

## **Le molecole profibrotiche sono ridotte nei fibroblasti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss modificati con CRISPR**

Eleonora Cattin<sup>1,2,†</sup>, Elisa Schena<sup>3,4,†</sup>, Elisabetta Mattioli<sup>3,4</sup>, Stefania Marcuzzo<sup>5</sup>, Silvia Bonanno<sup>5</sup>, Paola Cavalcante<sup>5</sup>, Federico Corradi<sup>1,2</sup>, Daniela Benati<sup>1,2</sup>, Giorgia Farinazzo<sup>5</sup>, Marco Cattaneo<sup>6,7</sup>, Veronica De Sanctis<sup>8</sup>, Roberto Bertorelli<sup>8</sup>, Lorenzo Maggi<sup>5</sup>, Melania Giannotta<sup>9</sup>, Antonella Pini<sup>9</sup>, Gaetano Vattermi<sup>10</sup>, Denise Cassandrini<sup>10,11</sup>, Marco Cavallo<sup>12</sup>, Cristina Manferdini<sup>13</sup>, Gina Lisignoli<sup>13</sup>, Beatrice Fontana<sup>14</sup>, Ilaria Pace<sup>14</sup>, Claudio Bruno<sup>15,16</sup>, Roberta Roncarati<sup>3,4</sup>, Chiara Fiorillo<sup>15,17</sup>, Manuela Ferracin<sup>14</sup>, Eric C. Schirmer<sup>18</sup>, Alessandra Recchia<sup>1,2,\*</sup>, Giovanna Lattanzi<sup>3,4,\*</sup>

**1** Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, 41121 Modena, Italia; eleonora.cattin@unimore.it (E.C.); federico.corradi@unimore.it (F.C.); daniela.benati@unimore.it (D.B.)

**2** Centro di Medicina Rigenerativa, Università di Modena e Reggio Emilia "Stefano Ferrari", 41121 Modena, Italia

**3** Istituto di Genetica Molecolare del CNR "Luigi Luca Cavalli-Sforza", Unità di Bologna, 40136 Bologna, Italia; elisa.schena@cnr.it (E.S.); e.mattioli@area.bo.cnr.it (E.M.); roberta.roncarati@cnr.it (R.R.)

**4** IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, 40136 Bologna, Italia

**5** Neurologia 4—Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, 20133 Milano, Italia; stefania.marcuzzo@istituto-besta.it (S.M.); silvia.bonanno@istituto-besta.it (S.B.); paola.cavalcante@istituto-besta.it (P.C.); giorgia.farinazzo@istituto-besta.it (G.F.); lorenzo.maggi@istituto-besta.it (L.M.)

**6** Neurologia III—Unità di Neuroalgologia, IRCCS Istituto Neurologico "C.Besta", 20133 Milano, Italia; marco.cattaneo@istituto-besta.it

**7** Dottorato di Ricerca in Scienze Farmacologiche Biomolecolari, Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano, Italia

**8** Dipartimento di Biomedicina Cellulare, Computazionale e Integrata - CIBIO LaBSSAH, Università degli Studi di Trento, 38122 Trento, Italia; veronica.desanctis@unitn.it (V.D.S.); roberto.bertorelli@unitn.it (R.B.)

**9** IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, 40124 Bologna, Italia; melania.giannotta@isnb.it (M.G.); antonella.pini@isnb.it (A.P.)

**10** Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Scienze Motorie, Università degli Studi di Verona, 37124 Verona, Italia; gaetano.vattermi@univr.it (G.V.); denisealessandra.cassandrini@aovr.veneto.it (D.C.)

**11** Unità di Immunologia, Ospedale Universitario, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, 37126 Verona, Italia

**12** Dipartimento di Chirurgia della Spalla e del Gomito, IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, 40136 Bologna, Italia; marco.cavallo@ior.it

**13** IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Laboratorio di Immunoreumatologia e Rigenerazione Tissutale, 40136 Bologna, Italia; cristina.manferdini@ior.it (C.M.); gina.lisignoli@ior.it (G.L.)

**14** Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Università di Bologna, 40126 Bologna, Italia; beatrice.fontana10@unibo.it (B.F.); ilaria.pace@unibo.it (I.P.); manuela.ferracin@unibo.it (M.F.)

**15** Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica, Salute Materno-Infantile (DINOEMI), Università di Genova, 16132 Genova, Italia; claudio.bruno@unige.it (C.B.); chiara.fiorillo@unige.it (C.F.)

**16** Centro di Miologia Traslazionale e Sperimentale, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italia

**17** Unità di Neuropsichiatria Infantile, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16148 Genova, Italia

**18** Istituto di Biologia Cellulare, Università di Edimburgo, Edimburgo EH9 3BF, Regno Unito; e.schirmer@ed.ac.uk

\* Corrispondenza: arecchia@unimore.it (A.R.); giovanna.lattanzi@cnr.it (G.L.)

† Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.

## Abstract

La distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD) è causata da mutazioni nei geni *EMD*, *LMNA*, *SYNE1*, *SYNE2* e altri correlati. La malattia è caratterizzata da contratture articolari, indebolimento e degenerazione muscolare e difetti di conduzione cardiaca associati a cardiomiopatia dilatativa. Studi precedenti hanno dimostrato l'attivazione di molecole fibrogeniche come TGFβ2 e CTGF in modelli preclinici di EDMD2 e un aumento della secrezione di TGFβ2 nel siero dei pazienti. Un ampio screening delle cellule dei pazienti ha suggerito che siano le vie maggiormente interessate in diverse forme di EDMD siano quelle della fibrosi, del metabolismo e della segnalazione miogenica. In questo studio, mostriamo che i miofibroblasti alfa-muscolo liscio-actina positivi sono sovrarappresentati nelle colture di fibroblasti di pazienti portatori di mutazioni di *EMD*, *LMNA* o *SYNE2*, e che il miRNA-21 profibrotico risulta sovraregolato. Dopo la correzione con CRISPR/Cas delle sequenze mutate di *EMD* o *LMNA* nei fibroblasti EDMD1 o EDMD2, rispettivamente, osserviamo una ridotta espressione delle molecole fibrogeniche. Tuttavia, nei mioblasti dei pazienti, né le proteine fibrogeniche né il miRNA-21 risultavano sovraregolati; invece, il miRNA-21-5p risultava sottoregolato, insieme ai miRNA muscolo-specifici, miRNA-133b e *a*/ miRNA-206, che svolgono un ruolo cruciale nell'omeostasi delle cellule muscolari. Queste osservazioni suggeriscono che la conversione dei fibroblasti laminopatici in un fenotipo profibrotico sia un fattore determinante della fibrosi muscolare associata a EDMD, mentre i difetti dei mioblasti laminopatici dipendenti da miRNA-206, inclusa l'alterata regolazione dei livelli di VEGF, contribuiscono al deterioramento delle cellule muscolari. In particolare, il nostro studio fornisce una prova di principio per l'applicazione della correzione genica in EDMD1 ed EDMD2 e presenta cellule isogeniche EDMD1 che mostrano un recupero quasi completo dell'espressione dei miRNA specifici per la malattia. Queste cellule possono essere utilizzate come modelli sperimentali per lo studio delle laminopatie muscolari.

PAROLE CHIAVE: EDMD; emerina; laminopatie; fibrosi; CRISPR/Cas gene editing; miRNA profiling

## Introduzione

Sono stati identificati diversi tipi di distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD) [1]. EDMD2, la forma più rappresentata di EDMD, è causata da mutazioni del gene *LMNA* [2], EDMD1 è legata al gene *EMD* che codifica per la proteina della membrana nucleare interna emerina [3], mentre EDMD4 e EDMD5 sono associate a mutazioni nei geni *SYNE1* o *SYNE2* che codificano, rispettivamente, per la nesprina 1 o 2 [4]. Altre forme di EDMD sono legate a mutazioni dei geni *FHL1* e *TMEM43*, mentre malattie simili sono dovute a varianti dei geni *SUN1* o *SUN2* [5–7]. EDMD è caratterizzata da contratture al tendine d'Achille, ai gomiti e al collo, da progressivo deperimento dei muscoli scheletrici associato a sintomi cardiaci come fibrillazione atriale, aritmie ventricolari letali e insufficienza cardiaca [1,8]. I trattamenti sintomatici attenuano le complicanze ortopediche e cardiache, ma non è disponibile una cura per queste patologie [1,8]. La patogenesi di EDMD non è completamente chiarita. L'imaging in vivo mostra aree fibrotiche nel miocardio e nei muscoli scheletrici nelle fasi precoci della malattia, mentre un ampio screening di sieri di pazienti affetti da laminopatie muscolari legate a *LMNA* ha mostrato un aumento di interleuchina 17 e TGFβ2 [9]. Inoltre, nei modelli preclinici [9,10] è stato riscontrato l'aumento della regolazione di molecole profibrotiche tra cui TGFβ2, fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e di altri fattori scatenanti che inducono la conversione fibrotica cellulare. D'altro canto, nei mioblasti EDMD2, è stata dimostrata la disregolazione delle vie di segnalazione meccanica dovuta all'interazione alterata delle proteine mutate con *SUN1* e *SUN2* o altri componenti della piattaforma LINC che regolano la meccanobiologia nucleare [11–14].

Molti microRNA sono stati associati a distrofie muscolari, comprese quelle correlate alle proteine dell'involucro nucleare [15–17]. Uno studio recente ha dimostrato che miR-21 contribuisce all'atrofia muscolare scheletrica e alla fibrosi in modo dipendente da TGFβ [18]. In questo studio, mostriamo una sovraregolazione del miR-21-5p profibrotico e un aumento della secrezione di TGFβ2 associati a livelli elevati di actina alfa del muscolo liscio (α-SMA) in colture di fibroblasti dermici EDMD1, EDMD2 ed EDMD5. Per supportare la specificità di questa condizione, abbiamo prodotto cellule isogeniche da fibroblasti mutanti EDMD1 e abbiamo inattivato permanentemente l'allele mutato nei fibroblasti EDMD2 mediante il sistema CRISPR/Cas. Nei fibroblasti EDMD1 ed EDMD2 geneticamente modificati, la condizione fisiologica è stata ripristinata e i livelli di miR-21-5p normalizzati. D'altra parte, sono state osservate caratteristiche molecolari diverse nei mioblasti EDMD1 ed EDMD2, dove miR-21-5p è stato sottoregolato insieme a miRNA muscolo-specifici, miR-133b e miR-206, cruciali nell'omeostasi muscolare in quanto contribuiscono alla sottoregolazione dei geni che inducono atrofia muscolare [19]. Questi risultati suggeriscono che i fibroblasti, ma non i mioblasti, contribuiscono alla fibrosi tissutale nell'ambito della patogenesi EDMD, mentre i difetti intrinseci cellulari nella meccanosegnalazione [12,13,20] e l'espressione alterata di miR-133b e miR-206 [21,22], contribuiscono al deterioramento delle fibre muscolari.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Coltura cellulare

Le colture di fibroblasti umani sono state ottenute da biopsie cutanee di pazienti EDMD con mutazioni nei geni *EMD* (EDMD1), *LMNA* (EDMD2) e *SYNE2* (EDMD5) e da donatori sani abbinati per età (controlli). Le colture di mioblasti umani sono state ottenute da biopsie muscolari effettuate sui due pazienti affetti da EDMD1, denominati EDMD1 #1 e EDMD1 #4. Le colture cellulari EDMD e di controllo provenivano dalla biobanca BioLaM approvata dal "Comitato Etico IOR" il 5 settembre 2016. Prot. gen 0018250-01-13. Sono state rispettate tutte le norme etiche UE e locali. Una descrizione dettagliata di ciascuna coltura cellulare utilizzata in questo studio è riportata nella Tabella S1. L'elenco dei campioni sottoposti a editing genetico e delle sequenze mutate è riportato nella Tabella 1.

