking, especially in RDs, implementing common policy and procedures respecting ethical standards and maintaining transparency and collaborating with similar infrastuctures and patient organisations focusing on RDs.

Biobanche e facilities

Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB)

TNGB: DUE DECADI DI SUCCESSI DELLA RETE TELETHON DI BIOBANCHE GENETICHE

La Rete Telethon di Biobanche Genetiche (TNGB, http://biobanknetwork.telethon.it/) è la prima rete italiana senza scopo di lucro di biobanche di malattie rare fondata nel 2007 per favorire la ricerca sulle malattie rare fornendo alla comunità scientifica campioni biologici e dati associati di alta qualità. L'unicità di TNGB risiede nell'adozione di una piattaforma informatica centralizzata che consente la standardizzazione e l'armonizzazione delle procedure, la creazione del catalogo online e assicura trasparenza ed equità nell'accesso ai campioni. Il catalogo elenca 130.500 campioni che rappresentano circa 1.500 patologie rare. In quasi 20 anni, il TNGB ha distribuito oltre 55.000 campioni in tutto il mondo a scopo diagnostico e di ricerca, contribuendo alla pubblicazione di oltre 800 articoli scientifici e dimostrando così che il TNGB è una risorsa inestimabile nella ricerca sulle malattie rare. TNGB è sempre stata consapevole dell'importanza del biobanking come servizio per i pazienti; infatti, ha promosso diverse attività per il coinvolgimento dei pazienti e della comunità. I rappresentanti dei pazienti sono infatti inclusi nella governance del TNGB e nel processo di accesso al campione, e sono quindi coinvolti nella stesura di policy, procedure e modulistica. L'impegno di TNGB nel coinvolgimento dei pazienti ha portato alla creazione di un modello di accordo innovativo che consente la centralizzazione del campione e favorisce l'accesso a risorse preziose. TNGB, inoltre, aumenta il suo impatto collaborando con diverse realtà europee di sviluppo rurale, come BBMRI, EuroBioBank, ERDERA e le reti di riferimento europee (ERN). Lo sviluppo dell'infrastruttura di TNGB ha dimostrato l'importanza fondamentale nel fare rete, in particolare nell'ambito delle malattie rare, nell'attuazione di politiche e procedure comuni e nella collaborazione con infrastrutture simili e organizzazioni di pazienti incentrate sulle malattie rare.

FONDAZIONE Telethon

INDICI

INDEX

Genetic developmental defect during embryogenesis

Difetti genetici dello sviluppo durante l'embriogenesi

Poster n. 1
Impaired mitochondrial biogenesis in the developing astrocytes contributes to the pathophysiology of 22q11 deletion syndrome
Mitocondri difettosi negli astrociti in via di sviluppo contribuiscono alla fisiopatologia della sindrome da delezione del cromosoma 22q11.
35

Poster n. 2
Mechanisms of cardiopharyngeal differentiation: pathogenesis and rescue of the DiGeorge syndrome phenotype.
Meccanismi di differenziamento cardiofaringeo: patogenesi e recupero del fenotipo della sindrome di DiGeorge
35

Poster n. 3
Mitochondrial dysfunctions in 22q11 deletion syndrome: a novel target for therapeutic intervention
Disfunzioni Mitocondriali nella Sindrome da Delezione 22q11: Un Nuovo Target per le strategie Terapeutiche
36

Poster n. 4
Oxytocin Seals the Brain Barriers Ameliorating the Immune-Behavioral Trajectories in 22q11.2 Deletion Syndrome
L'ossitocina chiude le barriere cerebrali migliorando le traiettorie di sviluppo nella sindrome da delezione 22q11.2
37

Poster n. 5
Exploring the role of the maternal-effect Padi6 gene in early mouse embryogenesis
Analisi del ruolo del gene a effetto materno Padi6 nell'embriogenesi precoce murina
37

Poster n. 6
Generation of a tgds knock-out zebrafish model to study the developmental defects in Catel-Manzke Syndrome
Generazione di un modello knock-out per il gene tgds in zebrafish per lo studio dei difetti di sviluppo della Sindrome di Catel-Manzke
38

Poster n. 7
A functional in vitro assay to assess the pathogenicity of missense variants in patients with Joubert Syndrome.
Un modello funzionale in vitro per valutare la patogenicità delle varianti missenso nei pazienti con Sindrome di Joubert.
38

Poster n. 8
The lipid-binding chaperone PDE6δ, mutated in Joubert syndrome-22, controls spatially-restricted protein degradation.
La proteina chaperone PDE6δ, mutata nella sindrome di Joubert 22, controlla la degradazione delle proteine in specifiche aree cellulari.
39

Poster n. 9
TDarkRAG: LLMs in the service of rare disease communication
TdarkRAG: LLMs al servizio della comunicazione delle malattie rare
40

Poster n. 10
Unravelling the molecular mechanism of Kabuki syndrome: a fresh look for a therapeutic innovation
Dissezionando il meccanismo molecolare alla base della sindrome di Kabuki: uno sguardo innovativo verso un nuovo approccio terapeutico
40

Poster n. 11
Dissecting the role of Sox2 in neurons of the visual thalamus: insights into developmental visual disorders
Studio del ruolo di Sox2 nei neuroni del talamo visivo: verso la comprensione delle malattie del sistema visivo
41

Poster n. 12
Connecting craniofacial malformations with neural crest splicing defects by defining the role of nuclear cyclophilin NKTR
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
42

Poster n. 13
Decoding the neural mechanisms linking emotion and social behavior in Autism Spectrum Disorder
Decodifica dei meccanismi neurali che legano emozione e comportamento sociale nell'autismo
42

Poster n. 14
Shank3 modulates Rpl3 expression and protein synthesis via mGlu5: implications for Phelan McDermid Syndrome
Shank3 modula l'espressione di Rpl3 e la sintesi proteica: implicazioni per la Sindrome di Phelan McDermid
43

Poster n. 15
Modeling Pitt-Hopkins syndrome and new pathogenetic variants of TCF4 by gene editing: a step forward toward precision medicine (HOPeFOR)
Caratterizzazione della sindrome di Pitt-Hopkins e di nuove varianti patologiche del gene TCF4 attraverso approcci di gene editing: un passo avanti verso la medicina personalizzata (HOPeFOR)
43

Poster n. 16
Ophthalmic imaging in Sturge-Weber syndrome: non invasive early diagnosis of choroidal hemangioma
Imaging oftalmologica nella sindrome di Sturge-Weber: diagnosi precoce e non invasiva degli emangiomi coroideali
44

Poster n. 17
Wolframin inactivation leads to bioenergetic loss and UPR-dependent ER stress that precede retinal ganglion cell degeneration
Difetti di bioenergetica cellulare ed aumentato stress del reticolo endoplasmatico sono le cause della degenerazione neuronale retinica nella sindrome di Wolfram
45

Poster n. 18
Wolfram syndrome is associated with an imbalance of the immune system and systemic inflammation
La sindrome di Wolfram è associata a uno squilibrio del sistema immunitario e ad infiammazione sistemica
45

Poster n. 19
Inflammation-driven nonsense-mediated decay inhibition impairs β cell survival in Wolfram Syndrome 1
L'inibizione dell'NMD mediata dall'infiammazione compromette la sopravvivenza delle cellule ß nella Sindrome di Wolfram di tipo 1
46

Inborn errors of metabolism
Difetti congeniti del metabolismo

Poster n. 20
Impaired nuclear glycogen metabolism affects liver homeostasis in Argininosuccinic aciduria.
Impatto dell'alterato metabolismo nucleare del glicogeno sull'omeostasi epatica nel aciduria arginosuccinica.
47

Poster n. 21
IFNγ-Mediated Immune Dysregulation of Macrophages in Lysinuric Protein Intolerance
Ruolo dell'interferone-gamma nell'alterazione funzionale dei macrofagi nell'intolleranza alle proteine con lisinuria
47

Poster n. 22
Exploiting redox-active molecules against mitochondrial diseases linked to complex III and complex I dysfunction
Sfruttare molecole redox-attive contro le malattie mitocondriali legate alla disfunzione del complesso III e del complesso I
48

Poster n. 23
Rescuing PNPase defects in bacterial and human cell models
Correggere difetti della PNPasi in modelli umani e batterici
49

Poster n. 24
Human MPV17 forms ion channels in a lipid bilayer
La proteina MPV17 forma canali ionici in un doppio strato lipidico
49

Poster n. 25
A mitochondria-targeted drug ameliorates respiration and improves motor endurance in a complex iii disease model
Un farmaco indirizzato ai mitocondri migliora la respirazione e la capacita' motoria in un modello di malattia del complesso iii
50

Poster n. 26
Exploring new therapeutic target for Niemann-Pick disease: the BET proteins
Esplorazione di un nuovo bersaglio terapeutico per la malattia di Niemann-Pick: le proteine BET
50

Poster n. 27
Dissecting the role of cytoplasmic signaling metabolites in Niemann-Pick disease type C
Studio dei metaboliti citoplasmatici nella patogenesi della malattia di Neimann-Pick di tipo C
51

Poster n. 28
Molecular Evolution of an Hyperfunctional β-galactosidase for the HSC Gene Therapy of GM1 Gangliosidosis
Evoluzione in vitro di un enzima ß-galattosiasi iperfunzionale per la terapia genica basata su cellule staminali e progenitrici ematopoietiche per la Gangliosidosi GM1
52

Poster n. 29
The prokineticin system and glia cells as pharmacological targets to control neuroinflammation and to relieve pain in a murine model of Fabry-Anderson disease
Il Sistema delle prochineticine e le cellule gliali come bersaglio farmacologico per controllare la neuroinfiammazione e alleviare il dolore in un modello murino di malattia di Anderson-Fabry
52

Poster n. 30
Liver-Directed Gene Targeting as a Potential Therapy for Fabry Disease
Terapia per la malattia di Fabry basata sull'editing genetico nel fegato senza l'utilizzo di nucleasi
53

Poster n. 31
Enhancing interactions with β-Glucocerebrosidase by cyclopropane-fused pipecolic acid derivatives
Come migliorare le interazioni con la ß-glucocerebrosidasi mediante derivati dell'acido pipecolico ciclopropanati
54

Poster n. 32
Enhancing GCase activity for Gaucher Disease: a novel multitarget approach through the synthesis of antioxidant/anti-inflammatory pharmacological chaperones.
Potenziare l'attività dell'enzima GCase per la malattia di Gaucher: un nuovo approccio multitarget attraverso la sintesi di nuovi chaperoni farmacologici antiossidanti e antinfiammatori.
54

Poster n. 33
Severe Gba1 Mutations: Identification Of Cellular Damages And A Novel Nanobody-Based Therapeutic Strategy In Neuronopathic Gaucher Disease
Mutazioni Di Gba1: Identificazione Dei Danni Cellulari E Nanobodies Come Nuova Strategia Terapeutica Nella Malattia Di Gaucher Neuronopatica
55

Poster n. 34
Tolerogenic dendritic cell-based immunotherapy to prevent unwanted immune response in enzyme replacement therapy for lysosomal storage disorders
Immunoterapia basata su cellule dendritiche tollerogeniche per prevenire la risposta immunitaria avversa nella terapia enzimatica sostitutiva per le malattie da accumulo lisosomiale
56

Genetic neurological disorder
Disordini genetici neurologici

Poster n. 58
Investigating mitochondrial alterations as novel therapeutic targets for the Aicardi-Goutières Syndrome
Studio delle alterazioni mitocondriali come nuovi bersagli terapeutici per la sindrome di Aicardi-Goutières
72

Poster n. 59
Targeting oligodendroglia to sustain brain development in primary autosomal recessive Microcephaly 17 (MCPH17) models
Correggere le disfunzioni dell'oligodendroglia per sostenere lo sviluppo del Sistema Nervoso Centrale in modelli di Microcefalia Autosomica Recessiva Primaria 17 (MCPH17)
73

Poster n. 60
New genome editing strategies for episodic ataxia and absence epilepsy: Optimizing splice isoforms for enhanced calcium channel function
Nuove strategie di editing genomico per l'atassia episodica e l'epilessia con assenza: Ottimizzazione delle isoforme di splicing per una migliore funzionalità dei canali del calcio
73

