

Alla Cortese Attenzione:
Associazione Alessandra Proietti OdV

Oggetto:

PROGETTO 2023-2024

TITOLO: “Miglioramento del fenotipo muscolare nella Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss mediante correzione genica”. Durata: 24 mesi. Fine progetto: 31 dicembre 2024.

RELAZIONE ATTIVITA' SVOLTA fino al 31 agosto 2024.

Il progetto è stato realizzato presso l'Istituto di Genetica Molecolare “Luigi Luca Cavalli-Sforza” sede secondaria di Bologna sotto il coordinamento della Dr.ssa Giovanna Lattanzi.

Alla data del 31 agosto 2024 sono state svolte **le seguenti attività di ricerca:**

- 1) **Screening in silico di mutazioni *LMNA* e *EMD*** patogenetiche sulla base delle informazioni iniziali fornite dal database UMD-LMNA e UMD-EMD allo scopo di identificare le mutazioni correggibili con CRISPR/Cas (in collaborazione con l'Università di Modena e Reggio Emilia, attività coordinata dalla Dr.ssa Alessandra Recchia).

RISULTATI: Tutte le mutazioni oggetto dello screening sono risultate correggibili mediante la tecnologia considerata.

- 2) **Analisi delle proteine SUN1 e pericentrina** nei mioblasti EDMD1 sottoposti a correzione genica mediante CRISPR/Cas al fine di confermare l'efficacia della procedura nel muscolo.

RISULTATI: Sia la proteina SUN1 dell'involucro nucleare, sia la proteina pericentrina, presente nei centrosomi e reclutata nell'involucro nucleare durante la

CNR - Istituto di Genetica Molecolare
Luigi Luca Cavalli-Sforza

Sede Secondaria di Bologna

Via Di Barbiano, 1/10 – 40136 Bologna

Tel: 051 6366857 – Fax: 051 4689922

E-mail: segreteriaibologna@igm.cnr.it

formazione della fibra muscolare, mostrano una localizzazione alterata nelle cellule muscolari EDMD2 ed EDMD1. La correzione della mutazione in lamina A/C (EDMD2) o in emerina (EDMD1) ripristina nelle cellule muscolari differenziate la localizzazione delle due proteine.

- 3) **Analisi funzionale in cellule con mutazione *LMNA*** già sottoposte a correzione genica. L'analisi è tuttora in corso. Abbiamo finora identificato un buon marcatore di funzionalità nel recettore dei mineralocorticoidi (MR), il cui reclutamento nel nucleo in seguito a stimoli specifici risulta alterato nelle cellule EDMD2.
- 4) **Correzione del gene *EMD*** mutato in una nuova linea primaria di cellule EDMD1. In questo caso in collaborazione con l'Università di Modena e Reggio Emilia, sono stati sottoposti a correzione genica mediante CRISPR/Cas i fibroblasti, i mioblasti e i tenociti (cellule del tendine di Achille) da paziente EDMD1. L'emerina, assente nelle cellule dei pazienti EDMD1, è stata ripristinata nel 60-80% delle cellule sottoposte a correzione genica. Questo risultato è molto importante perché anche livelli bassi di emerina sono sufficienti a ripristinare la funzione della proteina.
- 5) **Analisi del profilo di espressione di microRNA in cellule sottoposte a correzione genica.** Abbiamo verificato che l'intero profilo di espressione di molecole regolatrici note come microRNA o miRNA è alterato nelle cellule EDMD1. In fibroblasti sottoposti a correzione genica, il 90% dei miRNA alterati torna a livelli di espressione comparabili alle cellule da pazienti sani. Inoltre, quattro miRNA specifici delle fibre muscolari e alterati nelle distrofie muscolari, sono risultati alterati anche in cellule EDMD1 ed EDMD2. Anche in questo caso, in cellule muscolari EDMD1 abbiamo potuto verificare il ripristino dell'espressione corretta dei miRNA muscolo-specifici conosciuti come Myo-miR.

CONCLUSIONI: il progetto ci ha consentito di identificare alcuni biomarcatori della distrofia muscolare EDMD2 e della distrofia muscolare EDMD1. In particolare, le proteine SUN1 e

CNR - Istituto di Genetica Molecolare
Luigi Luca Cavalli-Sforza

Sede Secondaria di Bologna

Via Di Barbiano, 1/10 – 40136 Bologna

Tel: 051 6366857 – Fax: 051 4689922

E-mail: segreteriaabologna@igm.cnr.it

pericentrina misurate in miotubi in coltura, il recettore di mineralocorticoidi, i microRNA muscolo-specifici misurati in mioblasti in coltura, il profilo di microRNA in fibroblasti in coltura, rappresentano ottimi marcatori della patologia a livello cellulare. **Abbiamo potuto verificare che la correzione genica ripristina tutte le molecole alterate e i profili di espressione**, ristabilendo, limitatamente ai marcatori identificati, una condizione non patologica. Abbiamo utilizzato la **tecnologia CRISPR/Cas per produrre linee cellulari isogeniche**, in pratica cellule derivate da pazienti in cui l'unica modificazione consisteva nell'eliminazione della mutazione patogenetica. Tutte le linee ottenute saranno conservate nella biobanca BioLaM e utilizzate per studi funzionali allo scopo di chiarire i meccanismi patogenetici della EDMD2 e della EDMD1, inclusi processi legati al differenziamento muscolare e alla risposta allo stress meccanico. I risultati ottenuti in questo campo, indicano che **le cellule di EDMD2 rispondono in maniera errata agli stimoli di stiramento** del muscolo. Questa condizione può indicare che farmaci in grado di ripristinare la risposta corretta ai segnali meccanici possono aiutare a migliorare la patologia EDMD2.

I risultati qui descritti sono in corso di pubblicazione in due articoli scientifici.

Tabella 1. Mutazioni EDMD2 ed EDMD1 corrette in collaborazione con la Prof. Alessandra Recchia, Università di Modena e Reggio Emilia.

Mutations in LMNA gene						
Gene	Mutation	chromosome	Exon/ Intron	Variant	Genotype	Phenotype
LMNA	c.1580 G>C	Chr.1	Exon 9	p.R527P	Dominant Heterozygous	EDMD2
LMNA	c.103_104 insCTG	Chr.1	Exon 1	p.L35PinsV	Dominant Heterozygous	EDMD2
Mutation in EMD gene						
Gene	Mutation	Chromosome	Exon/Intron	Genotype	Phenotype	
EMD	c.1A>G	Chr. X	Exon 1	Recessive mutation	EDMD1	

CNR – Istituto di Genetica Molecolare
Luigi Luca Cavalli-Sforza

Sede Secondaria di Bologna

Via Di Barbiano, 1/10 – 40136 Bologna

Tel: 051 6366857 – Fax: 051 4689922

E-mail: segreteriaibologna@igm.cnr.it



Bologna, 04-09-2024

In fede

Dr. Giovanna Lattanzi

Coordinatrice del Progetto

CNR - Istituto di Genetica Molecolare
Luigi Luca Cavalli-Sforza

Sede Secondaria di Bologna

Via Di Barbiano, 1/10 – 40136 Bologna

Tel: 051 6366857 – Fax: 051 4689922

E-mail: segreteriaabologna@igm.cnr.it

**CNR – Istituto di Genetica Molecolare
Luigi Luca Cavalli-Sforza**

Sede Secondaria di Bologna

Via Di Barbiano, 1/10 – 40136 Bologna

Tel: 051 6366857 – Fax: 051 4689922

E-mail: segreteriabologna@igm.cnr.it