**Tabella 1.** Elenco delle mutazioni corrette in questo studio. Sono riportati la posizione sul cromosoma, il gene, il numero di esoni, le mutazioni, la malattia e il tipo di cellula.

| Cromosoma | Gene        | Esone/Introne | Mutazione (gene) | Mutazione (proteina) | Malattia | Tipo cellulare                   |
|-----------|-------------|---------------|------------------|----------------------|----------|----------------------------------|
| X         | <i>EMD</i>  | Esone 1       | c.1A>G           | p.0                  | EDMD1    | Fibroblasti dermici<br>Mioblasti |
| X         | <i>EMD</i>  | Esone 6       | c.650_654dup     | p.Gln219TrpfsX20     | EDMD1    | Mioblasti                        |
| 1         | <i>LMNA</i> | Esone 1       | c.103_104insCTG  | p.L35PinsV           | EDMD2    | Fibroblasti dermici              |

Le cellule seminate a densità di 10.000/cm<sup>2</sup> sono state coltivate fino a confluenza in terreno di coltura DMEM integrato con siero bovino fetale (FBS) al 20% (Gibco LifeTechnology, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e soluzione antibiotica/antimicotica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le colture di mioblasti sono state selezionate in base alla positività per desmina (almeno il 70% di cellule positive). In un sottoinsieme di colture di mioblasti, il terreno di coltura è stato sostituito alla confluenza e le cellule sono state lasciate differenziare in miotubi per 10 giorni. I mioblasti e i miotubi in fase di differenziazione sono stati riconosciuti dalla positività alla caveolina 3. Sono state contate come miotubi le cellule con positività alla caveolina 3 e almeno due nuclei. Le colture confluenti di fibroblasti o mioblasti sono state lasciate nel terreno di coltura appena sostituito per 3 giorni. Successivamente, il terreno di coltura di ciascun campione è stato raccolto, centrifugato e conservato a -20 °C fino all'esecuzione del test ELISA. Le colture di fibroblasti confluenti sono state lasciate in un terreno di coltura appena sostituito per 3 giorni e poi raccolte per l'analisi del miRNoma (vedi sotto). Le cellule HEK293T sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC #CRL-3216) e sono state coltivate in terreno di coltura DMEM integrato con il 10% di siero fetale bovino (FCS), 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomycin (Lonza Ltd., Basilea, Svizzera).

### 2.2. Trasduzione di fibroblasti e mioblasti mediante vettore lentivirale per l'editing di EMD

Il gRNA Lenti-hye-A3A-BE4max per correggere la mutazione *EMD* trasmessa da EDMD1 #1 è stato generato dal plasmide lenti-117G-hye-A3A BE4max (#157946; Addgene) digerito con enzimi PacI e NheI (NEB, Ipswich, Massachusetts, USA) e autolegato per rimuovere il 117gRNA. Successivamente, lo scheletro è stato linearizzato con XhoI e la cassetta di espressione gRNA *EMD* è stata subclonata (Tabella S2). Il plasmide di trasferimento lentivirale risultante è stato impacchettato in cellule HEK293T mediante protocollo di trasfezione con CaPO<sub>4</sub> e il vettore lentivirale prodotto (LV CBE) è stato concentrato mediante ultracentrifugazione [23]. Fibroblasti e mioblasti cutanei sono stati seminati su una piastra di coltura a 6 pozzetti a una concentrazione di  $1,2 \times 10^5$  cellule/pozzetto e trasdotti con LV CBE. Le cellule EDMD1 #1 non trasdotte sono state utilizzate come controllo. Le cellule sono state spinolate per 45 minuti a 1800 rpm a 20 °C e incubate a 37 °C per sei ore. Successivamente, il terreno è stato sostituito con terreno fresco contenente puomicina per selezionare la popolazione totale trasdotta da gRNA *EMD* LV. Tre settimane dopo la trasduzione, le cellule sono state raccolte e utilizzate per analisi genomiche e biochimiche.

### 2.3. Nucleofezione di cellule EDMD1 ed EDMD2

L'elettroporazione di fibroblasti mutanti LMNA p. L35PinsV e mioblasti EMD c.650\_654dupTGGGC con ribonucleoproteine Alt-R (RNP) è stata eseguita come descritto in [24]. In breve, crRNA e tracrRNA (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) sono stati risospesi in tampone duplex privo di nucleasi (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) a una concentrazione di 100  $\mu$ M e miscelati in quantità molari uguali a una concentrazione di 25  $\mu$ M, come raccomandato dal produttore. Per generare RNP, 72,5 pmol di crRNA:tracrRNA appaiato sono stati miscelati con 60 pmol di Alt-R HiFi SpCas9 Nucleasi V3 (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) e incubati per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati aggiunti 60 pmol di Alt-R Cas9 Electroporation Enhancer (IDT Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), come raccomandato dal produttore. I fibroblasti o mioblasti primari sono stati risospesi in 95,5  $\mu$ L di soluzione P3 dal kit P3 Primary Cell 4D-Nucleofector L (Lonza Ltd., Basilea, Svizzera), miscelati con 4,5  $\mu$ L di Alt-R RNP ed elettroporati utilizzando il programma CM-138.

### 2.4. Analisi dell'editing on- e off-target CRISPR/Cas9

Il DNA genomico dalle cellule primarie è stato estratto utilizzando il kit QIAamp DNA micro (QIAGEN, Hilden, Germania), secondo il protocollo del produttore. Le regioni genomiche che fiancheggiano i siti bersaglio del gRNA sono state amplificate mediante PCR utilizzando la DNA polimerasi Platinum Superfi II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); i primer utilizzati sono stati indicati nella Tabella S2. L'efficienza e la specificità dell'editing sono state valutate mediante analisi di tracciamento delle *indel* (ndr: abbreviazione di un evento di mutazione del DNA per inserzione o delezione di uno o più nucleotidi) mediante decomposizione (TIDE) su ampliconi PCR della regione genomica circostante il sito bersaglio del gRNA in fibroblasti HD. Gli ampliconi PCR delle regioni bersaglio del mutante EDMD2 sono stati ulteriormente clonati nel vettore TOPO TA [25], sequenziati con metodo Sanger e analizzati per la frequenza di *indel*. Per l'analisi NGS dell'editing on-target nelle cellule primarie, gli ampliconi PCR delle regioni genomiche bersaglio sono stati ulteriormente amplificati con un numero limitato ( $n = 8$ ) di cicli di PCR per aggiungere i codici a barre Illumina Nextera, utilizzando i primer di "seconda amplificazione" elencati nella Tabella S2. Le librerie sono state purificate utilizzando il kit di purificazione PCR QIAGEN (QIAGEN, Hilden, Germania). Quantità equimolari di librerie sono state miscelate, diluite e sequenziate utilizzando il sistema Illumina MiSeq (sequenziamento paired-end;  $2 \times 250$  bp).

### 2.5. Profilazione dei microRNA da colture cellulari di fibroblasti EDMD1

#### 2.5.1. Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto con il kit MiRneasy Qiagen (Qiagen, Hilden, Germania # 217084) da un totale di 5 campioni. Nello specifico, tre campioni di RNA sono stati ottenuti da colture di fibroblasti EDMD1 derivate da pazienti portatori di mutazioni diverse del gene *EMD* (EDMD1 #1; EDMD1 #2; EDMD1 #3), un campione è stato ottenuto da fibroblasti EDMD1#1 editati e uno è stato ottenuto da fibroblasti di controllo.

#### 2.5.2. Preparazione delle librerie e sequenziamento

Per il sequenziamento di s-RNA è stato utilizzato il kit Qiaseq miRNA Library (Qiagen n. 331601) seguendo le istruzioni del produttore. La qualità e la concentrazione delle librerie sono state determinate utilizzando l'analisi DNA ScreenTape ad alta sensibilità sul sistema TapeStation4150 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le librerie, diluite a 1,5 pM, sono state sequenziate utilizzando la cella a flusso a 75 cicli NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (Illumina, San Diego, CA, USA) sulla piattaforma NextSeq 500 (Illumina). I dati grezzi di sequenziamento (FASTQ) sono stati analizzati con pipeline QIAseq miRNA Primary Quantification tramite il GeneGlobe Data Analysis Center. I conteggi grezzi sono stati normalizzati utilizzando il pacchetto DESeq2 Bioconductor. Sono stati considerati espressi i miRNA con espressione normalizzata  $> 40^{\circ}$  percentile in almeno un campione. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando DESeq2 1.26.0 Bioconductor nell'ambiente R versione 4.2.1. I miRNA differenzialmente espressi sono stati identificati utilizzando un fold change  $\geq 1,5$  e un p-value aggiustato  $< 0,10$ . La heatmap (ndr: mappa di calore) è stata generata con il pacchetto pheatmap.

#### 2.5.3. Analisi RT-qPCR di microRNA

Per l'analisi RT-qPCR dell'espressione di microRNA, l'RNA è stato estratto da fibroblasti e mioblasti ( $1-1,5 \times 10^6$  cellule) utilizzando il reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Sono state utilizzate colture cellulari confluenti e sono stati ottenuti

per ogni analisi campioni triplicati da ciascuna coltura cellulare. La concentrazione e la qualità dell'RNA sono state controllate utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). L'RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando il kit di trascrizione inversa per microRNA (Thermo Fisher Scientific) e sonde TaqMan specifiche per miRNA (Thermo Fisher Scientific) per miR-21 (ID: 000397), miR-133b (ID: 002247) e miR-206 (ID: 000510). Il cDNA (corrispondente a 15 ng di RNA totale) è stato amplificato in duplicato mediante qRT-PCR su un sistema PCR ViiA7 utilizzando la TaqMan Universal Master Mix e i rispettivi test TaqMan (Thermo Fisher Scientific). I livelli di espressione dei miRNA sono stati normalizzati utilizzando U6-snrRNA e calcolati con la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 2.5.4. Quantificazione delle citochine

Per la valutazione delle citochine sono stati utilizzati terreni di coltura ottenuti da campioni di fibroblasti o mioblasti cresciuti fino alla confluenza. Il terreno di coltura è stato sostituito alla confluenza e le cellule sono state lasciate nel terreno per 72 ore. I kit di analisi delle prestazioni Luminex Kit Human XL Cytokine 24-plex (#FCSTM18B) e TGFβ1, 2 e 3 (#FCSTM17) (Bio-technique) sono stati utilizzati per eseguire l'analisi delle citochine, secondo le linee guida del produttore. I kit di rilevamento degli anticorpi basati su biglie magnetiche consentono la quantificazione simultanea degli analiti di interesse. Le piastre sono state lette sul sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad), basato sulla tecnologia Luminex xMAP. La concentrazione dell'analita legato a ciascuna biglia era proporzionale all'intensità di fluorescenza mediana (MFI) del segnale reporter ed è stata determinata mediante gli standard forniti nei kit (Bio-technique). I dati sono stati normalizzati al numero di cellule di ciascun campione misurato subito dopo la raccolta del terreno. I dati sono stati espressi come concentrazione (pg/mL).