Poster n. 61
In vivo investigation of new disease-causing variants and pathogenic mechanisms underlying a recently identified neurodevelopmental disease caused by impaired Golgi dynamics (Golgipathy)
indagine in vivo di nuove varianti e del meccanismo patogenetico alla base di una malattia del neurosviluppo causata da alterazioni del Golgi (Golgipatia) recentemente identificata
74

Poster n. 62
Correcting FOXG1 activity levels by small RNA-analogs modulating the corresponding mRNA levels and their translation rates
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.
75

Poster n. 63
Neuronal activity control by products of Foxg1-responsive, Tdark Rnf genes
Controllo della attività neuronale da parte dei prodotti dei geni Tdark Rnf responsivi a Foxg1
75

Poster n. 64
Mechanisms and therapeutic targets of NEDAMSS, a novel regressive neurodevelopmental syndrome
Meccanismi e bersagli terapeutici di NEDAMSS, una sindrome del neurosviluppo con regressione
76

Poster n. 65
Modeling Piga deficiency in zebrafish
Generazione di un modello zebrafish con deficit del gene piga
77

Poster n. 66
Microglial NHD Trem2 gene controls neuronal metabolism and synapses during development.
Il gene microgliale TREM2 associato al Nasu-Hakola disease controlla il metabolismo neuronale e la sinaptogenesi durante il neurosviluppo
78

Poster n. 67
Dissecting the function of PRR12 and its role in Neuroocular Syndrome through a multi-omic approach
Dissezione funzionale del gene PRR12 e del suo ruolo nella sindrome neurooculare mediante un approccio multiomico
78

Poster n. 68
Dissecting the pathomolecular mechanisms of prr12 gene inactivation leading to neurodevelopmental and eye abnormalities
Analisi dei meccanismi patologici dell'inattivazione del gene prr12 responsabile delle alterazioni dello sviluppo neurologico e dell'occhio.
79

Poster n. 69
Recovering MCT8 mutants by CFTR correctors to treat Allan Herndon Dudley Syndrome
Recupero dei mutanti MCT8 tramite correttori CFTR per trattare la Sindrome di Allan Herndon Dudley
79

Poster n. 70
The natural antisense lncRNA PHOX2B-AS1 in the pathogenesis and as potential drug target in Congenital Central Hypoventilation Syndrome (CCHS)
L'RNA lungo non codificante (lncRNA) antisenso naturale PHOX2B-AS1 nella patogenesi e come potenziale bersaglio terapeutico nella Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)
80

Poster n. 71
A novel mutation in FDX2 provides insights into the pathogenesis of MEOAL mitochondrial myopathy
Una nuova mutazione in FDX2 suggerisce indicazioni sulla patogenesi della miopatia mitocondriale MEOAL
81

Poster n. 72
Developing Preclinical Models for Investigating Neurodevelopmental Disorders in Jamuar Syndrome
Sviluppo di Modelli Preclinici per Investigare i Disturbi del Neurosviluppo nella Sindrome di Jamuar
81

Poster n. 73
Subcellular localization of FSD1L, a T-dark protein associated to a novel neurodevelopmental disorder
Localizzazione subcellulare di FSD1L, una proteina T-dark associata a un nuovo disordine del neurosviluppo
82

Poster n. 74
CRISPR-CAS9-BASED FUNCTIONAL INVESTIGATION OF THE "DARK GENOME" IN SEARCH OF PUTATIVE DOWNSTREAM EFFECTORS OF SOX2 IN NEURODEVELOPMENTAL DISEASE
Uno screening con tecnologia CRISPR-Cas9 in organoidi cerebrali umani per identificare nuovi geni "T-dark" effettori di Sox2 nella patologia di sviluppo neurale
83

Poster n. 75.Pilot study for Unveiling ZNF865 role in undiagnosed rare neurodevelopmental disease (PUZZLE)
Studio pilota per la caratterizzazione funzionale del gene ZNF865 associato ad una patologia orfana con anomalie del neurosviluppo
83

Poster n. 76
TMEM151A, a new causative gene for Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia
TMEM151A un nuovo gene causa di Discinesia Parossistica Chinesigenica
84

Poster n. 77
NPAP1: The role of ancient gene variants in Prader-Willi syndrome pathophysiology
NPAP1: Il ruolo delle varianti genetiche antiche nella fisiopatologia della sindrome di Prader-Willi
85

Poster n. 78
Deconstructing the involvement of abnormally protracted corticogenesis in the etiology of cortical defects in a postnatal mouse model of Tuberous Sclerosis Complex
Analisi dei difetti corticali riscontrati in un modello murino postnatale di Sclerosi Tuberosa
85

Genetic neurological disorder/ Neurodegenerative diseases

Disordini genetici neurologici/Malattie Neurodegenerative

Poster n. 35
Targeting the mitochondrial enzyme monoamine oxidase B to treat mucopolysaccharidoses: a drug repurposing strategy
La monoamino ossidasi B come nuovo bersaglio per trattare le mucopolisaccaridosi: una strategia di riposizionamento dei farmaci
57

Poster n. 36
Exploring the link between amyloid deposition, autophagy dysfunction and neuro-inflammation in neuronopathic mucopolysaccharidoses
Studio del legame tra deposizione di proteine amiloidi, disfunzione dell'autofagia e neuroinfiammazione nelle mucopolisaccaridosi neurodegenerative
57

Poster n. 37
Role of Heparan Sulfate Active Residues in Driving Tauopathy in Sanfilippo Syndrome
Ruolo dei residui attivi di eparan solfato nella taupatia alla guida nella sindrome di Sanfilippo
58

Poster n. 38
Pharmacological stimulation of autophagy to rescue proteinopathy and cognitive decline in lysosomal storage disorders
Stimolazione farmacologica dell'autofagia per il recupero della proteinopatia e del declino cognitivo nelle malattie da accumulo lisosomiale
59

Poster n. 39
Combining phenotypic high-content imaging with the repurposing of drugs to tackle lysosomal storage disorders.
Combinare l'imaging fenotipico con il riposizionamento dei farmaci per studiare le malattie da accumulo lisosomiale
59

Poster n. 40
Exploiting advanced human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-based 3D models to study Globoid Cell Leukodystrophy.
Sviluppo di modelli 3D avanzati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) per lo studio della Leucodistrofia a Cellule Globoidi.
60

Poster n. 41
Modelling ultra rare diseases in Drosophila melanogaster: Towards genetic avatars of patients for functional study of Type B Kufs disease pathogenesis
Modellizzazione delle malattie ultra rare in Drosophila melanogaster: verso avatar genetici dei pazienti per lo studio funzionale della patogenesi della malattia di Kufs di tipo B
61

Poster n. 42
Insights into the role of lysosomal protein CLN5 in neurodegeneration using zebrafish as a tool
Analisi del ruolo della proteina lisosomiale CLN5 nella neurodegenerazione utilizzando il zebrafish come strumento
61

Poster n. 43
Repurposing of antidiabetic agents and identification of disease biomarkers by lipidomics analysis in a novel zebrafish model of cln8
Riposizionamento di farmaci antidiabetici e identificazione di biomarcatori della malattia tramite analisi lipidomica in un nuovo modello di zebrafish di CLN8
62

Poster n. 44
Role of myeloperoxidase-mediated neuroinflammation in aceruloplasminemia
Ruolo della neuroinfiammazione mediata dalla mieloperossidasi nell'aceruloplasminemia
63

Poster n. 45
Exploit iron-burden astrocytes and mouse models to define the therapy for PKAN and CoPAN.
L'utilizzo dei modelli astrocitari ricchi di ferro e dei modelli murini per definire la terapia per PKAN e CoPAN.
63

Poster n. 46
Genetic and cellular basis of the neurodegenerative pathology FENIB
Basi genetiche e cellulari della patologia neurodegenerativa FENIB
64

Poster n. 47
Role of aquaporin-4 isoform mutations in Megalencephalic Leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC)
Ruolo delle mutazioni dell'aquaporina-4 nella Leucoencefalopatia Megalencefalica con cisti sottocorticali (MLC)
65

Poster n. 48
Neuron-astrocyte interactions for spatial memory and their implications in familial Alzheimer's Disease
Interazioni neurone-astrocita per la memoria spaziale e relative implicazioni nella malattia di Alzheimer familiare
65

Poster n. 49
Cerebral vascularization and gliovascular interface characterization in the B6.152H mouse model of familial Alzheimer's disease.
Caratterizzazione del sistema vascolare cerebrale e dell'unità gliovascolare nel modello murino B6.152H di malattia di Alzheimer familiare.
66

Poster n. 50
Defective sialylation pathways represent a druggable target in Huntington's disease
Le alterazioni dei meccanismi di "sialilazione" rappresentano un bersaglio terapeutico nella Malattia di Huntington
67

Poster n. 51
Cholesterol-related synaptic signature in the prodromal Huntington's disease
Identificazione dei cambiamenti sinaptici associati al colesterolo nella fase prodromica di malattia di Huntington
67

Poster n. 52
DNA as driver of its own instability within the Huntington's disease locus
Il DNA come fattore chiave dell'instabilità del locus genico responsabile della malattia di Huntington
68

Poster n. 53
Exploring the therapeutic potential of cortical ADAM10 inhibition in Huntington's Disease
Inibire l'enzima ADAM10 in corteccia: una nuova strategia terapeutica per il trattamento della malattia di Huntington
69

Poster n. 54
CircHTT(2,3,4,5,6) – co-evolving with the HTT CAG-repeat tract - modulates Huntington`s Disease phenotypes
CircHTT(2,3,4,5,6) – che si evolve in sincronia con la regione ripetuta del gene HTT – modula fenotipi cellulari nella malattia di Huntington.
69

Genetic neurological disorder/Prion diseases
Disordini genetici neurologici/Malattie da Prioni

Poster n. 55
Fatal familial insomnia: preventive treatment with doxycycline of at risk individuals
Insonnia fatale familiale: Trattamento preventivo con doxiciclina in soggetti a rischio
70

Poster n. 56
Targeting the undruggable: chemical exploration of a prion protein degrader compound
Targeting the undruggable: esplorazione chimica di un degrader della proteina prionica
71

Poster n. 57
Structure-activity relationship studies of Zn(II)-BnPyP for the development of dual anti-prion drugs
Studi sulla relazione tra struttura e attività di Zn(II)-BnPyP per lo sviluppo di farmaci antiprionici con doppio meccanismo d'azione
71

Genetic neurological disorder/Intellectual Disabilities
Disordini genetici neurologici/Disabilit? Intellettive

Poster n. 79
The impact of neuronal SUMOylation in the pathogenesis of the Angelman Syndrome
L'impatto della SUMOilazione neuronale nella patogenesi della Sindrome di Angelman
86

Poster n. 80
MAU2 is required for zebrafish neurodevelopment
MAU2 è necessario per il neurosviluppo nello zebrafish
87

Poster n. 81
Role of Negr1 signaling dysregulation in Fragile X and other rare syndromic forms of autism
Ruolo della disregolazione di Negr1 nella sindrome della X Fragile e altre rare forme sindromiche di autismo.
87

Poster n. 82
Unraveling FMR1 Expression Dynamics and Cell-Type-Specific Proteome Alterations in a novel 3D human Brain Organoid Model of Fragile X Syndrome
Sviluppo di un modello innovativo per lo studio del silenziamento di FMR1 e delle alterazioni cellulari specifiche nella sindrome dell'X Fragile
88

Poster n. 83
A new RNA-based therapy for the Fragile X Syndrome
Un nuovo approccio terapeutico per la Sindrome dell'X Fragile basato sull'RNA
89

Poster n. 84
Structure-function characterization of TANC2, a novel postsynaptic candidate associated to neuropsychiatric disorders.
Caratterizzazione strutturale e funzionale di TANC2, un nuovo candidato postsinaptico associato a disordini neuropsichiatrici.
89

Poster n. 85
Investigation of novel accessory proteins of neuronal endosomal CLC-3 and CLC-4 antiporters involved in neurodevelopmental disorders
Studio di nuove proteine accessorie degli antiporter endosomiali neuronali CLC-3 e CLC-4 coinvolti in malattie dello sviluppo neuronale
90

Poster n. 86
Regulation of dendrite and dendritic spine formation by TCF20
Regolazione della formazione di dendriti e spine dendritiche mediata da TCF20
91