#### 2.5.5. Colorazione per immunofluorescenza immunofluorescente

Per l'analisi immunofluorescente (IF), le colture di fibroblasti e mioblasti sono state fissate con metanolo al 100% a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo la saturazione dei siti di legame aspecifici con una soluzione al 4% di albumina bovina sierica (BSA) per 60 minuti a temperatura ambiente, i vetrini coprioggetto sono stati incubati con anticorpi primari per una notte a 4 °C o per 1 ora a temperatura ambiente e rivelati con anticorpi secondari coniugati con FITC o TRITC diluiti 1:200 (incubati per 1 ora a temperatura ambiente). I campioni sono stati montati con un reagente anti-sbiadimento (Molecular Probes Life Technologies) e osservati utilizzando un microscopio a epifluorescenza Nikon Eclipse Ni con obiettivi 40x, 60x e 100x (Nikon, Minato, Tokyo, Giappone). Le immagini sono state acquisite con il software AR NIS-Elements 4.3 e sono state elaborate utilizzando Photoshop CS.

#### 2.5.6. Anticorpi

Gli anticorpi utilizzati per le reazioni immunochimiche sono stati: anti-emerina (MONX10804, Monosan, Uden, Paesi Bassi) utilizzato a una diluizione di 1:200; anti-lamina A/C (E1, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) utilizzato a una diluizione di 1:500 per IF; anti-caveolina-3 (BD Transduction Laboratories, NJ, USA) utilizzato a una diluizione di 1:200 per IF; anti-desmina (Abcam Ab15200 Cambridge, Regno Unito) utilizzato a una diluizione di 1:1000 per IF; anti-ED-fibronectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilizzato a una diluizione di 1:100 per IF e 1:1000 per Western blot; e anti-α-SMA (Abcam, Cambridge, Regno Unito) utilizzato a 1:100 per IF.

#### 2.5.7. Analisi statistica

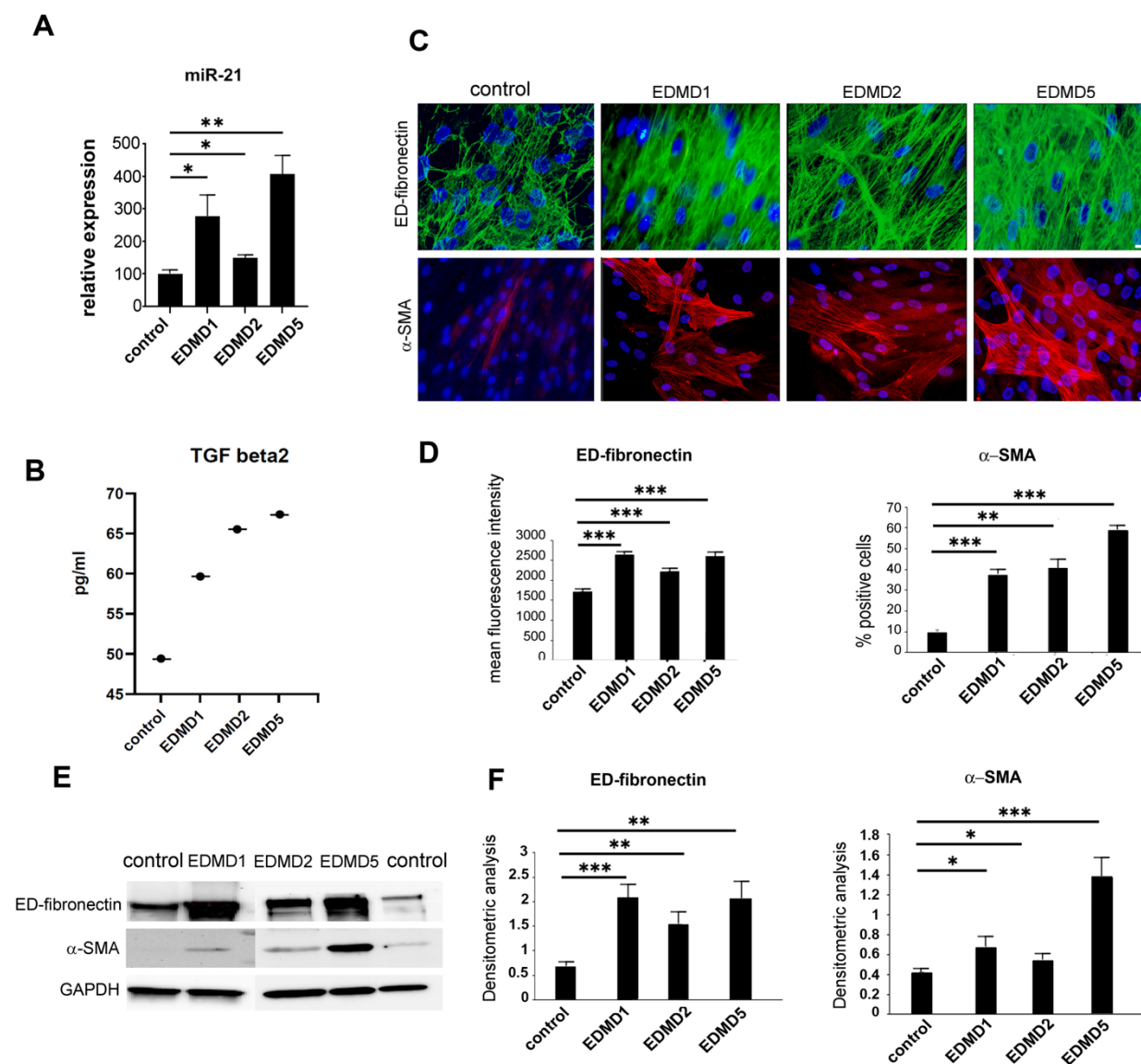
Per l'analisi statistica, è stata calcolata la media ± deviazione standard dei valori ottenuti in tre esperimenti indipendenti (n = 3). Salvo diversa indicazione, l'analisi statistica è stata eseguita applicando il test t di Student e sono indicate le differenze statisticamente significative tra i valori (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 o, \*\*\*\* p < 0,0001) ± deviazione standard.

### 3. Risultati

#### 3.1. Marcatori profibrotici IN EDMD

I dati, da noi precedentemente pubblicati, hanno evidenziato una costante sovraregolazione di TGFβ2 nei sieri di una coorte di pazienti EDMD2, mentre il condizionamento delle cellule con quei sieri ha suggerito un processo profibrotico sottostante come meccanismo patogenetico [9]. Questo ci ha spinto a esaminare il miR-21 profibrotico, un regolatore di TGFβ [26], e i marcatori di miofibroblasti contrattili α-SMA e ED-fibronectina in colture di fibroblasti ottenuti da pazienti EDMD portatori di mutazioni in geni diversi. Come mostrato nella Figura 1A, il miR-21 è RISULTATO significativamente sovraregolato nei fibroblasti EDMD1, EDMD2 ed EDMD5. Inoltre, sono stati misurati livelli elevati di TGFβ2 nei terreni di coltura di cellule laminopatiche rispetto a quelli dei donatori sani (Figura 1B). Nel terreno di coltura dei fibroblasti EDMD1, sono state analizzate altre citochine, elencate

in tabella 2, mediante ELISA multiplex. I terreni di coltura sono stati aggiunti a colture cellulari confluenti e lasciati riposare per 3 giorni prima della raccolta. Non abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative nella quantità di altre citochine secrete, ma abbiamo osservato una tendenza verso una sovraregolazione o una sottoregolazione, come mostrato nella Tabella 2. Il comportamento (diminuzione o aumento) di ciascuna molecola analizzata nel siero dei pazienti EDMD2, misurato in uno studio precedente, è riportato nella stessa Tabella 2 come confronto [27]. Da notare che solo i livelli di interleuchina 6 e TGF $\beta$ 2 sono risultati elevati sia nel terreno di coltura delle cellule EDMD1 che nel siero dei pazienti EDMD2 [9,27].



**Figura 1.** Aumento delle molecole profibrotiche nei fibroblasti EDMD. **(A)** Analisi qRT-PCR dell'espressione di miR-21; sono riportati i valori medi dei dati ottenuti in diverse colture di pazienti EDMD1, EDMD2 o EDMD5; **(B)** Livelli di TGF $\beta$ 2 valutati mediante immunodosaggio multiplex in terreno di coltura di fibroblasti da donatore sano (controllo), EDMD1, EDMD2 ed EDMD5. **(C)** Analisi immunofluorescente di fibronectina ED (pannello superiore) e di actina alfa del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA, pannello inferiore) in fibroblasti di controllo, EDMD1, EDMD2 ed EDMD5. I nuclei sono controcolorati con DAPI. Sono mostrate immagini rappresentative. Barre di scala, 10  $\mu$ m. **(D)** Analisi quantitativa dell'intensità media di fluorescenza di ED-fibronectina e  $\alpha$ -SMA misurata in campioni triplicati provenienti da diverse colture cellulari EDMD1, EDMD2 o EDMD5; **(E)** Analisi Western blot di ED-fibronectina e  $\alpha$ -SMA nei fibroblasti di controllo, EDMD1, EDMD2 ed EDMD5; **(F)** Analisi densitometrica delle bande immunoblotate di ED-fibronectina e  $\alpha$ -SMA eseguita in campioni triplicati provenienti da diversi fibroblasti EDMD1, EDMD2 ed EDMD5. I valori di EDMD1 nei pannelli A, B, D ed F si riferiscono ai valori medi (tre esperimenti eseguiti in colture cellulari diverse dello stesso paziente) ottenuti nei fibroblasti del paziente EDMD1#1 (mutazione *EMD* c.1A>G); i valori di EDMD2 nei pannelli A, B, D ed F si riferiscono ai valori medi ottenuti nei fibroblasti del paziente EDMD2 (mutazione *LMNA* c. 103\_104 insCTG); i valori di EDMD5 nei pannelli A, B, D ed F si riferiscono ai valori medi ottenuti nei fibroblasti del paziente EDMD5 (mutazione *SYNE2* c. 2477\_2478ins T). I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard di tre esperimenti indipendenti