Poster n. 87
Unravelling WASHC4 brain-specific function to uncover its implication in intellectual disability
Scoprire la funzione cerebrale specifica di WASHC4 per scoprire la sua implicazione nella disabilità intellettiva
91

Poster n. 88
Impact of OPHN1 mutation on behaviour and brain network dynamics
Impatto di OPHN1 sul comportamento e sulla attività dei circuiti neuronali
92

Poster n. 89
Sphingolipid metabolic imbalance in murine and hiPSC RTT models: development of a drug repurposing-based therapy
Sbilanciamento del metabolismo degli sfingolipidi in modelli murini e hiPSC RTT: sviluppo di una terapia basata sul riposizionamento di farmaci.
92

Poster n. 90
Analysis of MeCP2 interaction with the splicing factor PRPF40B and potential implications for Rett Syndrome pathogenesis
Analisi dell'interazione di MeCP2 con il fattore di splicing PRPF40B e potenziali implicazioni per la patogenesi della sindrome di Rett
93

Poster n. 91
The therapeutic potential of atm inhibition in rett syndrome: insights from behavioral and molecular studies
Il potenziale terapeutico dell'inibizione di atm nella sindrome di rett: evidenze da studi comportamentali e molecolari
94

Poster n. 92
Evidence-based approach to treat hyperexcitability in Rett syndrome through splicing modulation
Strategia evidence-based per trattare l'iper-eccitabilità nella sindrome di Rett attraverso la modulazione dello splicing.
95

Poster n. 93
The interplay between HPCAL4 and MeCP2: identification and characterization of a novel putative target for Rett syndrome therapy
Studio di HPCAL e della sua interazione con MeCP2: identificazione e caratterizzazione di un nuovo possibile bersaglio terapeutico per il trattamento della sindrome di Rett
95

Poster n. 94.
Assessing the consequences of AMPARs defective transport in AP4 deficiency mouse model
Analisi delle conseguenze del trasporto difettivo di AMPAR in un modello murino con deficit di AP4
96

Poster n. 95
Loss of the X-linked Intellectual Disability gene ARHGEF6 affects the proliferation, differentiation, migration and electrical functions of forebrain inhibitory neurons
La mutazione del gene ARHGEF6, responsabile della Disabilità Intellettiva X-linked, causa difetti di proliferazione, migrazione e proprietà elettriche dei neuroni inibitori
96

Genetic neurological disorder/Epilepsy and Seizures

Disordini genetici neurologici/Epilessie

Poster n. 96
Understanding the mechanism and pathological consequences of mutations on the developmentally regulated SCN8A alternative splicing of exon 5
Comprensione del meccanismo e delle conseguenze patologiche delle mutazioni sullo splicing alternativo dell'esone 5 di SCN8A, regolato durante lo sviluppo
97

Poster n. 97
CDKL5 and InSyn1: unmasking the "dark" side of inhibitory innervation in cellular and mouse models of CDKL5 deficiency disorder
CDKL5 e InSyn1: analisi dell'innervazione inibitoria nei modelli cellulari e murini del disturbo da deficit di CDKL5
98

Poster n. 98
Zebrafish Cdkl5 mutant model recapitulates key features of CDKL5 Deficiency Disorder
Il modello mutante Cdkl5 nello zebrafish riproduce le caratteristiche chiave del disordine da carenza di CDKL5
98

Poster n. 99
Targeting the gut to improve seizure control in CDD-NUTRIENT
Mirare all'intestino per migliorare il controllo delle crisi nella CDD-NUTRIENT
99

Poster n. 100
GABAA-receptor defects and possible therapeutic targeting in a mouse model of CDKL5 deficiency disorder.
Alterazione funzionale del recettore GABAA in un modello murino del CDKL5 deficiency disorder
100

Poster n. 101
Conventional and non conventional treatment of HCN1 mutations causing Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE)
Terapie convenzionali e non per il trattamento delle mutazioni di HCN1 che inducono encefalopatia epilettica infantile precoce (EIEE)
100

Poster n. 102.
Nanobody-mediated modulation of HCN1 channels in epileptic disorders
Utilizzo di nanobody specifici per la modulazione di canali HCN1 associati ad epilessia
101

Poster n. 103.
Interaction of TBC1D24 with v-ATPase: pathophysiological mechanisms and novel therapeutic targets for rare TBC1D24 diseases
Interazione tra TBC1D24 e v-ATPase: ruolo patofisiologico e bersaglio di nuovi protocolli terapeutici per le patologie rare associate a varianti in TBC1D24.
102

Poster n. 104
Tricking protein translation: a novel base editing strategy for Dravet Syndrome
Ingannando la traduzione: una nuova strategia di base editing per trattare la Sindrome di Drave
102

Poster n. 105
Unravelling the role of protocadherin-19 (PCDH19) in gene expression regulation
Il ruolo della protocaderina-19 (PCDH19) nella regolazione dell'espressione genica
103

Poster n. 106
Investigating the role of parvalbumin positive interneurons in PCDH19-related Developmental and epileptic encephalopathy-9 (DEE9)
Studio del ruolo degli interneuroni parvalbumina-positivi nella patogenesi dell'Epilessia limitata alle femmine associata a disabilità intellettiva indotta da mutazioni a carico del gene PCDH19.
103

Poster n. 107
Towards Small-Molecule Therapies for GLUT1 Deficiency Syndrome: High-Throughput Screening and Biophysical Approaches to Identify GLUT1 Activators
Verso nuove terapie farmacologiche per la Sindrome da Deficit di GLUT1: Screening ad Alto Rendimento e Approcci Biofisici per Identificare Attivatori di GLUT1
104

Poster n. 108
Phenotypic heterogeneity in patients with glucose transporter type 1 deficiency (GLUT1DS).
L'eterogeneità fenotipica nei pazienti affetti da deficit del trasportatore di glucosio tipo 1 (GLUT1DS)
105

Poster n. 109
Neuroinflammation and Microglial Dysfunction in Lafora Disease: Insights from a Zebrafish Model
Neuroinfiammazione e Disfunzione Microgliale nella Malattia di Lafora: Evidenze da un Modello di Zebrafish
105

Poster n. 110
Cure MERRF: from fibroblasts to organoids speeding basic science into clinical trials for mitochondrial diseases
Curare la sindrome MERRF: dai fibroblasti agli organoidi per accelerare dalla scienza di base ai trial clinici nelle malattie mitocondriali
106

Poster n. 111
HDAC inhibitors and a new SLC6A1 knockout zebrafish model: a novel strategy to identify potential therapeutic targets for Myoclonic-Astatic Epilepsy
Inibitori delle Istoni Deacetilasi e un modello sperimentale di zebrafish: verso nuovi bersagli terapeutici per l'Epilessia Mioclonica-Astatica
107

Poster n. 112
Why does impaired protein degradation lead to neuronal hyperexcitability and disturbed cortical functions?
Perchè difetti della degradazione delle proteine porta a iper-eccitabilità neuronale e a difetti cognitivi?
107

Poster n. 113
Neuronal nicotinic receptors containing the β2V287L subunit, linked to autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy (ADSHE), alter neocortex synaptogenesis
I recettori nicotinici neuronali contenenti la subunità β2V287L, associati a epilessia autosomica dominante correlata al sonno con ipermotricità (ADSHE), alterano la sinaptogenesi nella neocorteccia
108

Poster n. 114
Dissecting the molecular function of KLHL17 in the pathophysiology of West Syndrome
Analisi della funzione del gene KLHL17 nella fisiopatologia della sindrome di West
109

Genetic neurological disorder/Ataxias
Disordini genetici neurologici/Atassie

Poster n. 115
Alterations of SACSIN RNA-binding properties are connected to the development of ARSACS.
L'alterata capacità di SACSINA di legare l'RNA è connessa con lo sviluppo dell'ARSACS.
109

Poster n. 116
Investigating the role of neuroinflammation as a central node to drive novel retinal phenotype observed in ARSACS zebrafish model
Studio del ruolo della neuroinfiammazione come nodo centrale per guidare il nuovo fenotipo retinico osservato nel modello di pesce zebra ARSACS
110

Poster n. 117
Hippocalcin-like protein 4 as a potential therapeutic target for CaV2.1 mutations in episodic ataxia type 2 and epileptic encephalopathy 42
La proteina simile all'ippocalcina 4 come potenziale bersaglio terapeutico per le mutazioni di CaV2.1 nell'atassia episodica di tipo 2 e nell'encefalopatia epilettica 42
111

Poster n. 118
Posterior Column Ataxia and Retinitis Pigmentosa: development of an iPSC derived sensory neuron model of the disease
Atassia della Colonna Posteriore e Retinite Pigmentosa: sviluppo di un modello della malattia basato su neuroni sensoriali derivati da iPSC
111

Poster n. 119
Investigating VPS13D-mediated mitochondrial dysfunction in autosomal recessive spinocerebellar ataxia-4 (SCAR4)
Studio delle disfunzioni mitocondriali mediate da VPS13D nella atassia spinocerebellare autosomica recessiva SCAR4
112

Genetic neurological disorder/Hereditary Spastic Paraplegias
Malattie genetiche neurologiche/Paraplegie spastiche ereditarie

Poster n. 120
Development of spastin recovery therapeutic approaches in SPG4-HSP pre-clinical models
Sviluppo di approcci terapeutici per il recupero della spastina in modelli preclinici di SPG4-HSP
113

Poster n. 121
Eye movements and optic nerve markers in Spastic Paraplegia 7 (SPG7)
Studio dei movimenti oculari e del nervo ottico nella paraparesi spastica 7 (SPG7)
113

Poster n. 122
HPDL is critical in human cortical development via regulation of mitochondrial functional properties
Il ruolo fondamentale di HPDL nello sviluppo della corteccia umana attraverso la regolazione delle proprietà funzionali dei mitocondri
114

Poster n. 123
The mitochondrial pore in hereditary spastic paraplegia SPG7: drug repurposing for therapeutic intervention
Il poro mitocondriale nella paraplegia spastica ereditaria SPG7: nuove opportunità terapeutiche attraverso il riposizionamento di farmaci
114

Poster n. 124
STOP-HSP.net: Storing a collection Of Patients with HSP – network
STOP-HSP.net:Il registro Telethon delle Paraparesi Spastiche Ereditarie
115

Genetic neurological disorder/Polyneuropathies
Disordini genetici neurologici/Polineuropatie

Poster n. 125
Pharmacologic activation of the ATF6 branch of the UPR for therapeutic intervention in CMT1B neuropathy
Attivazione farmacologica del ramo di ATF6 della UPR come intervento terapeutico nella neuropatia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 1B
116

Poster n. 126
Boosting HSPB3 to prevent neuromuscular degeneration in peripheral neuropathies
Identificare le funzioni di HSPB3 per prevenire la degenerazione neuromuscolare nelle neuropatie periferiche
116

Poster n. 127
Treating CMT2A: MFN1 Gene Enhancement as a Therapeutic Strategy
Modulazione del gene MFN1 come strategia terapeutica per la CMT2A
117

Poster n. 128
Pharmacological modulation of myelin synthesis and cytoskeletal remodeling as a therapeutic strategy for CMT4B neuropathies with aberrant myelin
Modulazione farmacologica della sintesi di mielina e del citoscheletro cellulare quale strategia terapeutica per la neuropatia di tipo CMT4B caratterizzata da mielina aberrante.
118

Poster n. 129
A novel mouse model for the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease reveals insights into pathogenesis and disease progression.
Un nuovo modello murino della forma X della malattia di Charcot-Marie-Tooth svela aspetti inediti nella patogenesi e progressione della malattia.
118

Genetic neurological disorder/Neuromuscular diseases
Disordini genetici neurologici/Malattie Neuromuscolari

Poster n. 130
Transabdominal ultrasound guided AAV9-GFP delivery in fetal pigs: a translational and minimally invasive model for in utero fetal gene therapy
Iniezione transaddominale eco-guidata di AAV9-GFP in feti di suino: un modello traslazionale e minimamente invasivo per la terapia genica in utero
119

Poster n. 131
Decoding TMEM65 func?on: the pathway to mtDNA Integrity
Decifrando la funzione di TMEM65: la via per l'integrità del mtDNA
120

Poster n. 132
Rna-based combinatorial multi target therapy for the treatment of inherited neuromuscular diseases
Un approccio genetico combinato per trattare le malattie neuromuscolari ereditarie
120

Poster n. 133
Tackling DNA damage and senescence to identify new therapeutic targets for SBMA
Senescenza e danno al DNA come nuovi target in SBMA
121

Poster n. 134
Developing a strategy to target AR coactivators in preclinical models of SBMA
Sviluppo di una strategia per modulare l'attività dei coattivatori del recettore dell'androgeno nei modelli preclinici di SBMA
122

Poster n. 135
Genome editing and rna-based combinatorial multi target therapy for the treatment of inherited neuromuscular diseases: unit kennedy disease
Editing del genoma e terapia multi-target combinatoria basata su rna per il trattamento di malattie neuromuscolari ereditarie: unità malattia kennedy
122

Poster n. 136
rRNA 2'O methylation patterns as novel biomarkers for Spinal Muscular Atrophy
Metilazioni 2'O degli rRNA come nuovi biomarcatori per l'Atrofia Muscolare Spinale.
123

Poster n. 137
Functional characterization of SMN circRNAs in hiPSCs and hiPSCs derived MNs
Caratterizzazione funzionale degli RNA circolari di SMN in hiPSCs e motoneuroni derivanti da hiPSCs
124

Poster n. 138
Miniaturized genome editing tools from the microbiome: unveiling the potential of IscB and TnpB proteins
Strumenti miniaturizzati di editing genomico dal microbioma: svelando il potenziale delle proteine IscB e TnpB
124

Genetic muscular disease/Muscular dystrophies
Malattie genetiche muscolari/Distrofie Muscolari

Poster n. 139
In vivo inhibition of complement C1q in a mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy
Inibizione in vivo del complemento C1q in un modello murino di distrofia muscolare di Duchenne
125

Poster n. 140
Utrophin Overexpression by Precise Base Editing as a Universal Therapeutic Strategy for Duchenne Muscular Dystrophy
Sovraespressione di Utrofina tramite Base Editing Mirato come Strategia Terapeutica Universale per la Distrofia Muscolare di Duchenne
126

Poster n. 141
Investigating the role of PERM1 in transcriptional regulation of oxidative metabolism, in Duchenne Muscular Dystrophy.
Studio sul ruolo della proteina PERM1 nella regolazione trascrizionale del metabolismo ossidativo, nella distrofia muscolare di Duchenne.
126

Poster n. 142
Fear of Falling in muscular dystrophy: investigation of the phenomenon and a multidisciplinary rehabilitation approach to treat it
La paura di cadere nella distrofia muscolare. Indagine del fenomeno e approccio riabilitativo multidisciplinare per il trattamento.
127

Poster n. 143
Characterization of the phenotypic diversity in DupEx2 Duchenne Muscular Dystrophy and identification of predictive/prognostic markers
Caratterizzazione fenotipica di pazienti con distrofia muscolare di Duchenne causata da duplicazione dell'esone 2 ed identificazione di fattori predittivi e prognostici
128

Poster n. 144
Delivery of cytoplasmic Histone Deacetylase 4 to treat Duchenne Muscular Dystrophy
Aumento della produzione dell'istone deacetilasi 4 citoplasmatica per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne
128

Poster n. 145
The Sirtuin 6-Thyroid Hormone cross talk regulates the satellite cells activation in the Duchenne Muscular Dystrophy
Il cross talk Ormone tiroideo-Sirtuina 6 regola l'attivazione delle cellule satelliti nella Distrofia Muscolare di Duchenne
129

Poster n. 146
MLIP dysregulation affects chromatin organization and transcriptional regulation during muscular differentiation.
La disregolazione di MLIP influenza l'organizzazione della cromatina e la regolazione trascrizionale durante la differenziazione muscolare.
130

Poster n. 147
Understanding and treating inflammation in FSHD muscular dystrophy
Comprensione e trattamento dell'infiammazione nella distrofia muscolare FSHD
130

Poster n. 148
Functional characterization of FRG2 gene family in the framework of FHSD
Caratterizzazione funzionale della famiglia genica FRG2 nel contesto della FSHD
131

Poster n. 149
Correcting folding defective α-sarcoglycan to restore myogenic cell function in LGMDR3 diaphragm 3D models
Correggere l'α-sarcoglicano difettivo nel folding per ripristinare la funzionalità di cellule miogeniche in modelli 3D di diaframma di LGMDR3
132

Genetic muscular disease/Myotonic disorders
Malattie genetiche muscolari/Miotonie

Poster n. 150
Locomotor defects in Type 2 Myotonic dystrophy (DM2) are linked to CNBP-dependent increase of autophagic flux
I difetti locomotori nella Distrofia Miotonica di tipo 2 (DM2) sono associati a un aumento del flusso autofagico mediato da CNBP
132

Genetic muscular disease/Myopathies and cardiomyopathies
Malattie genetiche muscolari/Miopatie e Cardiomiopatie

Poster n. 151
Newly generated mouse models of Tubular Aggregate Myopathy (TAM): tools for the investigation of the pathophysiological mechanisms of the disease.
Caratterizzazione di modelli murini di Miopatia da Aggregati Tubulari (TAM): Nuovi modelli per l'indagine dei meccanismi fisiopatologici della malattia.
133

Poster n. 152
Cardioprotective effects of monoamine oxidase inhibitors against Duchenne-associated cardiomyopathy
Effetti cardioprotettivi degli inibitori della monoamino ossidasi nella cardiomiopatia associata alla distrofia muscolare di Duchenne
134

Genetic cardiac disease
Malattie genetiche cardiache

Poster n. 153
IPSC-based cardiac models to investigate the role of MLIP in LMNA-Cardiomyopathy
Modelli cardiaci iPSC-derivati per investigare il ruolo di MLIP nella cardiomiopatia Lamina-dipendente
134

Poster n. 154
Subtype-specific iPSC-derived cardiomyocyte models to unravel distinct cellular and molecular mechanisms of LMNA-cardiomyopathy (ATHENA)
Uso di sottotipi di cardiomiociti derivati da iPSC per svelare i meccanismi cellulari e molecolari della cardiomiopatia associata a LMNA (ATHENA)
135

Poster n. 155
Comparison of knock-in mouse and hiPSC-based models of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy carrying the DSG2 p.Q558* mutation
Studio di nuovi modelli per capire meglio la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro con mutazione nel gene DSG2
136

Poster n. 156
The Role of CaMKII and Calcineurin in Calcium-Driven Arrhythmogenic Remodeling in a Swine Model of Timothy Syndrome
Il Ruolo di CaMKII e Calcineurina nel Rimodellamento Aritmogenico Indotto dal Calcio in un Modello Suino di Sindrome di Timothy
136

Poster n. 157
From genetic defect to cardiac dysfunction: investigating RRAGD cardiomyopathy in vitro
Dal difetto genetico alla disfunzione cardiaca: studio in vitro della cardiomiopatia RRAGD
137

Genetic renal disease
Malattie genetiche renali

Poster n. 158
Modeling Tubulopathy and Cardiomyopathy Syndromes Driven by RRAGD Mutations

Sviluppo del modello murino Rragd knock-in per l'analisi dei meccanismi patologici alla base delle sindromi cardiorenali causate dalle mutazioni in RRAGD.

138

Poster n. 159
Base Editing screen for the identification of mutations disrupting distal appendages functionality
Base Editing screen per l'identificazione di mutazioni impattanti la funzione delle appendici distali

138

Poster n. 160
Targeted thyroid hormone release to treat autosomal dominant polycystic kidney disease
Rilascio mirato dell'ormone tiroideo per la cura della malattia autosomica dominante del rene policistico

139

Poster n. 161
The long tail of a STAR: a matter of cell differentiation impairment and aberrant cytoskeletal dynamics to explain STAR syndrome phenotype
La lunga coda di una stella: una questione di compromissione del differenziamento cellulare e di dinamiche citoscheletriche aberranti per spiegare il fenotipo della sindrome STAR

140

Poster n. 162
Modeling Tuberous Sclerosis Complex in kidney organoids: Uncovering the role of TFEB in pathogenesis and disease progression
Sviluppo di nuovi modelli di organoidi renali per esplorare il ruolo di TFEB nella Sclerosi Tuberosa

140

Poster n. 163
Dietary interventions as a therapeutic strategy in an ER-storage disease of the kidney
Interventi dietetici come possibile strategia terapeutica in una malattia renale da accumulo nel reticolo endoplasmatico

141

Poster n. 164
Role of quality control in the early secretory compartment in Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease
Ruolo del controllo qualità nella via secretoria cellulare nella nefropatia tubulointerstiziale autosomica dominante

142

Genetic hepatic disease
Malattie genetiche epatiche

Poster n. 165
Prion protein promotes copper toxicity in Wilson disease
La proteina prionica promuove la tossicità del rame nella malattia di Wilson.

142

Poster n. 166
Copper-mediated DNA damage influences AAV integration profiles in gene therapy and genome editing for Wilson disease
L'integrazione dei vettori AAV nella terapia genica per la malattia di Wilson è influenzata dal danno al DNA mediato dal rame

143

Poster n. 167
Therapeutic homology-independent targeted integration in retina and liver
Integrazione terapeutica indipendente dall' omologia per la retina e il fegato

144

Genetic eye disease
Malattie genetiche dell'occhio

Poster n. 168
Uncover of molecular mechanism underlying neuroprotective effects of PEDF peptides as therapeutic agents for inherited retinal degeneration
Caratterizzazione dei meccanismi molecolari degli effetti neuroprotettivi di peptidi derivati da PEDF cone agenti terapeutici per degenerazioni retiniche ereditarie

144

Poster n. 169
A membrane-targeted photoswitch restores physiological ON/OFF responses to light in the degenerate retina
Un fotointerruttore mirato alla membrana ripristina le risposte fisiologiche ON/OFF alla luce nella retina degenerata

145

Poster n. 170
Gaining insight into the role of noncoding RNAs in Inherited Retinal Disease by RNA-seq-based approaches
Studio del ruolo di RNA non codificanti nelle patologie retiniche ereditarie mediante approcci di RNA-seq

145

Poster n. 171
Modulating miR-181a/b to Treat Mitochondrial Optic Neuropathies: A Mutation-Independent Strategy
Modulazione di miR-181a/b per il trattamento delle neuropatie ottiche mitocondriali: una strategia indipendente dalla mutazione

146

Poster n. 172
UBIAD1 and Ferroptosis, Exploring a Cure for Schnyder Corneal Dystrophy
UBIAD1 e ferroptosis: alla ricerca di una cura per la distrofia corneale di Scnhyder.

147

Poster n. 173
Towards customized allele-specific CRISPR/Cas gene editing for the treatment of ocular surface disorder in EEC syndrome
Verso un'editing genetico CRISPR/Cas allele-specifico personalizzato per il trattamento dei disturbi della superficie oculare nella sindrome EEC.