(n = 3) e le differenze statisticamente significative tra i valori calcolati dal test t di Student sono indicate da asterischi (\*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001). (Vedi pag. 7 del testo in lingua inglese)

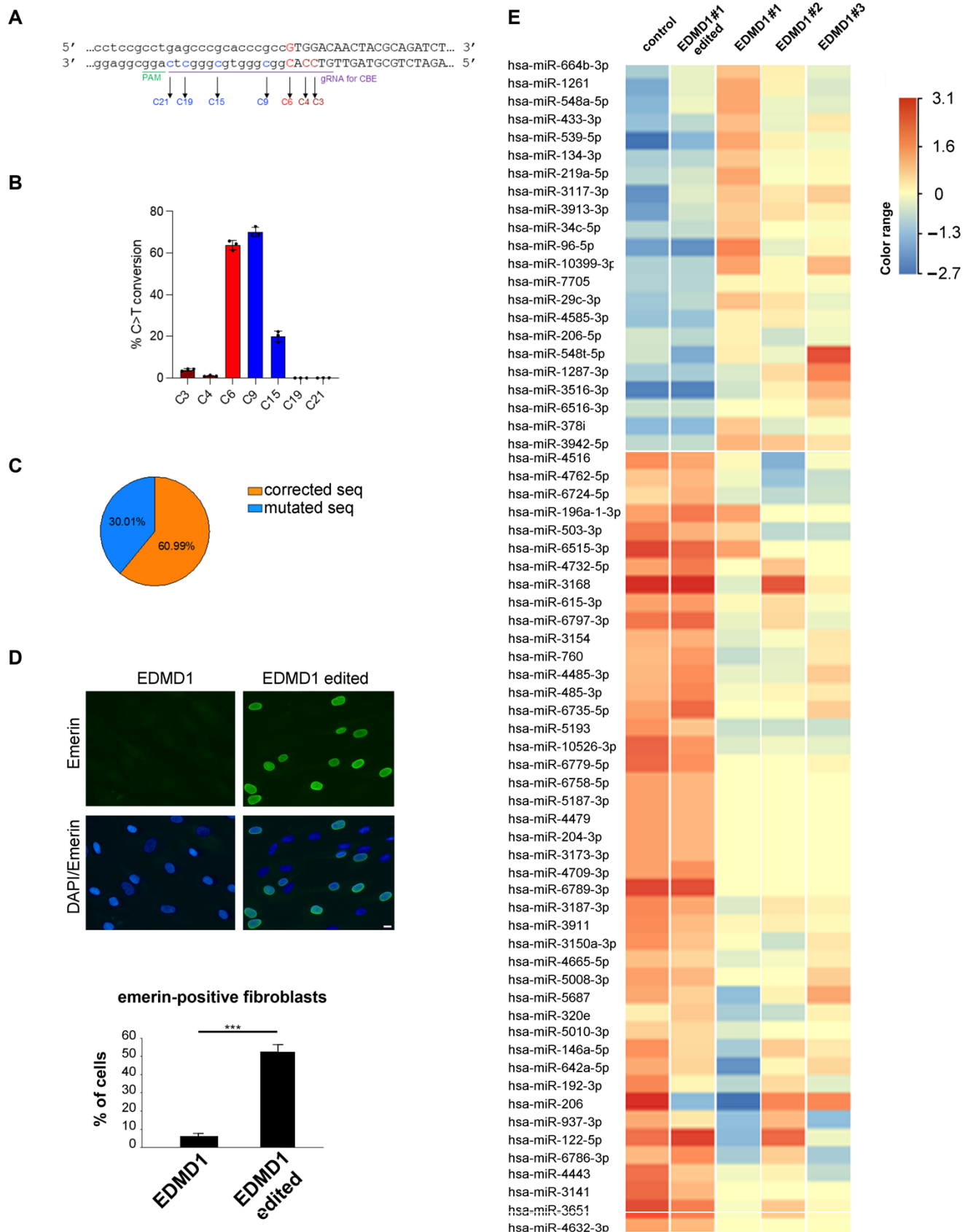
**Tabella 2.** Elenco delle citochine analizzate in questo studio nei terreni di coltura di fibroblasti o mioblasti EDMD1 #1. Sono indicati: funzione delle citochine; andamento della regolazione delle citochine nelle nostre condizioni sperimentali; tipo/i di cellule analizzate; andamento precedentemente riportato nella regolazione delle citochine nel siero laminopatico.

| Citochina            | Funzione  | Andamento osservato nelle nostre condizioni sperimentali | Tipo di cellula analizzata    | Andamento riportato in precedenza nel siero EDMD2 [27] |
|----------------------|---|--|-------------------------------|--|
| <b>G-CSF</b>         | Citochina antinfiammatoria [27]   | invariato  | fibroblasti e mioblasti EDMD1 | ↑  |
| <b>IL-6</b>          | Citochina pro-infiammatoria; richiesta per miogenesi; attiva vie di senescenza LMNA-dipendenti [28,29]                                  | ↑  | fibroblasti EDMD1             | ↑  |
| <b>IL-8</b>          | Citochina antinfiammatoria e pro-invecchiamento [27]  | ↓  | fibroblasti e mioblasti EDMD1 | invariato  |
| <b>IL-9</b>          | Citochina pro-infiammatoria   | ↓  | fibroblasti EDMD1             | ↑  |
| <b>MCP-1 (CCL2)</b>  | Citochina pro-infiammatoria [27]  | ↑  | mioblasti EDMD1               | invariato  |
| <b>MIP-1b (CCL4)</b> | Chemochina infiammatoria [27]   | ↑  | mioblasti EDMD1               | invariato  |
| <b>VEGF</b>          | Regola la sopravvivenza dei mioblasti; bersaglio di miR-206 [21]  | ↑  | mioblasti EDMD1               | invariato  |
| <b>TGFβ1</b>         | Fattore pro-fibrotico [30]  | ↑  | fibroblasti EDMD1             | invariato  |
| <b>TGFβ2</b>         | Fattore pro-fibrotico; promuove l'attivazione alternativa dei macrofagi verso il sottotipo M2 (anti-infiammatori e profibrotici) [9,27] | ↑  | fibroblasti e mioblasti EDMD1 | ↑  |
| <b>TGFβ3</b>         | Coinvolto nella miogenesi adulta, limita la fusione cellulare [30]  | invariato  | fibroblasti e mioblasti EDMD1 | ↓  |

I marcatori di fibrosi, ED-fibronectina e α-SMA sono risultati fortemente aumentati in tutte le colture esaminate di fibroblasti laminopatici, come determinato mediante immunofluorescenza (Figura 1C, D) e analisi Western blot (Figura 1E, F). Questi risultati hanno indicato la conversione dei fibroblasti in miofibroblasti contrattili e hanno suggerito che le vie profibrotiche siano attivate nelle tre forme di EDMD qui esaminate. (Vedi pag. 8 del testo in lingua inglese)

### 3.2. Generazione di colture isogeniche di fibroblasti EDMD1

Per confermare queste osservazioni, abbiamo generato cellule isogeniche di controllo correggendo le mutazioni che causano EDMD1 #1 nel gene *EMD* con il sistema CRISPR/Cas. Per correggere specificamente la variante del gene *EMD* p.Met1Val, causata da una transizione da A a G nell'esone 1 (c.1A>G), è stato utilizzato il sistema di editing della base citosina (CBE) nelle colture di fibroblasti EDMD1 #1 (Figura 2A). Il gRNA *EMD* (Tabella S2) progettato sul filamento complementare inverso trasporta il nucleotide C mutato in posizione 6 (C6) e guida l'iperattivo A3A-BE4max (hyeA3A-BE4max, [31]) alla sequenza 5'-AGG-3' PAM (Figura 2A). Per somministrare il sistema CBE alle cellule EDMD1 #1, abbiamo impacchettato hyeA3A-BE4max e gRNA in un singolo veicolo lentivirale (LV CBE). Per valutare la specificità e l'efficacia di LV CBE, i fibroblasti cutanei del paziente 1 sono stati trasdotti con CBE, in triplicato, e analizzati tramite NGS utilizzando come controlli le cellule non trattate. L'analisi CRISPResso 2.0 sulle letture di sequenza ha registrato il  $63,79\% \pm 2,34\%$  di transizione da C a T nella posizione desiderata 6, con un livello trascurabile di effetto collaterale a C3 e C4 (rispettivamente  $3,98\% \pm 0,58$  e  $1,05\% \pm 0,29$ ) incluso nella sequenza codificante, e un effetto collaterale rilevante, ma non rischioso, a C9 e C15 mappato nella sequenza 5'UTR del gene *EMD* (Figura 2B). Per valutare meglio la frequenza delle sequenze codificanti corrette, abbiamo calcolato le letture che mostrano l'editing della base solo nella sequenza codificante tra tutte le letture modificate. I dati riportati nella Figura 2C hanno mostrato che il  $60,99\% \pm 2,40\%$  delle letture contribuisce alla traduzione di emerina, una proteina funzionale. Nei fibroblasti EDMD1 #1 geneticamente corretti, l'emerina è stata rilevata in oltre il 50% dei nuclei e ha mostrato una corretta localizzazione nella membrana nucleare (Figura 2D). Per confermare il recupero delle condizioni wild-type nei fibroblasti isogenici EDMD1 #1, abbiamo analizzato il miRNoma di tre colture di fibroblasti EDMD1 derivate da pazienti portatori di diverse mutazioni *EMD* (EDMD1 #1, #2, #3) rispetto ai fibroblasti isogenici EDMD1 #1 e ai controlli sani. Dall'analisi è emersa una firma miRNA (ndr: "firma" intesa come tratto distintivo, impronta caratteristica), poiché 22 miRNA sono stati sovraregolati e 40 miRNA sono stati sottoregolati nei campioni di fibroblasti EDMD1 provenienti dai pazienti rispetto ai controlli (Figura 2E). È importante sottolineare che un ripristino quasi completo del profilo di espressione dei miRNA è stato osservato nei fibroblasti isogenici (EDMD1#1 modificato) (Figura 2E), dimostrando sia l'efficienza dell'editing genico sia l'impatto del ripristino dell'emerina sul panorama dell'espressione dei miRNA. Tra i miRNA regolati differenzialmente, evidenziamo qui miR-34c-5p, miR-192-3p e miR-206, che sono stati coinvolti nell'omeostasi o nella rigenerazione muscolare (miR-192-3p); miR-146a-5p, miR-204-3p e miR320, che hanno come bersaglio geni (rispettivamente *FGF2*, *IGFBP2* e *IFITM1*) che attivano la fibrosi o la proliferazione cellulare; e miR134-3p e miR-5193, che hanno come bersaglio AKT e TP53, attivando i processi di apoptosi e di invecchiamento. Una rappresentazione schematica dei miRNA potenzialmente rilevanti per la patogenesi EDMD1 e i riferimenti che descrivono il loro ruolo nelle condizioni laminopatiche, nello sviluppo muscolare o nella fibrosi sono forniti nella Tabella 3 (vedi sotto).



**Figura 2.** Recupero dell'espressione di emerina e del miRNoma nei fibroblasti isogenici EDMD1 mediante editing CRISPR/Cas del gene *EMD*. **(A)** Rappresentazione del gRNA utilizzato per colpire la mutazione c.1A>G (C6 in rosso) nel gene *EMD*. C9, C15, C19 e C21 (blu) e C3 e C4 (marrone) indicano possibili bersagli di effetto collaterale di CBE. Le lettere maiuscole rappresentano parte della sequenza dell'esone 1, quelle minuscole indicano la regione 5'UTR. **(B)** Frequenza di deaminazione on-target (rosso)

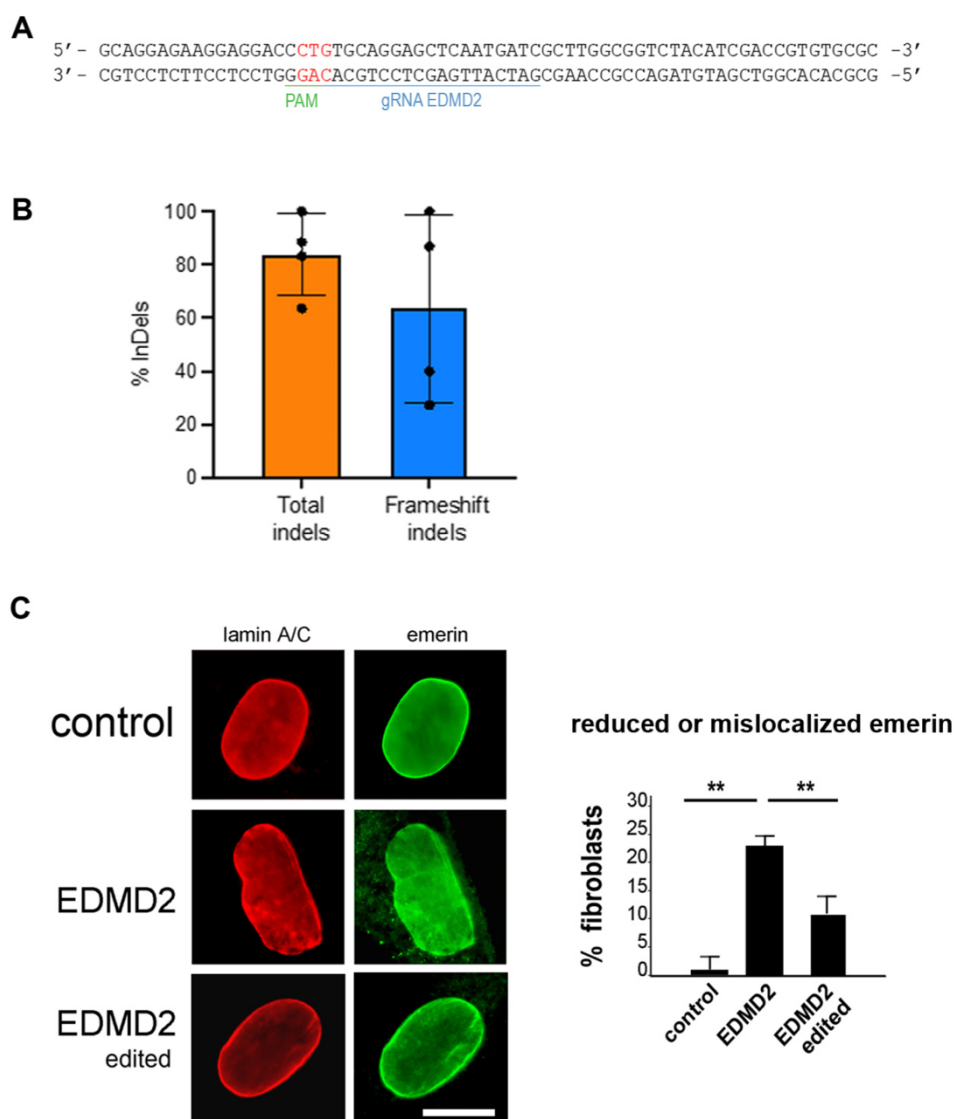
e off target (blu e marrone) mediante analisi NGS di fibroblasti di pazienti trattati con LV CBE. **(C)** Percentuali di sequenze codificanti corrette sul totale delle letture genuine ottenute da fibroblasti trattati con LV CBE. **(D)** Analisi di immunofluorescenza di emerina (verde) in fibroblasti EDMD1 #1 prima (EDMD1) e dopo l'editing genetico (EDMD1 modificato). Il DAPI (blu) è stato utilizzato per la controcolorazione dei nuclei cellulari. Barra di scala: 10  $\mu$ m. Nel grafico è riportata l'analisi quantitativa dell'intensità media della fluorescenza di emerina. I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard di tre esperimenti indipendenti ( $n = 3$ ) e le differenze statisticamente significative tra i valori calcolati dal test t di Student sono indicate da asterischi (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). **(E)** Analisi di clustering e rappresentazione della heatmap dei miRNA espressi differenzialmente (fold change  $> 1,5$ , valore p aggiustato 0,1) nei fibroblasti di controllo (controllo) e in quelli isogenici EDMD1 #1 (EDMD1 #1 modificato) rispetto ai fibroblasti EDMD1 di pazienti diversi (EDMD1 #1, EDMD1 #2, EDMD1 #3). Il colore rosso rappresenta un'espressione superiore alla media; il colore blu rappresenta un'espressione inferiore alla media di tutti i campioni. *(Vedi pagg. 10-11 del testo in lingua inglese)*

### 3.3. Editing CRISPR/Cas di colture di fibroblasti EDMD2

Abbiamo corretto fibroblasti EDMD2 portatori di una mutazione eterozigote dominante c.103\_104 insCTG (p.L35PinsV) nell'esone 1 del gene *LMNA*. Per colpire selettivamente la variante p.L35PinsV preservando l'allele *LMNA* wild-type, abbiamo progettato un gRNA *LMNA* (Tabella S1) specifico per la mutazione per la nucleasi SpCas9, sfruttando la PAM 5'-AGG-3' PAM sul filamento meno, generata dalla mutazione insCTG e assente nell'allele WT (Figura 3A). Abbiamo elettroporato fibroblasti EDMD2 con particelle ribonucleiche (RNP) che trasportavano l'Alt-R HiFi SpCas9 complessato con un gRNA *LMNA* specifico per la mutazione e, 48 ore dopo, abbiamo valutato l'efficienza di editing mediante sequenziamento. In quattro esperimenti indipendenti, l'efficienza di editing è stata dell'83,87%, con la maggior parte di *indel* che portavano a un frameshift (ndr: mutazione che altera la cornice di lettura del codice genetico) della sequenza codificante *LMNA*, con conseguente silenziamento della proteina mutante (Figura 3B). Per confermare la specificità dell'editing per la variante patogena c.103\_104 insCTG (p.L35PinsV), abbiamo elettroporato fibroblasti sani derivati da donatori con RNP portatori del gRNA *LMNA* specifico per la mutazione e osservato l'assenza di editing, misurata mediante analisi TIDE, mentre i fibroblasti sani derivati da donatori trattati con RNP di controllo, incluso gRNA per il locus TRAC (gRNA TRAC, Tabella S2), hanno mostrato circa il 90% di editing (Figura S1). I fibroblasti EDMD2 hanno mostrato nuclei dismorfici e una parziale localizzazione di emerina nel citoplasma, mentre nelle colture cellulari EDMD2 geneticamente modificate è stata osservata la localizzazione di emerina solo nell'involucro nucleare (Figura 3C).

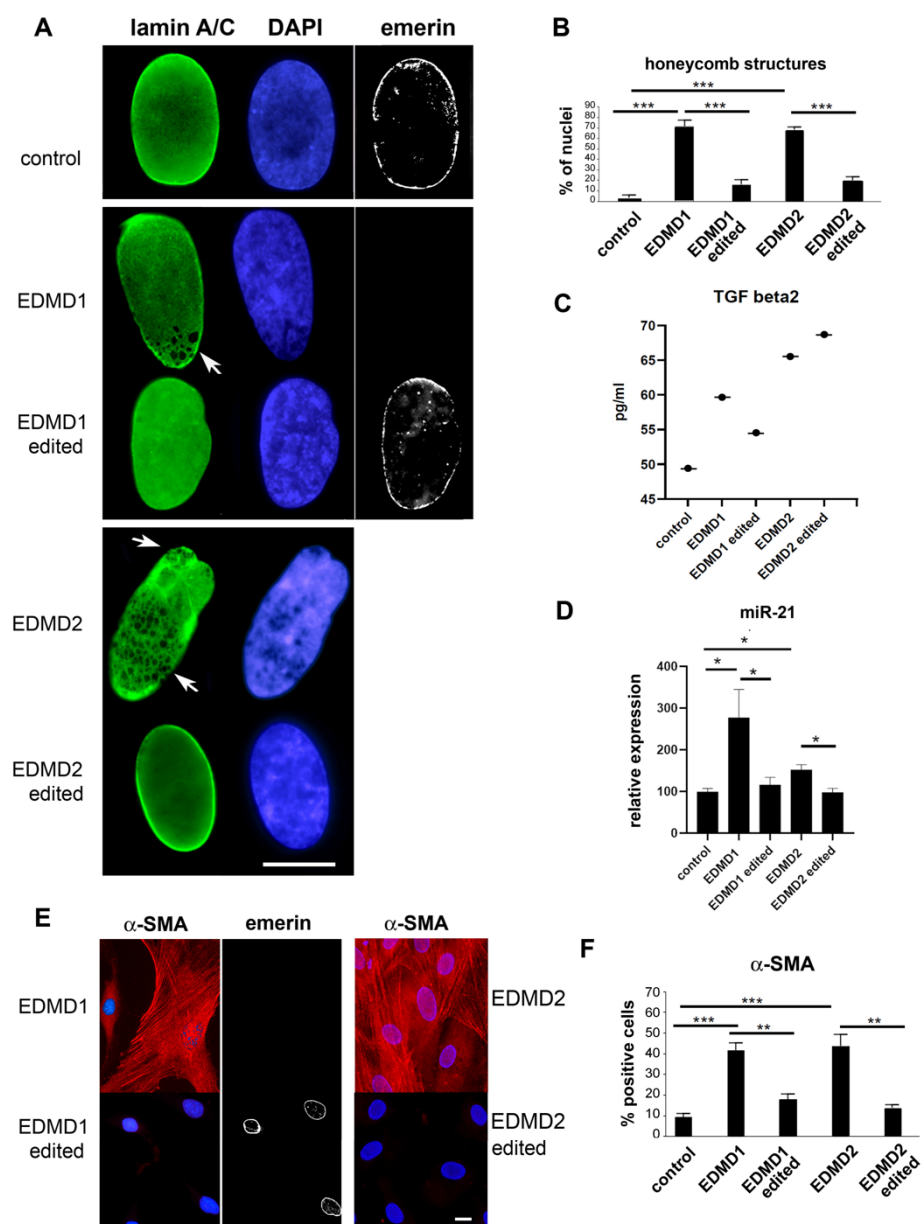
### 3.4. Caratterizzazione di fibroblasti EDMD1 ed EDMD2 corretti

I dismorfismi nucleari o le strutture a nido d'ape sono tipici dei nuclei laminopatici e rappresentano una firma dell'EDMD [32]. La presenza di strutture a nido d'ape è meglio osservata nelle cellule in ciclo. Pertanto, per questa analisi sono state utilizzate cellule seminate 24 ore prima della fissazione. Qui, abbiamo osservato una forma nucleare alterata e/o strutture a nido d'ape marcate con anticorpi antilamina A/C nel 74% di fibroblasti EDMD1 #1 fissati e marcati al 50% di confluenza (Figura 4A). In particolare, questi difetti nucleari erano fortemente ridotti nei fibroblasti EDMD1 #1 isogenici (Figure 4A, B). Nei fibroblasti EDMD2 portatori della mutazione c.103\_104 ins CTG *LMNA*, il 65% dei nuclei presentava strutture a nido d'ape, mentre nelle cellule sottoposte a editing genetico, la percentuale di nuclei con strutture a nido d'ape era significativamente ridotta (Figura 4A,B).