148

Poster n. 174
Mutation-independent genome editing approaches for treatment of Stargardt disease
Approcci innovativi dell'editing del genoma per il trattamento della Malattia di Stargardt

148

Genetic gastroenterological disease
Malattie genetiche gastroinstestinali

Poster n. 175
DONOR: MoDeling ChrOnic INtestinal Pseudo-Obstruction with RAD21-dependent Molecular Mechanisms
DONOR: Modeling della pseudo-ostruzione intestinale cronica dovuta ai meccanismi molecolari dipendenti da RAD21
149

Poster n. 176
ER involvement in visceral myopathy onset
Coinvolgimento di ER nell'insrgenza della miopatia viscerale
150

Poster n. 177
Structural Bases of ACTG2-dependent smooth muscle Myopathies - Druggability of ACTG2 filament pocket
Basi strutturali delle miopatie della muscolatura liscia ACTG2-dipendenti - Targettabilità della tasca del filamento ACTG2
150

Genetic respiratory disease
Malattie genetiche respiratorie

Poster n. 178
Targeting IL-17 signalling to modulate inflammation and enhance host defence in cystic fibrosis lung infections
Mirare al segnale IL-17 per modulare l'infiammazione e potenziare la difesa dell'ospite nelle infezioni polmonari da fibrosi cistica.
151

Poster n. 179
Pharmacological correction of the basic defect in cystic fibrosis airway epithelia
Nuove strategie farmacologiche per la correzione del difetto di base in fibrosi cistica
152

Poster n. 180
Rescue of Mutant CFTR Chloride Channels by a Mimetic Peptide Targeting the A-Kinase Anchoring Function of PI3Kγ.
Recupero del canale del cloro CFTR mutato mediante un peptide mimetico mirato alla funzione di ancoraggio della A-chinasi di PI3Kγ.
152

Genetic bone disease
Malattie genetiche dell'osso

Poster n. 181
Single cell transcriptome of spontaneously circulating hematopoietic stem/progenitor cells supports lentiviral mediated gene therapy for TCIRG1-osteopetrosis
Analisi Single cell transcriptomic delle cellule ematopoietche staminali circolanti nel sangue periferico supportano la terapia genica per la cura della osteopetrosi
153

Poster n. 182
Exploring the Role of SPP1 in Macrophage-Osteogenic Cell Crosstalk and its involvement in Heterotopic Ossification in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva
Studio del ruolo di SPP1 nell'ossificazione eterotopica nella Fibrodisplasia Ossificante Progressiva
153

Poster n. 183
Investigating the interplay between ACVR1/ALK2 signalling and autophagy in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP)
Studio dell'interazione tra la via di segnalazione autofagica e del recettore ACVR1/Alk2 nella Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP)
154

Poster n. 184
A new zebrafish mutant to investigate the in vivo function of Suco in skeletal development and osteoblastogenesis
Creazione e caratterizzazione di un nuovo modello zebrafish per lo studio in vivo di Suco nello sviluppo scheletrico e nell'osteoblastogenesi
155

Genetic vascular disease
Malattie genetiche vascolari

Poster n. 185
Characterizing new molecular targets to struggle vessel instability in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia
Caratterizzazione di nuovi bersagli molecolari per contrastare l'instabilità vascolare nella Teleangectasia Emorragica Ereditaria
156

Poster n. 186
BMI1 inhibition reduces lesion burden and blocks disease progression in a chronic mouse model of Cerebral Cavernous Malformation
Inibizione di BMI1 riduce le lesioni e blocca la progressione della malattia in un modello murino cronico di malformazione cavernosa cerebrale
156

Poster n. 187
PLVAP as a novel player for lymphatic malformations in the SOX18-VEGFC regulatory network
PLVAP come nuovo gene implicato in malformazioni linfatiche nell'asse regolativo SOX18/VEGFC
157

Genetic hematologic disease
Malattie genetiche ematologiche

Poster n. 188
Hyperactive erythropoiesis induced by hematopoietic Tfr2 deletion corrects glucose abnormalities in β-thalassemic mice
L'iperattivazione dell'eritropoiesi indotta dalla mancanza di Tfr2 nelle cellule ematopoietche corregge i difetti metabolici di topi β-talassemici
158

Poster n. 189
Optimized transduction of mPB CD34+ cells increases transduction efficiency and VCN while preserving stemness: towards a Phase IIb clinical trial of gene therapy for TDT beta-thalassemia.
Ottimizzazione della trasduzione delle cellule CD34 per aumentare l'efficienza di trasduzione preservandone la staminalità: verso un nuovo trial Fase II di terapia genica per TDT beta-talassemia.
158

Poster n. 190
Drugs Repurposing of Molecules Modulating Human Delta Globin Gene Expression via a Model of Transgenic Fetal Liver Cells: Implications for Beta-Hemoglobinopathy Therapeutics.
Riposizionamento di molecole che modulano l'espressione genica della delta globina umana attraverso un modello di cellule eritroidi transgeniche: Implicazioni per la terapia delle Beta-emoglobinopatie
159

Poster n. 191
Cell-based therapy for Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura
Terapia cellulare per la Porpora Trombotica Trombocitopenica Congenita
160

Poster n. 192
Selective control of DNA damage response at telomeres as an innovative therapeutic approach for Dyskeratosis Congenita
Controllo selettivo della risposta al danno al DNA ai telomeri come approccio terapeutico innovativo per la Discheratosi Congenita
160

Poster n. 193
Dendritic cell pathways in gene therapy efficacy in hemophilia
Verso l'identificazione dei pathway nelle cellule dendritiche condizionano l'efficacia della terapia genica nell'emofilia
161

Poster n. 194
Translational correction approaches targeting nonsense mutations in hemophilia A (TranslEight)
Approcci di correzione di mutazioni nonsenso associate all'emofilia A (TranslEight)
162

Poster n. 195
Embryonic lymphocytes contribute to a genetic form of autoimmune inflammation
Linfociti embrionali contribuiscono ad una forma genetica di autoimmunità
162

Poster n. 196
From Bone Marrow Changes to Breakthrough Gene Therapy: Addressing Adenosine Deaminase 2 Deficiency
Dalle alterazioni del midollo osseo alla terapia genica: il caso del deficit di adenosina deaminasi 2
163

Poster n. 197
Functional Impact of the eIF6 N106S Mutation in Shwachman-Diamond Syndrome: Effects on Protein Synthesis and Ribosome Biogenesis
Impatto funzionale della mutazione eIF6 N106S nella sindrome di Shwachman-Diamond: Effetti sulla sintesi proteica e sulla biogenesi dei ribosomi
164

Poster n. 198
17R-Resolvin D1 protects against sickle cell related inflammatory cardiomyopathy in humanized mice
Il trattamento con 17RVd1 e' protettivo rispetto allo sviluppo della cardiomiopatia relata alla drepanocitosi in modello murino umanizzato
164

Poster n. 199
Nanoengineered 3D culture substrate enables superior long-term and polyclonal engraftment of genetically engineered hematopoietic stem and progenitor cells
Attecchimento policlonale a lungo termine di cellule ematopoietiche staminali geneticamente ingegnerizzate su un substrato 3D
165

Rare blood disorders
Malattie rare del sangue

Poster n. 200
Embryonic hematopoietic stem and progenitor cells show differential susceptibility to leukemic transformation upon acquisition of JMML-associated KrasG12D mutation
Le cellule staminali e progenitrici ematopoietiche embrionali mostrano suscettibilità differenziale a trasformazione leucemica in seguito all'acquisizione della mutazione KrasG12D associata alla JMML
166

Poster n. 201
Unveiling MED12L: A Potential Novel Orchestrator of Platelet Dysfunction in Myeloproliferative Myeloid Neoplasms
Alla scoperta di MED12L: un nuovo protagonista nella disfunzione piastrinica associata alle neoplasie mieloproliferative
166

Genetic systemic or rheumatologic disease
Malattie genetiche sistemiche o reumatologiche

Poster n. 202
Nanobodies as novel tools to target cardiac light chain amyloidosis
Nanobodies come nuovi strumenti per colpire l'amiloidosi da catene leggere
167

Poster n. 203
Rational design of inhibitors of gelsolin amyloid aggregation
Progettazione di inibitori dell'aggregazione amiloide della gelsolina
168

Poster n. 204
Characterization of MIR22HG expression and role in Oligoarticular Juvenile Idiopathic Arthritis patients at disease onset
Caratterizzazione dell'espressione e del ruolo di MIR22HG nei pazienti con Artrite Idiopatica Giovanile Oligoarticolare all'esordio della malattia
168

Poster n. 205
Use of kinase inhibitors to treat interferonopathies
Uso di inibitori di chinasi per il trattamento di interferonopatie
169

Genetic endocrine disease
Malattie genetiche endocrine

Poster n. 206
Brain organoids modelling of hormonal impact on neurodevelopment to unravel the molecular basis of Congenital Adrenal Hyperplasia neuropsychiatric symptoms
Organoidi cerebrali per lo studio dell'impatto ormonale sulle basi molecolari dei sintomi neuropsichiatrici dell'iperplasia surrenalica congenita
170

Poster n. 207
Clinical applications of chromatin conformation capture: 4C-seq/HiC differentiates pathogenic and neutral duplications at the GPR101 locus
Applicazioni cliniche della cattura della conformazione della cromatina: 4C-seq/HiC distingue duplicazioni patogeniche da neutre al locus GPR101
170

Genetic tumor / neoplasia
Tumori / neoplasie genetici

Poster n. 208
Dissecting the role of the V-ATPase in the context of BHD syndrome
Analisi del ruolo della V-ATPasi nel contesto della sindrome di BHD
171

Other rare diseases
Altre malattie rare

Poster n. 209
Molecular interplay between cystic fibrosis and COVID-19 infection
L'interazione molecolare tra fibrosi cistica e infezione da COVID-19
172

Poster n. 210
Compose LI(L)RA1 ballad: enlighten its role in cutaneous lupus erythematosus
La ballata di LI(L)RA1: illuminare il suo ruolo nel lupus eritematoso cutaneo
172

Poster n. 211
Environmental Triggers in Systemic Sclerosis Pathogenesis: Modulation of Epigenetic Markers and the Role of Human Endogenous Retroviruses
Trigger ambientali nella patogenesi della sclerosi sistemica: modulazione di marker epigenetici e ruolo dei retrovirus endogeni umani
173

Undiagnosed diseases with proven genetic origin
Malattie non diagnosticate di provata origine genetica

Poster n. 212
Loss of function of the endoplasmic reticulum membrane protein JKAMP underlies a neurodevelopmental disorder
La perdita di funzione della proteina del reticolo endoplasmatico JKAMP è associata ad un nuovo disordine del neurosviluppo
174

Biobanking and facilities
Biobanche e facilities

Poster n. 213
Human Technopole National Facilities: enhancing your research through advanced bioimage analysis approaches
Human Technopole National Facilities: enhancing your research through advanced bioimage analysis approaches
174

Poster n. 214
TNGB onwards: Two Decades of Advancing Rare Disease Biobanking
TNGB: Due decadi di successi della Rete Telethon di Biobanche Genetiche
175

FONDAZIONE Telethon

INDEX BY PATHOLOGY

14q12 microdeletion syndrome
Poster n. 1 35

22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge)
Poster n. 4 37
Poster n. 3 36
Poster n. 2 35
Poster n. 1 35

Aceruloplasminemia
Poster n. 44 63

Acute myeloid leukemia
Poster n. 200 166

AGel amyloidosis
Poster n. 203 168

Aicardi-Goutières syndrome
Poster n. 58 72

AL amyloidosis
Poster n. 202 167

Allan Herndon Dudley syndrome (MCT8)
Poster n. 69 79

Angelman syndrome
Poster n. 112 107

Poster n. 79 86

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy
Poster n. 155 136

Autosomal dominant optic atrophy
Poster n. 171 146

Autosomal dominant polycystic kidney disease
Poster n. 160 139

Autosomal recessive malignant osteopetrosis
Poster n. 181 153

Autosomal recessive nonsyndromic deafness, Intellectual developmental disorder with autistic features and language delay (with or without seizures), Night blindness (congenital stationary), Meckel syndrome, Deafness (autosomal recessive), Restrictive card
Poster n. 9 40

Autosomal recessive primary microcephaly
Poster n. 59 73

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay
Poster n. 116 110
Poster n. 115 109

Beckwith-Wiedemann syndrome
Poster n. 5 37

Benign familial infantile epilepsy
Poster n. 96 97
Poster n. 76 84

Beta-Thalassemia
Poster n. 190 159
Poster n. 189 158
Poster n. 188 158

Birt-Hogg-Dubé syndrome
Poster n. 208 171

Catel-Manzke syndrome
Poster n. 6 38

CDKL5-related epileptic encephalopathy
Poster n. 100 100
Poster n. 99 99
Poster n. 98 98
Poster n. 97 98

Cerebral cavernous malformation
Poster n. 186 156

Charcot-Marie-Tooth disease type 1X (CMT1X)
Poster n. 129 118

Charcot-Marie-Tooth disease, autosomal dominant
Poster n. 126 116
Poster n. 125 116

Charcot-Marie-Tooth disease, autosomal recessive
Poster n. 128 118
Poster n. 127 117

Childhood absence epilepsy
Poster n. 60 73

Chronic intestinal pseudoobstruction; Familial visceral myopathy
Poster n. 177 150
Poster n. 176 150
Poster n. 175 149

CLCN4-related X-linked intellectual disability syndrome
Poster n. 85 90

CLN13 / Type B Kufs
Poster n. 41 61

CLN5
Poster n. 42 61

CLN8
Poster n. 43 62

COASY protein-associated neurodegeneration
Poster n. 45 63

Congenital adrenal hyperplasia
Poster n. 206 170

Congenital Central Hypoventilation Syndrome
Poster n. 71 81
Poster n. 70 80

Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura
Poster n. 191 160

Cornelia de Lange syndrome
Poster n. 80 87

COVID-19
Poster n. 209 172

Cystic fibrosis
Poster n. 209 172
Poster n. 180 152
Poster n. 179 152
Poster n. 178 151