**Figura 3.** Editing CRISPR/Cas dei fibroblasti EDMD2. **(A)** Rappresentazione del gRNA utilizzato per colpire la mutazione c.103\_104 insCTG (in rosso) nell'esone 1 del gene *LMNA*. **(B)** Frequenza di indel totali e editing frameshift nei fibroblasti EDMD2 trattati con RNP portatori di Alt-R HiFi SpCas9 complessato con gRNA specifico per la mutazione. **(C)** Colorazione immunofluorescente di lamina A/C (rosso) eD emerina (verde) in fibroblasti di controllo, EDMD2 e EDMD2 geneticamente modificati, che mostra un nucleo rappresentativo con ridotta fluorescenza per emerina dell'involucro nucleare/colorazione dell'emerina citoplasmatica (EDMD2) e recupero dopo inattivazione del gene *LMNA* mutato (EDMD2 modificato). Barra: 10  $\mu$ m. Nel grafico è riportata la percentuale di cellule che mostrano emerina ridotta e/o mal localizzata. I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard di tre esperimenti indipendenti ( $n = 3$ ) e le differenze statisticamente significative tra i valori calcolati dal test t di Student sono indicate da asterischi (\*\*,  $p < 0,01$ ). (Vedi pag. 12 del testo in lingua inglese)

Per quanto riguarda le molecole fibrogeniche, i livelli di TGF $\beta$ 2 sono risultati ridotti nei terreni di coltura di EDMD1 #1 isogenico, ma non nelle colture di fibroblasti EDMD2 corretti (Figura 4C). Abbiamo inoltre misurato le quantità di TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 3 nei terreni di coltura di cellule EDMD2 ed EDMD2 modificate. Né i livelli di TGF $\beta$ 1 né quelli di TGF $\beta$ 3 sono risultati modificati nei campioni laminopatici (Figura S2). Inoltre, le quantità secrete di TGF $\beta$ 1 e TGF $\beta$ 3 sono rimaste invariate nelle cellule con correzione genica (Figura S2). Tuttavia, i livelli di miR-21 sono risultati significativamente ridotti nei fibroblasti EDMD1 #1 ed EDMD2 sottoposti a correzione genica (Figura 4D) e la percentuale di fibroblasti EDMD1 #1 isogenici  $\alpha$ -SMA-positivi e di cellule EDMD2 modificate era paragonabile ai controlli (Figura 4E, F).



**Figura 4.** Fenotipo recuperato nei fibroblasti EDMD1 ed EDMD2 geneticamente modificati. **(A)** Immunomarcatura di lamina A/C (verde), DAPI (blu) ed emerina (scala di grigi) nei fibroblasti di controllo (controllo), EDMD1#1 (EDMD1), fibroblasti isogenici EDMD1 #1 (EDMD1 modificato), EDMD2 (EDMD2) e fibroblasti EDMD2 geneticamente modificati (EDMD2 modificato). **(B)** Analisi quantitativa dei difetti della lamina nucleare (strutture a nido d'ape) nei fibroblasti EDMD1 #1, EDMD2 e EDMD1 #1 geneticamente modificati (EDMD1 modificato) ed EDMD2 (EDMD2 modificato), misurati come percentuale di nuclei positivi alla struttura a nido d'ape. In totale, sono stati esaminati 200 nuclei per campione. **(C)** Livelli di TGFβ2 valutati mediante immunodosaggi multiplex in terreno di coltura di FIBROBLASTI DI donatore sano (controllo), EDMD1 #1 (EDMD1), EDMD2 e EDMD1 #1 geneticamente modificati (EDMD1 modificato) o EDMD2 (EDMD2 modificato). **(D)** Analisi qRT-PCR di miR-21 in fibroblasti di controllo, EDMD1, EDMD1 #1 isogenici (EDMD1 modificato), EDMD2 e EDMD2 geneticamente modificati (EDMD2 modificato). I dati sono riportati come media ± deviazione standard di valori  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da due esperimenti indipendenti per gruppo. **(E)** Analisi di immunofluorescenza di α-SMA (rosso) in colture di fibroblasti EDMD1, EDMD1 #1 geneticamente modificati, EDMD2 e EDMD2 geneticamente modificati. La colorazione di emerina dei nuclei EDMD1 #1 geneticamente modificati è mostrata in scala di grigi. I nuclei sono controcolorati con DAPI (blu). **(F)** Analisi quantitativa della percentuale di cellule α-SMA-positivo in colture di fibroblasti EDMD1, EDMD2, EDMD1 isogenico (EDMD1 modificato) ed EDMD2 geneticamente modificati (EDMD2 modificato). Barre in (A, E): 10 μm. Tutti gli esperimenti sono triplicati e i dati sono riportati come media ± deviazione standard di tre esperimenti indipendenti (n = 3); le differenze statisticamente significative tra i valori

calcolati con il test t di Student sono indicate da asterischi (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). (Vedi pag. 13 del testo in lingua inglese)

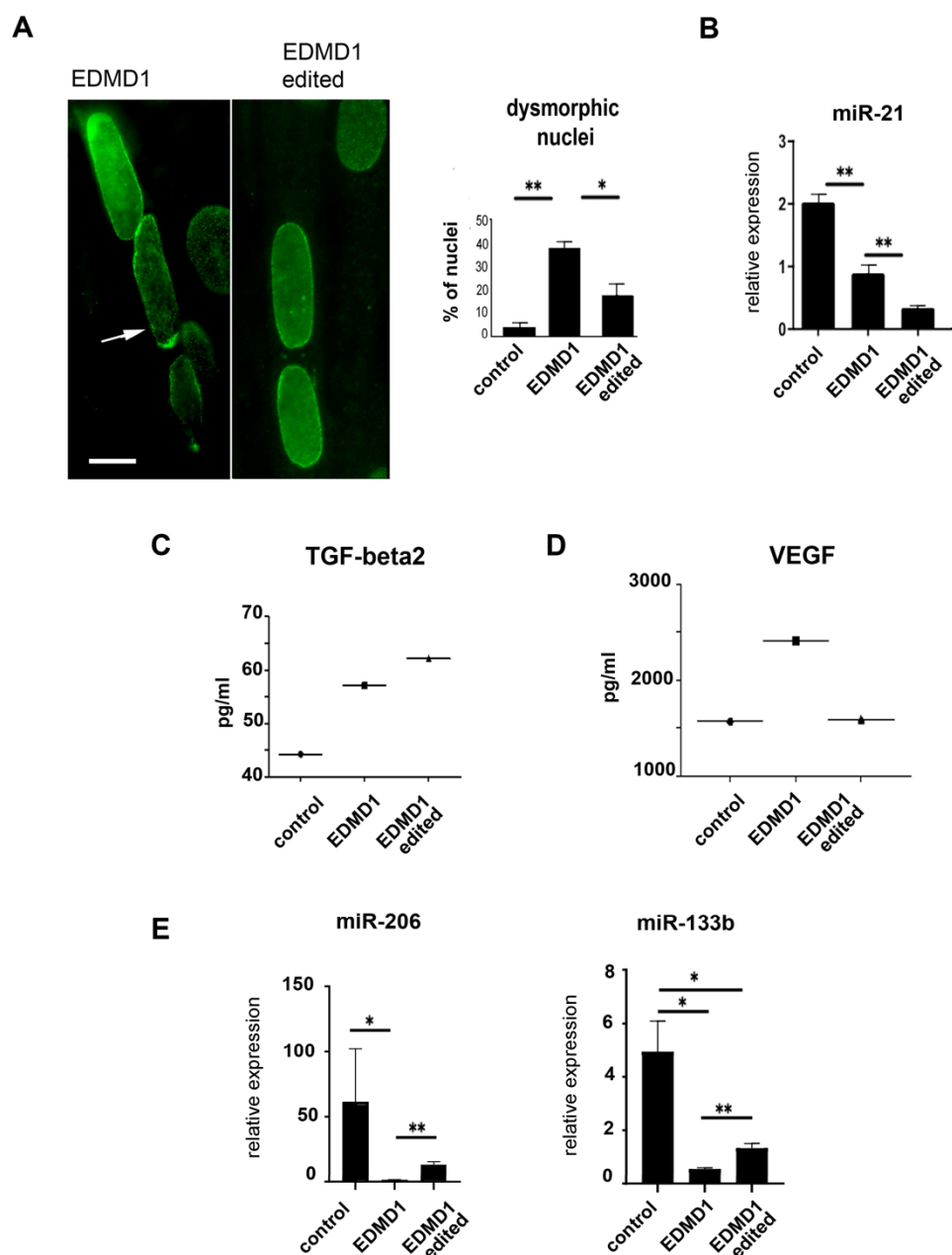
### 3.5. Stabilizzazione dei mioblasti EDMD1 isogenici

Per correggere i mioblasti EDMD1 #1, abbiamo utilizzato il sistema CBE descritto sopra (Figura 2A). L'analisi CRISPResso 2.0 delle letture NGS recuperate dai mioblasti EDMD1 #1 trattati con CBE ha mostrato circa il 52% della conversione DA C A T. L'analisi di immunofluorescenza ha mostrato nuclei emerina-positivi nel 65% dei mioblasti EDMD1 #1 sottoposti a correzione genica, mentre oltre il 25% dei miotubi ha mostrato colorazione per emerina nei nuclei (Figura 5C). Per correggere la mutazione nell'esone 6 del gene *EMD* dei mioblasti EDMD1 #4, abbiamo progettato una coppia di gRNA (gRNA1 EMD ex6 e gRNA3 EMD ex6) in orientamento opposto per rimuovere 26 nt (del26) dell'esone 6 e ripristinare l'ORF (Open Reading Frame) (Figura 5D, Tabella S1). I mioblasti EDMD1 #4 sono stati co-elettroporati con RNP della nucleasi Alt-R HiFi SpCas9 e i due crRNA progettati, e il DNA è stato utilizzato per l'analisi di editing della regione target tramite NGS. L'analisi CRISPResso 2.0 delle letture NGS ha indicato che il  $40,41\% \pm 8,04$  delle letture è stato modificato (Figura 5E); tuttavia, si sono verificate a un livello rilevabile (rispettivamente 1,8 e 2,7%, Figura 5F) le delezioni di 1 e 27 nt, indicando che la frequenza di letture contenenti solo l'editing del26 desiderato era del  $27,01\% \pm 6,53$  sul totale delle sequenze EDMD1 #4 valutate (Figura 5G). L'editing genetico ha ripristinato l'espressione dell'emerina nel 52% dei mioblasti EDMD1 #4 desmina-positivi e la positività all'emerina è stata rilevata nel 15% dei mioblasti (Figura 5H).