Developmental and epileptic encephalopathy (DEE)
Poster n. 103 102
Poster n. 102 101
Poster n. 101 100
Poster n. 72 81
Poster n. 61 74

Disorder of urea cycle metabolism and ammonia detoxification
Poster n. 20 47

Dravet syndrome
Poster n. 104 102

Duchenne and Becker muscular dystrophy
Poster n. 143 128
Poster n. 142 127
Poster n. 141 126
Poster n. 140 126
Poster n. 139 125

Duchenne muscular dystrophy
Poster n. 152 134
Poster n. 145. 129
Poster n. 144 128

Dyskeratosis congenita
Poster n. 192 160

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE)
Poster n. 102 101

Poster n. 101 100

Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease
Poster n. 48 65

Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-cleft lip/palate syndrome (EEC syndrome)
Poster n. 173 148

Emery-Dreifuss muscular dystrophy
Poster n. 146 130

Episodic ataxia 2; Epileptic encephalopathy 42
Poster n. 117 111

Essential thrombocythemia
Poster n. 201 166

Fabry disease
Poster n. 30 53

Poster n. 29 52

Facioscapulohumeral dystrophy
Poster n. 148 131

Poster n. 147 130

Familial Alzheimer's disease
Poster n. 49 66

Familial dilated cardiomyopathy with conduction defect due to LMNA mutation
Poster n. 154 135
Poster n. 153 134

Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies
Poster n. 46 64

Familial infantile gigantism
Poster n. 207 170

Familial paroxysmal ataxia
Poster n. 117 111

Poster n. 60 73

Fatal Familial Insomnia
Poster n. 57 71
Poster n. 56 71
Poster n. 55 70

Female restricted epilepsy with intellectual disability
Poster n. 106 103
Poster n. 105 103

Fibrodysplasia ossificans progressiva
Poster n. 183 154
Poster n. 182 153

FOXG1 syndrome
Poster n. 63 75
Poster n. 62 75

Fragile X Syndrome
Poster n. 83 89
Poster n. 82 88
Poster n. 81 87

Gaucher disease
Poster n. 33 55
Poster n. 32 54
Poster n. 31 54

Globoid cell disease (Krabbe disease)
Poster n. 40 60

Glucose transporter type 1 (GLUT1) deficiency syndrome
Poster n. 108 105
Poster n. 107 104

GM1-gangliosidosis
Poster n. 28 52

Hemophilia A
Poster n. 194. 162

Poster n. 193 161

Hepatocerebral form of mtDNA depletion syndrome
Poster n. 24 49

Hereditary hemorrhagic telangiectasia
Poster n. 185 156

Hereditary spastic paraplegia
Poster n. 124 115
Poster n. 123. 114
Poster n. 122 114
Poster n. 121 113
Poster n. 120 113

Huntington disease
Poster n. 54 69
Poster n. 53 69
Poster n. 52. 68
Poster n. 51 67

Poster n. 50 67

Hypomagnesemia 7, Renal, with or Without Dilated Cardiomyopathy (HOMG7)
Poster n. 158 138

Hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia-renal defect syndrome
Poster n. 187 157

Inherited Creutzfeldt-Jakob disease
Poster n. 57 71
Poster n. 56 71

Intellectual developmental disorder, X-linked, OPHN1
Poster n. 113 108
Poster n. 88 92

IRF2BPL-related regressive neurodevelopmental disorder-dystonia-seizures syndrome
Poster n.64 76

Isolated complex III deficiency
Poster n. 25 50

Jamuar Syndrome, UGDH
Poster n. 72 81

Joubert syndrome
Poster n. 9 40
Poster n. 8 39
Poster n. 7 38

Juvenile myelomonocytic leukemia
Poster n. 200 166

Kabuki syndrome
Poster n. 10 40

Lafora disease
Poster n. 109 105

Leber congenital amaurosis
Poster n. 170 145

Leber hereditary optic neuropathy
Poster n. 171 146

Leigh Syndrome
Poster n. 131 120

Poster n. 130 119

Lysinuric Protein Intolerance
Poster n. 21 47

Lysosomal storage disease
Poster n. 167 144
Poster n. 41 61
Poster n. 40 60
Poster n. 34 56
Poster n. 33 55
Poster n. 32 54
Poster n. 31 54
Poster n.30 53
Poster n. 29 52

Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts
Poster n. 47 65

MERRF
Poster n. 110. 106

Microphthalmia-anophthalmia-coloboma
Poster n. 11. 41

Mitochondrial disease
Poster n. 25 50
Poster n. 23 49
Poster n. 22 48

Mitochondrial DNA depletion syndrome
Poster n. 24 49

Mitochondrial DNA depletion syndrome, encephalomyopathic form
Poster n. 131 120

Mucopolysaccharidosis I H (Hurler disease)
Poster n. 36 57

Mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)
Poster n. 35. 57

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome)
Poster n. 39. 59
Poster n. 38 59
Poster n. 37 58
Poster n. 36 57
Poster n. 35 57

Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome
Poster n. 65 77

Multiple congenital anomalies/dysmorphic syndrome-intellectual disability
Poster n. 84 89
Poster n. 12 42

Myeloproliferative neoplasm
Poster n. 201 166

Myoclonic-astastic epilepsy
Poster n. 111 107

Myotonic Dystrophy type 2
Poster n. 150 132

Nasu-Hakola disease
Poster n. 66 78

National Facilities
Poster n. 213 174

Nephronophthisis / Infantile nephronophthisis
Poster n. 159 138

Neuromuscular diseases
Poster n. 132 120

Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL)
Poster n. 112 107
Poster n. 39 59

Neuroocular syndrome
Poster n. 68 79
Poster n. 67 78

Niemann-Pick disease type C
Poster n. 27 51
Poster n. 26 50

Non-specific syndromic intellectual disability
Poster n. 86 91
Poster n. 85 90

Non-syndromic intellectual disability
Poster n. 87. 91
Poster n. 84 89

Novel neurodevelopmental disorder
Poster n. 212 174

Novel neurodevelopmental syndrome
Poster n. 73 82

Oligoarticular juvenile idiopathic arthritis
Poster n. 204 168

Omenn syndrome
Poster n. 195 162

Optic nerve hypoplasia and abnormalities of the Central Nervous System
Poster n. 74 83

Orphan rare neurodevelopmental disease
Poster n. 75 83

Osteogenesis imperfecta
Poster n. 184 155

Pantothenate kinase-associated neurodegeneration
Poster n. 45 63

Paroxysmal kinesigenic dyskinesia
Poster n. 76 84

Phelan-McDermid Syndrome (Monosomy 22q13)
Poster n. 14 43
Poster n. 13 42

Pitt-Hopkins syndrome
Poster n. 15 43

Posterior column ataxia-retinitis pigmentosa syndrome
Poster n. 118 111

Prader-Willi syndrome
Poster n. 77 85

Rare cutaneous lupus erythematosus
Poster n. 210 172

Rare lymphatic system anomaly
Poster n. 187 157

REN-related autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease
Poster n. 164 142

Renal hypomagnesemia-7 with or without dilated cardiomyopathy (HOMG7)
Poster n. 157 137

Retinitis pigmentosa
Poster n. 170 145
Poster n. 169 145
Poster n. 168 144
Poster n. 167 144
Poster n. 159 138

Rett syndrome
Poster n. 93 95
Poster n. 92 95
Poster n. 91 94
Poster n. 90 93
Poster n. 89 92

Sarcoglycanopathy
Poster n. 149 132

Schnyder corneal dystrophy
Poster n. 172 147

Severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency
Poster n. 196 163

Shwachman-Diamond syndrome
Poster n. 197 164

Sickle cell anemia
Poster n. 198 164
Poster n. 190 159

Spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy disease)
Poster n. 135 122
Poster n. 134 122
Poster n. 133 121

Spinal muscular atrophy
Poster n. 138 124
Poster n. 137 124
Poster n. 136 123

Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive
Poster n. 119 112

Stargardt disease
Poster n. 174 148

STING-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI)
Poster n. 205 169

Sturge-Weber syndrome
Poster n. 16 44

Syndactyly-telecanthus-anogenital and renal malformations syndrome
Poster n. 161 140

Systemic sclerosis
Poster n. 211 173

Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB)
Poster n. 214 175

Timothy syndrome
Poster n. 156 136

Tuberous Sclerosis Complex
Poster n. 162 140
Poster n. 78 85

Tubular aggregate myopathy
Poster n. 151 133

UMOD-related autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease
Poster n. 164 142
Poster n. 163 141

Undetermined early-onset epileptic encephalopathy
Poster n. 96 97

West syndrome
Poster n. 114 109

Wilson disease
Poster n. 166 143
Poster n. 165 142

Wiskott-Aldrich syndrome
Poster n. 199 165

Wolfram syndrome
Poster n. 19 46
Poster n. 18 45
Poster n. 17 45

X-linked non-syndromic intellectual disability
Poster n. 95 96
Poster n. 94 96

FONDAZIONE Telethon

INDICE PER PATOLOGIA

Aceruloplasminemia; Deficit ereditario di ceruloplasmina
Poster n. 44 63

AltroCharcot-Marie-Tooth disease type 1X (CMT1X)
Poster n. 129 118

Amaurosi congenita di Leber; LCA
Poster n. 170 145

Amiloidosi AGeI; amiloidosi da gelsomino
Poster n. 203 168

Amiloidosi AL; Amiloidosi a catena leggera; Amiloidosi primitiva
Poster n. 202 167

Anomalie rare del sistema linfatico
Poster n. 187 157

Artrite idiopatica giovanile oligoarticolare
Poster n. 204 168

Atassia del cordone posteriore - retinite pigmentosa; Atassia del cordone posteriore - retinite pigmentosa, autosomica recessiva;PCARP
Poster n. 118 111

Atassia parossistica Familiare; Atassia episodica, tipo 2
Poster n. 117 111
Poster n. 60 73

Atassia spastica autosomica recessiva di Charlevoix-Saguenay ARSACS
Poster n. 116 110
Poster n. 115 109

Atassia spinocerebellare, autosomica recessiva
Poster n. 119 112

Atrofia muscolare spinale e Bulbare; SBMA; Mallattia di Kennedy; BSMA legata allX; Amiotrofia bulbospinale legata all'X; Atrofia muscolare spinale e bulbare legata all'X; Atrofia muscolare bulbo-spinale legata all'X; Atrofia muscolare spinobulbare SMAX1-c
Poster n. 135 122
Poster n. 134 122
Poster n. 133 121

Atrofia muscolare spinale; SMA;
Poster n. 138 124
Poster n. 137 124
Poster n. 136 123

Autosomal recessive nonsyndromic deafness, Intellectual developmental disorder with autistic features and language delay (with or without seizures), Night blindness (congenital stationary), Meckel syndrome, Deafness (autosomal recessive), Restrictive card

Benign familial infantile epilepsy

Beta talassemia
Poster n. 190 159
Poster n. 189 158
Poster n. 188 158

Cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro
Poster n. 155 136

Cardiomiopatia dilatativa familiare con difetto di conduzione da mutazione in LMNA
Poster n. 154 135
Poster n. 153 134

Ceroido Lipofuscinosi Neuronale, 13, tipo Kufs; CLN13
Poster n. 41 61

Ceroido Lipofuscinosi Neuronale, 5; CLN5
Poster n. 42 61

Ceroido Lipofuscinosi Neuronale, 8; CLN8
Poster n. 43 62

Ceroidolipofuscinosi neuronale; NCL
Poster n. 112 107
Poster n. 39 59

COVID-19
Poster n. 209 172

Difetto del metabolismo del ciclo dell'urea e disintossicazione da ammoniaca
Poster n. 20 47

Diftrofia muscolare di Becker e Duchenne; distrofinopatie; DMD e DMB
Poster n. 143 128
Poster n. 142 127
Poster n. 141 126
Poster n. 140 126
Poster n. 139 125

Disabilità intellettiva dello sviluppo, OPHN1
Poster n. 88 92

Disabilità intellettiva legata all'X non sindromica
Poster n. 95 96
Poster n. 94 96