### 3.6. Caratterizzazione dei mioblasti EDMD1 isogenici

Per caratterizzare i mioblasti EDMD1 geneticamente modificati, abbiamo colorato lamina A/C in colture di mioblasti differenziati e misurato la percentuale di nuclei che mostravano strutture a nido d'ape o forme nucleari alterate. È stato valutato un significativo miglioramento della morfologia nucleare nei miotubi formati in colture di mioblasti EDMD1 #4 geneticamente modificati (Figura 6A). Questi dati sono stati raccolti in miotubi EDMD1 #4 multinucleati caveolina-positivi. Tuttavia, grazie alla maggiore efficienza di editing genetico ottenuta nelle colture di mioblasti EDMD1 #1, tutti i seguenti parametri sono stati misurati nei campioni EDMD1 #1. Per analizzare le molecole profibrotiche, abbiamo misurato il miR-21 nei lisati di coltura di mioblasti e i livelli di TGF $\beta$ 2 nel terreno di coltura dei mioblasti EDMD1 #1. Inaspettatamente, miR-21 è stato sottoregolato nei mioblasti EDMD1 #1 e i suoi livelli sono ulteriormente diminuiti dopo l'editing genetico (Figura 6B). Inoltre, TGF $\beta$ 2 è aumentato nel secretoma dei mioblasti EDMD1 #1; tuttavia, la sua quantità è rimasta invariata dopo la correzione genica (Figura 6C). D'altra parte, abbiamo osservato un aumento della secrezione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) nelle colture di mioblasti EDMD1 #1 e un completo recupero dopo la correzione genica (Figura 6D). Questi ultimi risultati hanno mostrato che l'attivazione delle vie profibrotiche non si verifica nelle cellule muscolari e hanno suggerito che effetti intrinseci o sistemici cellulari guidino le vie patogenetiche in quelle cellule. Nel complesso, l'analisi del miRNoma e lo studio qPCR hanno indicato il ruolo dei microRNA nei percorsi patogenetici dell'EDMD1. La Tabella 3 riporta un elenco dei microRNA identificati nei fibroblasti o mioblasti dell'EDMD1 e potenzialmente coinvolti nella patogenesi dell'EDMD grazie al loro ruolo nella regolazione di geni e percorsi implicati nell'omeostasi muscolare o nella proliferazione cellulare e negli eventi profibrotici.





**Figura 6.** Recupero del fenotipo cellulare nei mioblasti EDMD1 geneticamente modificati.

(A) Immunofluorescenza di lamina A/C in nuclei di miotubi EDMD1 #4 (EDMD1) prima e dopo correzione e isogenici di EDMD1 #4 (EDMD1 modificati). Il grafico riporta la percentuale di nuclei che presentano strutture a nido d'ape (freccia) e/o forme nucleari alterate. Barra: 10  $\mu$ m. (B) Analisi qRT-PCR dell'espressione di miR-21 in colture di mioblasti di controllo, EDMD1 #1 e isogenici di EDMD1 #1. (C) Livelli di TGF $\beta$ 2 misurati mediante ELISA nel secretoma di colture di mioblasti di controllo, EDMD1 #1 e isogenici CORRETTI di EDMD1 #1. (D) Livelli di VEGF misurati mediante ELISA nel secretoma di colture di mioblasti di controllo, EDMD1 e isogenici di EDMD1 #1. (E) Analisi qRT-PCR di myo-MiR, miR-206 e miR-133b in colture di mioblasti di controllo, EDMD1 #1 e isogeniche EDMD1 #1. I dati qRT-PCR sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da due esperimenti indipendenti per gruppo. Tutti i dati sono medie  $\pm$  deviazione standard di tre analisi indipendenti eseguite in diverse colture di mioblasti. Le differenze statisticamente significative tra i valori calcolati con il test t di Student sono indicate da asterischi (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). (Vedi pag. 16 del testo in lingua inglese)

**Tabella 3.** Elenco dei microRNA potenzialmente rilevanti nella patogenesi di EDMD1. Questa tabella mostra l'espressione differenziale in EDMD1 #1 (aumentata o diminuita); il recupero in cellule modificate con CRISPR; i pathway suggeriti; il/i gene/i bersaglio/i correlato/i a proliferazione, fibrosi o miogenesi; i riferimenti a studi condotti su EDMD; i riferimenti a studi relativi a miologia o fibrosi.

| miRNA          | Variazione in EDMD1<br>(Fibroblasti F / Mioblasti M) | Recupero in cellule<br>EDMD1 corrette con<br>CRISPR | Via/pattern<br>suggerito        | Geni<br>bersaglio | Studi in<br>EDMD | Studi in<br>miologia/fibrosi |
|----------------|--|---|---------------------------------|-------------------|------------------|------------------------------|
| miR-21         | ↑ (F, M)   | sì  | fibrosi                         | Smad7,<br>YAP     | –                | [18,33]                      |
| miR-34c-<br>5p | ↑ (F)  | sì  | omeostasi muscolare             | nNOS              | –                | [34]                         |
| miR-133b       | ↓ (M)  | sì  | omeostasi<br>muscolare; fibrosi | CTGF              | [16]             | [19,35]                      |
| miR-134-<br>3p | ↑ (F)  | sì  | apoptosi                        | AKT               | –                | [36]                         |
| miR-146a-5p    | ↓ (F)  | sì  | fibrosi                         | FGF2              | [15]***          | [37]                         |
| miR-192-<br>3p | ↓ (F)  | sì  | rigenerazione                   | NR3C1,<br>PIM1    | [17]****         | [38]                         |
| miR-204-<br>3p | ↓ (F)  | sì  | proliferazione;<br>autofagia    | IGFBP2            | –                | [39]                         |
| miR-206        | ↑/↓ (F)*; ↓ (M)                                      | sì  | omeostasi<br>muscolare; fibrosi | HDAC4             | –                | [19]                         |
| miR-320        | ↓ (F)  | sì  | fibrosi                         | IFITM1            | –                | [40]                         |
| miR-5193       | ↓ (F)  | sì  | invecchiamento                  | TP53              | –                | [41]                         |

\* Risultati variabili con primer diversi.

\*\*\* Analisi condotta su mioblasti umani.

\*\*\*\* Analisi condotta su biopsie muscolari umane.

#### 4. Discussione

Studi precedenti hanno mostrato livelli aumentati di TGFβ2 nel siero di pazienti EDMD2 e l'attivazione di vie profibrotiche mediate da TGFβ2 e CTGF in modelli preclinici della malattia [9,10]. In questo studio, abbiamo scoperto che un ~~un~~<sup>un</sup> MECCANISMO simile potrebbe guidare la patogenesi di altre forme di EDMD. Una condizione profibrotica è stata effettivamente valutata nei fibroblasti prelevati da biopsie di pazienti EDMD1, EDMD2 ed EDMD5. È interessante notare che, in tutti i casi, è stata osservata una maggiore secrezione di TGFβ2 nei fibroblasti in coltura, a supporto dell'ipotesi che un meccanismo dipendente da TGFβ inneschi la fibrosi nelle laminopatie muscolari associate a mutazioni in lamina A/C, emerin o nesprina 2. Per quanto riguarda i fibroblasti mutanti *SYNE 2*, vale la pena notare che il silenziamento di nesprina 2 è stato collegato all'inibizione della transdifferenziazione, in caso di stress meccanico [42], dei fibroblasti in miofibroblasti. Questo risultato è coerente con i nostri dati che mostrano l'attivazione di molecole profibrotiche nei fibroblasti mutanti *SYNE 2*, implicando direttamente un coinvolgimento della nesprina 2 mutante nella fibrosi. Dati recenti mostrano un'interazione di nesprina 2 con teletonina nei sarcomeri dei cardiomiociti, suggerendo che la proteina mutata potrebbe influenzare sia l'omeostasi del tessuto connettivo sia la funzionalità muscolare, un'ipotesi che merita di essere indagata in EDMD5 [43].

Nel caso di EDMD1, i risultati sono stati supportati dal confronto tra i dati ottenuti nei fibroblasti dei pazienti e le loro cellule isogeniche, derivate dalla correzione mediata da CBE del gene *EMD*. Inoltre, i fibroblasti EDMD2 con l'allele mutato *LMNA*

inattivato dal sistema CRISPR/Cas hanno confermato l'attenuazione del fenotipo fibrogenico. In questo studio, abbiamo riscontrato una sovraregolazione di miR-21, che è noto per essere un bersaglio di TGF $\beta$  e PER innescare processi profibrotici [18]. Ipotizziamo che l'aumento della produzione di  $\alpha$ -SMA e ED-fibronectina osservato nelle colture di fibroblasti EDMD con mutazioni in geni diversi possa essere innescato da TGF $\beta$  o miR-21 o da entrambi, a seconda della complessa interazione di fattori di segnalazione determinati da mutazioni diverse. Da notare che miR-21 svolge un ruolo interessante nella rilevazione meccanica come custode della memoria a lungo termine della rigidità tissutale, collegando le condizioni meccaniche ai processi fibrogenici [44]. È stato dimostrato che le cellule staminali mesenchimali mantengono l'imprinting determinato da substrati rigidi (tessuti) attraverso l'attivazione di MRTF-A dipendente da miR-21 [44]. In quest'ultima condizione, si osserva un accumulo di  $\alpha$ SMA, mentre l'inibizione di miR-21 compromette l'inizio della conversione fibrotica dipendente dalla rigidità [44]. Data tale complessità e il ben documentato coinvolgimento dell'involucro nucleare nella risposta meccanica, non sarebbe sorprendente se diverse mutazioni di *LMNA*, *EMD* o *SYNE2* influenzassero la miogenesi e/o la funzionalità muscolare attraverso miR-21, portando a un ambiente profibrotico in caso di stress meccanico. D'altra parte, una perdita di meccanosensibilità correlata a miR-21 potrebbe verificarsi nei mioblasti EDMD1, che hanno mostrato una sottoregolazione di questo miRNA. In questo senso, è stato dimostrato che il fattore di trascrizione meccanosensibile YAP viene importato in modo anomalo nel nucleo anche in assenza di stimolazione meccanica nelle cellule EDMD2 [20,45,46]. Insieme alle cellule staminali pluripotenti indotte, i fibroblasti e i mioblasti isogenici rappresentano un buon contesto sperimentale per un'ulteriore valutazione di potenziali biomarcatori [47]. Le cellule isogeniche sono particolarmente utili per discriminare i biomarcatori di malattia, poiché evitano i bias determinati dai diversi background delle cellule di controllo rispetto alle cellule derivate dal paziente. In questo studio, lo l'esame del miRNoma dei fibroblasti EDMD1 e delle cellule isogeniche ha rivelato una chiara firma miRNA per EDMD1, sebbene fosse anche evidente una leggera variabilità tra i pazienti. La disponibilità di tali colture cellulari ci ha permesso di identificare i miRNA espressi differenzialmente in EDMD1 e una firma complessiva che viene per lo più recuperata nei fibroblasti CRISPR/Cas corretti. I miRNA coinvolti nella regolazione della fibrosi e della proliferazione cellulare, tra cui miR-21, miR-146a-3p, miR-206 e miR-320, sono particolarmente interessanti nel contesto del nostro studio. Tutti questi miRNA sono sottoregolati nei fibroblasti. Tuttavia, va notato che miR-206 e miR-320 hanno dimostrato di agire come antifibrotici nei fibroblasti e profibrotici in altri tipi cellulari e, soprattutto, il loro ruolo in vivo sembra essere tessuto-specifico [21,40]. Pertanto, l'affascinante possibilità di bersagliare i microRNA a scopi terapeutici deve essere attentamente considerata. È interessante notare che nei mioblasti EDMD1 abbiamo identificato una regolazione difettosa del ~~cluster~~ GRUPPO miR206/133b. Questi miRNA sono espressi selettivamente nel muscolo scheletrico in via di sviluppo, ma non nel cuore, e sono sotto il controllo di geni regolatori miogenici come MyoD [48]. La sottoregolazione di miR-133b è stata dimostrata in un modello preclinico di EDMD2 [16]. È importante notare che miR-133 agisce come un repressore della proliferazione dei mioblasti e la sua sottoregolazione potrebbe compromettere l'uscita dal ciclo cellulare necessaria per la differenziazione miogenica [49]. Infatti, sia miR-133 SIA miR-206 sono noti per reprimere la deacetilasi dell'istone 4 (HDAC4) e indurre la differenziazione muscolare, quindi la loro sottoregolazione potrebbe compromettere la miogenesi in EDMD1 [21]. Inoltre, è stato riportato che miR-206 modula l'espressione del VEGF nel muscolo [50] e un recente studio mostra che le cellule staminali muscolari esprimono i recettori PER VEGF, mentre il segnale VEGF influenza la sopravvivenza dei mioblasti [51]. In questo contesto, la sottoregolazione di miR-206 dovrebbe causare la sovraregolazione di VEGF nei mioblasti EDMD1, riducendo così la vitalità delle cellule precursori del muscolo [51,52]. Per quanto riguarda altre citochine, abbiamo osservato una tendenza per alcune di esse, ma la differenza nei livelli di proteine secrete tra fibroblasti o mioblasti di tipo selvatico e EDMD non ha raggiunto la significatività statistica (Tabella 2). Tuttavia, dato il numero limitato di campioni qui impiegati e sulla base di dati precedentemente pubblicati che mostrano livelli proteici significativamente più elevati di TGF $\beta$ 2, DI interleuchina 17, DEL fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), DI interleuchina-1 (IL-1), DELL'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1ra) e DI interleuchina 4 nel siero di un'ampia coorte di pazienti affetti da laminopatie muscolari correlate a LMNA [27], suggeriamo che l'effetto dell'ambiente muscolare svolga un ruolo fondamentale nei meccanismi patogenetici dell'EDMD, incluso il processo fibrotico (Tabella 2). Inoltre, il costante aumento di interleuchina 6 e TGF $\beta$ 2 nei terreni di coltura cellulare e nel siero dei pazienti [9,19] indica queste molecole come potenziali biomarcatori. Infine, i nostri risultati mostrano che le molecole fibrogeniche, tra cui miR-21, ED-fibronectina e  $\alpha$ -SMA, sono selettivamente sovraregolate nei fibroblasti, mentre solo TGF $\beta$ 2 è risultato aumentato nei mioblasti EDMD1. Questa scoperta suggerisce che i fibroblasti svolgono un ruolo chiave nella patogenesi dell'EDMD e potrebbero rappresentare un bersaglio PER interventi terapeutici, compresi quelli basati sull'editing genetico.

## 5. Conclusioni

In conclusione, dimostriamo che la conversione dei fibroblasti in un fenotipo fibrogenico è una caratteristica comune dei fibroblasti EDMD1, EDMD2 ed EDMD5 e coinvolge eventi profibrotici correlati a miR-21 e TGFβ.

Concentrandoci sulle cellule EDMD1, abbiamo dimostrato che molti miRNA sono alterati nei fibroblasti EDMD1, inclusi alcuni miRNA già descritti come alterati nei mioblasti EDMD [15]. Il loro profilo di espressione viene quasi completamente recuperato dopo l'editing genetico, suggerendo una regolazione diretta del panorama trascrizionale da parte dell'emerina.

È interessante notare che, tra i mio-miR, abbiamo identificato miR-133b e miR-206 come bersagli della malattia nei precursori muscolari EDMD1 e un ciclo regolatorio alterato che coinvolge TGFβ2 nella sottoregolazione di miR-206 e un effetto a valle sul VEGF, tutti eventi che potenzialmente favoriscono la proliferazione piuttosto che la differenziazione dei mioblasti.

Questi dati suggeriscono che i processi fibrotici che si verificano nelle cellule non muscolari e il controllo alterato del destino dei precursori muscolari, che favorisce la proliferazione, possono contribuire alla patogenesi dell'EDMD.

Il nostro studio identifica miR-21 come un miRNA a regolazione differenziale nei fibroblasti, che potenzialmente collega un'alterata meccanosensibilità alla fibrosi in EDMD. Questo apre la strada a una comprensione più approfondita della patogenesi dell'EDMD che merita ulteriori indagini. Infine, la correzione del difetto genetico nelle cellule EDMD1 ed EDMD2 ha fornito una prova di principio per future applicazioni dell'editing genetico per il trattamento dell'EDMD. Tuttavia, il basso tasso di differenziazione osservato nei mioblasti EDMD1 geneticamente corretti suggerisce che la traduzione in vivo delle tecnologie basate su CRISPR/Cas richieda ulteriori studi.

**Materiali supplementari:** Le seguenti informazioni di supporto possono essere scaricate all'indirizzo: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells14171321/s1>. Figura S1: Editing CRISPR/Cas di fibroblasti HD. Analisi TIDE di fibroblasti HD nucleofettati con gRNA LMNA o gRNA TRAC come controllo. Figura S2: Livelli di TGFβ in EDMD2 e nel terreno di coltura dei fibroblasti EDMD2 geneticamente modificati. Tabella S1: Elenco delle colture cellulari utilizzate in questo studio. Tabella S2: Elenco dei primer utilizzati in questo studio.

**Contributi degli autori:** Concettualizzazione, G.L. (Giovanna Lattanzi), A.R., E.C.S., S.B. e M.F.; Cura dei dati, C.B., L.M., A.P., C.F. e S.B.; Analisi formale, C.B., D.B., E.C., E.S., E.M., S.M., S.B., M.F., P.C., G.F., V.D.S., C.M., R.R., C.F. e B.F.; Acquisizione finanziamenti, A.R., C.F., C.B., L.M. e G.L. (Giovanna Lattanzi); Indagine, E.C., E.M., R.R., I.P., M.G., G.V., D.C., P.C. e G.F.; Metodologia, D.B., E.C., E.S., E.M., P.C., M.C. (Marco Cavallo), R.R. e F.C.; Amministrazione del progetto, G.L. (Giovanna Lattanzi); Risorse, LM, MC (Marco Cavallo), M.G., A.P., G.V., D.C., C.B. e CF; Supervisione: A.R., L.M., A.P., E.S. e RR; Convalida, R.B., E.S., M.C. (Marco Cattaneo), ed G.L. (Gina Lisignoli); Visualizzazione, D.B., E.C., I.P. e SB; Scrittura—Bozza originale, G.L. (Giovanna Lattanzi); Redazione - Revisione e editing: D.B., E.S., E.M., A.R., G.L. (Gina Lisignoli), S.B., M.F., G.V. e L.M. Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

**Finanziamento:** Questa ricerca è stata finanziata dal progetto AIDMED CUP B34I19002160007 e dall'Associazione Alessandra Proietti, progetto CUP B33C22001640007; Progetto PNRR ECOSISTER finanziato dall'UE. cod. ECS\_00000033—CUP B89I22000650001, AIFA TREAT-LMNA 2019-004426-24; Progetto AIDMED CUP E94I19002990007, CUP E93C23002290007, E98C13000210007; Progetto PNRR ECOSISTER finanziato dall'UE ECS\_00000033—CUP E93C22001100001 Spoke 1, Milestone 9.1; PRIN 2022 CUP E53D23007410006 e PRIN 2022 Prot. 20223WFFJ3; progetto REGINA T3-AN-03 CUP del Ministero della Salute italiano: B53C22002520006. Il RRC del Ministero della Salute italiano ha parzialmente supportato questo lavoro.

**Dichiarazione del Comitato Etico Istituzionale:** Le indagini sono state condotte seguendo le regole della Dichiarazione di Helsinki del 1975, rivista nel 2013. Tutti i campioni di colture cellulari utilizzati in questo studio provenivano dalla biobanca BioLaM (approvata dal "Comitato Etico IOR" il 5 settembre 2016. Prot. gen 0018250-01-13).

**Dichiarazione di consenso informato:** Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i soggetti coinvolti nello studio.

**Dichiarazione di disponibilità dei dati:** I dati grezzi a supporto delle conclusioni di questo articolo saranno resi disponibili dagli autori su richiesta.

**Ringraziamenti:** Gli autori ringraziano i colleghi, i pazienti e gli altri membri del Network Italiano Laminopatie per la loro utile discussione e i loro suggerimenti. Gli autori ringraziano Michele Martinelli per il supporto amministrativo e tecnico e Patrizia Sabatelli per il supporto tecnico.

**Conflitti di interesse:** Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

**Riferimenti:** *Vedi pagg. 20-22 del testo in inglese*

**Disclaimer/Nota dell'editore:** le dichiarazioni, le opinioni e i dati contenuti in tutte le pubblicazioni sono esclusivamente quelli dei singoli autori e collaboratori e non di MDPI e/o del/i curatore/i. MDPI e/o il/i curatore/i declinano ogni responsabilità per eventuali danni a persone o proprietà derivanti da idee, metodi, istruzioni o prodotti a cui si fa riferimento nel contenuto.