Disabilità intellettiva non sindromica
Poster n. 87 91

Poster n. 84 89

Disabilità intelletttiva aspecifica sindromica
Poster n. 86 91
Poster n. 85 90

Discheratosi Congenita; CD; DKC; Sindrome di Zinsser-Engman-Cole
Poster n. 192 160

Discinesia chinesigenica parossistica; PKD; Coreatetosi chinesigenica parossistica; Discinesia chinesigenica parossistica familiare; PKD familiare
Poster n. 76 84

Distrofia corneale di Schnyder; Distrofia corneale cristallina di Schnyder; Distrofia corneale cristallina; SCCD; SCD
Poster n. 172 147

Distrofia Facio-scapolo-omerale; FSHD; Distrofia FSH; Distrofia muscolare facio-scapolo-omerale; Miopatia facio-scapolo-omerale; Miopatia di Landouzy-Dejerine
Poster n. 148 131
Poster n. 147 130

Distrofia Miotonica di tipo 2
Poster n. 150. 132

Distrofia Muscolare di Duchenne; Distrofinopatia grave, tipo Duchenne; DMD
Poster n. 152 134
Poster n. 145 129
Poster n. 144 128

Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss; EDMD; Emerinopatia
Poster n. 146 130

Drepanocitosi; Anemia a cellule falciformi
Poster n. 198 164
Poster n. 190 159

Early infantile epileptic encephalopathy (EIEE)
Emofilia A; Deficit congenito del fattore VIII; Deficit congenito di F8; Deficit congenito di FVIII
Poster n. 194 162
Poster n. 193 161

Encefalopatia epilettica e dello sviluppo
Poster n. 103 102
Poster n. 102 101
Poster n. 101 100
Poster n. 100 100
Poster n. 99 99
Poster n. 98 98
Poster n. 97 98
Poster n. 72 81
Poster n. 61 74

Encefalopatia familiare con corpi inclusi di neuroserpina; FENIB
Poster n. 46 64

Epilessia autosomica dominante correlata al sonno con ipermotricità (ADSHE)
Poster n. 113 108

Epilessia con assenze dell'infanzia (CAE)
Poster n. 60 73

Epilessia infantile familiare benigna; BFIE; BFIS; Convulsioni infantili familiari Benigne; Crisi infantili famiiari benigne
Poster n. 96 97
Poster n. 76 84

Epilessia limitata alle femmine associata a disabilità intellettiva EFMR;
Poster n. 106. 103
Poster n. 105. 103

Epilessia mioclonica con fibre rosse sfilacciate
Poster n. 110. 106

Epilessia mioclono-astatica;Sindrome di Doose; Epilessia con crisi mioclono-astatiche; Epilessia con crisi mioclono-atoniche; Epilessia mioclonica-astatica della prima infanzia; EMAS, MAE
Poster n. 111 107

Fbrosi Cistica; FC; mucoviscidosi
Poster n. 209 172
Poster n. 180 152
Poster n. 179 152
Poster n. 178 151

Fibrodisplasia Ossificante Progressiva; FOP; Miosite ossificante progressiva; Malattia dell'uomo di pietra
Poster n. 183 154
Poster n. 182 153

Gangliosidosi GM1
Poster n. 28 52

Gigantismo infantile familiare; Acrgigantismo legato all'X; Gigantismo infantile da iperplasia ipofisaria;Gigantismo infantile ereditario; Iperplasia ipofisaria ereditaria; X-LAG
Poster n. 207 170

Immunodeficienza combinata grave da deficit di adenosina deaminasi; SCID; Deficit di ADA; Deficit di adenosina deaminasi
Poster n. 196 163

Insonnia Familiare Fatale; FFI; IFF
Poster n. 57 71
Poster n. 56 71
Poster n. 55 70

Intolleranza alle proteine con lisinuria
Poster n. 21 47

Iperplasia surrenalica congenita;CAH
Poster n. 206 170

Ipoplasia del nervo ottico e anomalie del Sistema Nervoso Centrale
Poster n. 74 83

Leucemia mielomonocitica giovanile; Leucemia mielomonocitica cromica giovanile; JMML
Poster n. 200 166

Leucoencefalopatia megalencefalica con cisti sottocorticali; Sindrome di Van der Knapp; Leucodistrofia megalencefalica; Leucoencefalopatia megalencefalica vacuolizzante con cisti sottocorticali; Megalencefalia - leucodistrofia cistica; MLC
Poster n. 47 65

Lupus eritematoso cutaneo raro; CLE
Poster n. 210 172

Malattia da deficit di CDKL5; CDD; encefalopatia epilettica da deficit di CDKL5; Encefalopatia epilettica e dello sviluppo di tipo 2; DEE2; encefalopatia epilettica infantile precoce di tipo 2; EIEE2
Poster n. 100 100
Poster n. 99 99
Poster n. 98 98
Poster n. 97 98

Malattia del rene policistico, autosomica dominante; ADPKD
Poster n. 160 139

Malattia di Alzheimer familiare
Poster n. 49 66
Poster n. 48 65

Malattia di Alzheimer familiare, autosomica dominante, a esordio precoce; EOFAD; Malattia di Alzheimer familiare; Malattia di Alzheimer familiare, autosomica dominante, a esordio precoce
Poster n. 48 65

Malattia di Charcot-Marie-Tooth autosomica dominante
Poster n. 126 116
Poster n. 125 116

Malattia di Charcot-Marie-Tooth autosomica recessiva; RI-CMT
Poster n. 128 118
Poster n. 127 117

Malattia di Fabry; Deficit di alfa-galattosidasi A; FD; Malattia di Anderson-Fabry ; Angiocheratoma diffuso
Poster n. 30 53
Poster n. 29 52

Malattia di Gaucher; Deficit di acido beta-glucosidasi
Poster n. 33 55
Poster n. 32 54
Poster n. 31 54

Malattia di Huntington; HD; Corea di Huntington
Poster n. 54 69
Poster n. 53 69
Poster n. 52 68
Poster n. 51 67
Poster n. 50 67

Malattia di Krabbe; Leucodistrofia a cellule globoidi; Deficit di GALC; Deficit di galattocerebrosidasi; Deficit di galattosilceramidasi
Poster n. 40 60

Malattia di Lafora; LD; Epilessia mioclonica progressiva, tipo2; EPM2; PME, tipo2
Poster n. 109 105

Malattia di Nasu-Hakola; NHD; Osteodisplasia lipomembranosa policistica con leucoencefalopatia sclerosante; PLOSL; PLO-SL
Poster n. 66 78

Malattia di Niemann-Pick disease tipo C; NP-C
Poster n. 27 51
Poster n. 26 50

Malattia di Stargardt; Stargardt 1; Fundus flavimaculatus
Poster n. 174 148

malattia di Wilson; degenerazione epatolenticolare
Poster n. 166 143
Poster n. 165 142

Malattia ereditaria di Creutzfeldt-Jakob; fCJD; CJD ereditaria
Poster n. 57 71
Poster n. 56 71

Malattia genetica rara orfana del neurosviluppo
Poster n. 75 83

Malattie da accumulo lisosomiale
Poster n. 167 144
Poster n. 41 61
Poster n. 40 60
Poster n. 34 56
Poster n. 33 55
Poster n. 32 54
Poster n. 31 54
Poster n. 30 53
Poster n. 29 52

Malattie mitocondriali
Poster n. 25 50
Poster n. 23 49
Poster n. 22 48

Malattie neuromuscolari
Poster n. 132 120

Malformazione cavernosa cerebrale
Poster n. 186 156

Microcefalia primitiva autosomica recessiva; MPCH; Microcefalia vera
Poster n. 59. 73

Microftalmia, anoftalmia, coloboma; MAC; Microftalmia colobomatosa; Microftalmia con cisti colobomatosa
Poster n. 11 41

Miopatia con aggregati tubulari; TAM
Poster n. 151 133

Miopatia mitocondriale episodica con o senza atrofia ottica e leucoencefalopatia reversibile (MEOAL)
Poster n. 71 81

Mucopolysaccharidosis III A, B, C, and D (Sanfillipo syndrome) National Facility
Poster n. 213 174

Nefronoftisi; NPHP; Nefronoftisi infantile; NPHP infantile autosomica recessiva; Nefronoftisi infantile autosomica recessiva
Poster n. 159 138

Nefropatia tubulo-interstiziale autosomica dominante correlata a UMODADTKD correlata a UMOD; ADTKD-UMOD; MCKD2; Malattia cistica della midollare renale tipo 2; Nefropatia associata all'uromodulina; Nefropatia iperuricemica giovanile familiare tipo 1
Poster n. 164 142
Poster n. 163 141

Neoplasie mieloproliferative
Poster n.201 166

Neurodegenerazione associata a pantotenato chinasi; NBIA1; Neurodegenerazione con deposito cerebrale di ferro, tipo 1; PKAN; Sindrome di Hallervorden-Spatz
Poster n. 45 63

Neuropatia ottica ereditaria di Leber; Atrofia ottica di Leber; LHON
Poster n. 171 146

Nuova sindrome del neurosviluppo
Poster n. 73 82

Nuovo disordine del neurosviluppo
Poster n. 212 174

Osteogenesi imperfetta; OI; Malattie delle osssa fragili; malattia delle ossa di vetro
Poster n. 184 155

Osteopetrosi maligna autosomica recessiva; Osteopetrosi maligna infantile
Poster n. 181 153

Paraplegia spastica ereditaria; HSP; SPG; Paraparesi spastica ereditaria; Paraplegia spastica familiare; Malattia di Strümpell-Lorraine
Poster n. 124 115
Poster n. 123 114
Poster n. 122 114
Poster n. 121 113
Poster n. 120 113

Porpora trombotica trombocitopenica congenita; Deficit congenito di ADAMTS-13; TTP congenita; TTP familiare; Sindrome di Upshaw-Schulman
Poster n. 191 160

Pseudo-ostruzione intestinale cronica; CIPO; POIC; Miopatia Visiscerale familiare; Megadudeno e/o megacisti; Miopatia ereditaria da viscere cave; miopatia familiare da viscere cave
Poster n. 177 150
Poster n. 176 150
Poster n. 175 149

Renal hypomagnesemia-7 with or without dilated cardiomyopathy (HOMG7)
Poster n. 158 138
Poster n. 157 137

Retinite pigmentosa; RP
Poster n. 170 145
Poster n. 169 145
Poster n. 168 144
Poster n. 167 144
Poster n. 159 138

Sarcoglicanopatia; alterazioni qualitative e/o quantitative dei sarcoglicani
Poster n. 149 132

Sclerosi Sistemica; SSc
Poster n. 211 173

sclerosi Tuberosa; Complesso della Sclerosi tuberosa; ST; TSC; Sindrome di Bourneville
Poster n. 162 140
Poster n. 78 85

Sindattilia-telecanto- malformazioni anogenitali e renali; STAR; Sindrome STAR; Sindattilia con malformazioni renali e anogenitali
Poster n. 161 140

Sindrome da anomalie congenite multiple, ipotonia, crisi epilettiche; MCAHS
Poster n. 65 77

Sindrome da deficit di Glut-1; Encefalopatia da deficit di GLUT1; Deficit dei trasportatori del glucosio, tipo 1; Glut1-DS
Poster n. 108 105
Poster n. 107 104

Sindrome da deplezione del DNA mitocondriale, forma miopatica; Sindrome da deplezione del mtDNA, forma miopatica
Poster n. 131 120

Sindrome da deplezione del DNA mitocondriale; Sindrome da deplezioni del mtDNA; MDS;
Poster n. 24 49

Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita
Poster n. 70 80

Sindrome da microdelezione 14q12; Monosomia 14q12
Poster n. 1 35

Sindrome da microdelezione 22q11.2; sindrome di DiGeorge; Monosomia q11.2; Sindrome velo-cardio-facciale
Poster n. 4 37
Poster n. 3 36
Poster n. 2 35
Poster n. 1 35

Sindrome da regressione del neurosviluppo, distonia e crisi epilettiche correlata a IRF2BPL; NEDAMSS
Poster n. 64 76

Sindrome dell'X Fragile; Sindrome di Martin-Bell; FXS; Sindrome FRAXA; Sindrome FraX
Poster n. 83 89
Poster n. 82 88
Poster n. 81 87

Sindrome di Aicardi-Goutières; AGS; Encefalopatia con calcificazione dei gangli basali; Encefalopatia con calcificazione intracranica e linfocitosi cronica del liquido cerebrospinale
Poster n. 58 72

Sindrome di Allan Herndon Dudley (MCT8)
Poster n. 69 79

Sindrome di Angelman; AS
Poster n. 112 107
Poster n. 79 86

Sindrome di Beckwith-Wiedemann;Sindrome di Wiedemann-Beckwith; BWS
Poster n. 5 37

Sindrome di Birt-Hogg-Dubé; BHD; Fibrofolliculoma con tricodiscoma e acrocordoni
Poster n. 208 171

Sindrome di Catel-Manzke; Sequenza di Pierre Robin - iperfalangia - clinodattilia; Sindrome palatodigitale, tipo Catel-Manzke; Sindrome digitale con micrognatia
Poster n. 6 38

Sindrome di Corneia de Lange; CDLS; Sindrome di Brachmann-de Lange
Poster n. 80 87

Sindrome di Dravet; Epilessia mioclonica grave neonatale; Epilessia neonatale grave con crisi miocloniche; SMEI
Poster n. 104 102

Sindrome di Hunter; Mucopolisaccaridosi, tipo 2; Mucopolisaccaridosi, tipo II; MPS2; MPSII
Poster n. 35 57

Sindrome di Jamuar, UGDH
Poster n. 72 81

Sindrome di Joubert; SJ; JS; Disturbo cerebelloparenchimale IV; CPD IV
Poster n. 9 40
Poster n. 8 39
Poster n. 7 38

Sindrome di Leigh; Malattia di Leigh; Encefalomielopatia subacuta necrotizzante
Poster n. 131 120
Poster n. 130 119

Sindrome di Omenn; OS; Immunodeficienza combinata con ipereosinofilia
Poster n. 195 162

Sindrome di Phelan Mc Dermid; Monosomia 22q13; delezione 22q13
Poster n. 14 43
Poster n. 13 42

Sindrome di Pitt-Hopkins; PTHS; encefalopaia epilettica severa con disfunzione autonomica; ritardo mentale sindromico con iperventilazione intermittente
Poster n. 15 43

Sindrome di Prader-Willi; PWS
Poster n. 77 85

Sindrome di Rett; RTT, RTS
Poster n. 93 95
Poster n. 92 95
Poster n. 91 94
Poster n. 90 93
Poster n. 8 92

Sindrome di Sanfillipo; Mucopolisaccaridosi, tipo 3; Mucopolisaccaridosi tipo III; MPS3; MPSIII
Poster n. 39 59
Poster n. 38 59
Poster n. 37 58
Poster n. 36 57
Poster n. 35 57

Sindrome di Shwachman-Diamond; Insufficienza del pancreas e disfunzione del midollo osseo; Sindrome di Shwachman; Sindrome di Shwachman-Bodian-Diamond; SDS
Poster n. 197 164

Sindrome di Sturge-Weber; Sindrome di Sturge-Weber-Krabbe; Angiomatosi di Sturge-Weber-Krabbe; SWS;angiomatosi encefalocele; angiomatosi encefalotrigeminale
Poster n. 16 44

Sindrome di Timothy; TS; LQT8; Sindrome del QT lungo - sindattilia; Sindrome del QT lungo, tipo 8
Poster n. 156 136

sindrome di West; sindrome da spasmi infantili
Poster n. 114 109

sindrome di Wiskott Aldrich; WAS; sindrome eczema-trombocitopenia-immunodeficienza
Poster n. 199 165

Sindrome di Wolfram; WS; Diabete mellito - diabete insipido - atrofia ottica - sordità; Sindrome DIDMOAD
Poster n. 19 46
Poster n. 18 45
Poster n. 17 45

Sindrome EEC; Ectrodattilia - displasia ectodermica - labiopalatoschisi
Poster n. 173 148

Sindrome FOXG1; Encefalopatia epilettica correlata a FOXG1; Encefalopatia epilettica discinetica correlata a FOXG1
Poster n. 63 75
Poster n. 62 75

Sindrome genetica da anomalie/dismorfismi congeniti multipli e disabilità intellettiva; Sindrome genetica da anomalie congenite multiple e disabilità intellettiva con o senza dismorfismi
Poster n. 84 89
Poster n. 12 42

Sindrome Kabuki; KS; Sindrome “Kabuki make-up”; Sindrome di Niikawa-Kuroki
Poster n. 10 40

Sindrome neuro-oculare
Poster n. 68 79
Poster n. 67 78

Teleangectasia emorragica ereditaria; HHT; Malattia di Rendu-Osler; Malattia di Rendu-Osler-Weber
Poster n. 185 156

Telethon Network of Genetic Biobanks (TNGB)
Poster n. 214 175

Vasculopatia associata a STING ad esordio infantile (SAVI)
Poster n. 205 169

FONDAZIONE Telethon

INDICE PER AUTORI
INDEX BY AUTHOR

POSTER	AUTORE	PAGINA
16	Abdolrahimzadeh Solmaz	44
44	Alessio Massimo	63
91	Antonucci Flavia	94
167	Auricchio Alberto	144
200	Azzoni Emanuele	166
83	Bagni Claudia	89
2	Baldini Antonio	35
158	Ballabio Andrea	138
170	Banfi Sandro	145
96	Baralle Marco	97
97	Barbiero Isabella	98
105	Bassani Silvia	103
134	Basso Manuela	122
92	Battaglioli Elena	95
113	Becchetti Andrea	108
157	Bellin Milena	137
187	Beltrame Monica	157
169	Benfenati Fabio	145
1,3	Bezzi Paola	35,36
54	Biagioli Marta	69
56	Biasini Emiliano	71
197	Biffo Stefano	164
139	Biressi Stefano	125
59	Boda Enrica	73
128	Bolino Alessandra	118
129	Bortolozzi Mario	118
204	Bosco Maria Carla	168
72	Bottani Emanuela	81
194	Branchini Alessio	162
23	Briani Federica	49
17,68	Broccoli Vania	45,79
182	Brunelli Silvia	153
130	Brunetti Dario	119
20	Brunetti-Pierri Nicola	47
155	Calore Martina	136
81	Cancedda Laura	87
150	Canettieri Gianluca	132
35	Canton Marcella	57
206	Caporale Nicolò	170
110	Carelli Valerio	106
141	Caretti Giuseppina	126
12	Cariboni Anna Maria	42
126	Carra Serena	116
27	Carrer Alessandro	51
123	Casari Giorgio Nevio	114
52	Cattaneo Elena	68
138, 213	Cereseto Anna	124, 174
140	Chemello Francesco	126
118	Chiabrando Deborah	111
19	Chimienti Raniero	46
60,117	Cingolani Lorenzo	73,111
31,32	Clemente Francesca	54
185	Climent Salarich Montserrat	156
104	Colasante Gaia	102
76	Corradi Anna Margherita	84
209	Cortese Mirko	172
127	Corti Stefania	117
71	Costantini Paola	81
87	D'Adamo Patrizia	91
192	D'Adda di Fagagna Fabrizio	160
125	D'Antonio Maurizio	116
84	De Curtis Ivan	89
198	De Franceschi Lucia	164
175	De Giorgio Roberto	149
37,38	De Leonibus Elvira	58,59
173	De Luca Michele	148
177,203	De Rosa Matteo	150,168
89	Della Ragione Floriana	92
109	Della Vecchia Stefania	105
145	Dentice Monica	129
208	Di Malta Chiara	171
199	Di Micco Raffaella	165
153,154	Di Pasquale Elisa	134,135
195	Ditadi Andrea	162
82	Elvassore Nicola	88
98	Facchinello Nicola	98
193	Fallarino Francesca	161
103	Fassio Anna	102
159	Fava Luca	138
189	Ferrari Giuliana	158
211	Ferrari Luca	173
201	Ficara Francesca	166
65	Finazzi Dario	77
64	Fiumara Ferdinando	76
184	Forlino Antonella	155
55	Forloni Gianluigi	70
70	Fornasari Diego Maria Michele	80
79,114	Fossati Matteo	86,109
36	Fraldi Alessandro	57
47	Frigeri Antonio	65
147	Gabellini Davide	130
179	Galietta Luis Juan Vicente	152
78	Galli Rossella	85
210	Geginat Jens	172
180	Ghigo Alessandra	152
115	Giambruno Roberto	109
34	Gregori Silvia	56
40	Gritti Angela	60
8	Guardavaccaro Daniele	39
171	Indrieri Alessia	146
58	Kajaste-Rudnitski Anna Christina	72
152	Kaludercic Nina	134
100	Kilstrup-Nielsen Charlotte	100
93	Landsberger Nicoletta	95
146	Lanzuolo Chiara	130
61	Lauri Antonella	74
119	Leonzino Marianna	112
45	Levi Sonia	63
88	Lodovichi Claudia	92
107,108	Lolicato Marco Gaetano	104,105
178	Lorè Nicola	151
50	Maglione Vittorio	67
62,63	Mallamaci Antonello	75,75
90	Mannironi Cecilia	93
42,43	Marchese Maria	61,62
168	Marigo Valeria	144
48	Mariotti Letizia	65
80	Massa Valentina	87
66	Matteoli Michela	78
156	Mazzanti Andrea	136
39	Medina Diego	59
11	Mercurio Sara	41
95	Merlo Giorgio	96
46	Miranda Banos Maria Elena	64
144	Moresi Viviana	128
101,102	Moroni Anna	100,101
196	Mortellaro Alessandra	163
30	Muro Andrés	53
116	Naef Valentina	110
188	Nai Antonella	158
74	Nicolis Silvia Kirsten	83
212	Nigro Vincenzo	174
15,75	Ori Michela	43,83
205	Ostuni Renato	169
186	Pagani Massimiliano	156
18	Pallotta Maria Teresa	45
26	Pallottini Valentina	50
4	Papaleo Francesco	37

POSTER	AUTORE	PAGINA
94,106	Passafaro Maria	96,103
133,135	Pennuto Maria	121,122
67	Perini Giovanni	78
166	Piccolo Pasquale	143
33	Plotegher Nicoletta	55
28	Poletti Valentina	52
165	Polishchuk Roman	142
21	Prencipe Giusi	47
143	Previtali Stefano	128
161	Proietti de Santis Luca	140
151	Protasi Feliciano	133
85	Pusch Michael	90
163,164	Rampoldi Luca	141,142
112	Ratto Gian Michele	107
202	Ricagno Stefano	167
5	Riccio Andrea	37
120	Rinaldo Cinzia	113
190	Ristaldi Maria	159
9	Roversi Pietro	40
121	Rufa Alessandra	113
13	Sacchetti Benedetto	42
29	Sacerdote Paola	52
86	Sala Carlo	91
69,149	Sandonà Dorianna	79,132
132	Sandri Marco	120
214	Sangiorgi Luca	175
122,124	Santorelli Filippo Maria	114,115
172	Santoro Massimo	147
137	Sette Claudio	124
131	Soriano Maria Eugenia	120
183	Stagni Venturina	154
162	Staiano Leopoldo	140
22,25	Szabo Ildiko	48,50
191	Tomasoni Susanna	160
6	Tonetti Michela	38
174	Trapani Ivana	148
207	Trivellin Giampaolo	170
77	Tucci Valter	85
148	Tupler Rossella Ginevra	131
41	Vaccari Thomas	61
7,73	Valente Enza Maria	38,82
51	Valenza Marta	67
142	Varalta Valentina	127
14	Verpelli Chiara	43
111	Vettori Andrea	107
136	Viero Gabriella	123
99	Vignoli Aglaia	99
181	Villa Anna	153
176	Viti Federica	150
160	Xinaris Christodoulos	139
24	Zeviani Massimo	49
10	Zippo Alessio	40
49	Zonta Micaela	66
53	Zuccato Chiara	69
57	Zucchelli Chiara	71

Fondazione Telethon ETS
C.F. 04879781005

Via Varese 16b - 00185 Roma
Tel. +39 06 440151 - Fax. +39 06 44 015521

Via Poerio 14 - 20129 Milano
Tel. +39 02 2022171 - Fax. +39 06 44015600

ETS det. Reg. Lazio N. G03816 del 30 marzo 2022 repertorio RUNTS n. 1217

www.fondazionetelethon.it