



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

PIANO DI ATTIVITÀ E PROGETTO DI RICERCA

Titolo: Utilizzo di Tecnologie Avanzate di Modifica del Genoma per la Sovraespressione Costitutiva di Utrofina.

Introduzione

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) colpisce circa 1 ragazzo su 5.000 ed è una malattia monogenica letale. La DMD è causata da mutazioni nel gene *DMD*, che codifica per la distrofina. La distrofina è fondamentale per mantenere l'integrità delle membrane muscolari, fungendo da collegamento strutturale tra il complesso distroglicanico e il citoscheletro (1). Il gene *DMD* si trova sul cromosoma X ed è uno dei più grandi, composto da 79 esoni. Sono state identificate oltre 7.000 mutazioni genomiche nei pazienti con DMD, la maggior parte delle quali sono grandi delezioni (di 1 esone o più) che interrompono il quadro di lettura della distrofina, rappresentando il 69% di tutti i casi di DMD (2). I pazienti con DMD sviluppano una malattia muscolare progressiva, presentando difficoltà a deambulare già in giovane età e accusando insufficienza respiratoria e cardiaca entro i trent'anni. Numerosi approcci terapeutici hanno cercato di ripristinare la funzione del muscolo scheletrico e cardiaco nella DMD, con risultati però limitati. Le mutazioni da delezione interna nel gene *DMD*, che preservano i domini N- e C- terminali della proteina, causano la distrofia muscolare di Becker (BMD), una malattia muscolare relativamente lieve con differenti progressioni cliniche (3).

Il nostro e altri gruppi di ricerca hanno utilizzato la tecnologia CRISPR-Cas per correggere varie mutazioni della DMD a livello genomico e per esprimere un'isoforma di distrofina funzionale, anche se troncata. Un approccio prevede l'uso di guide a RNA (sgRNA) per indirizzare la nucleasi Cas9 verso sequenze specifiche del DNA. Le nucleasi Cas9 generano una rottura a doppio filamento del DNA (DSB), che viene riparata tramite riparazione per omologia (HDR) nelle cellule in proliferazione o unione non omologa delle estremità (NHEJ), con creazione di inserzioni o delezioni (INDEL) nel sito della rottura (4). Un altro approccio si basa sul *base editing* del DNA, che consente di modificare specifiche sequenze nucleotidiche. Gli *adenine base editors* (ABEs) convertono le coppie di basi A•T in G•C, mentre i *cytosine base editors* (CBEs) convertono le coppie di basi C•G in T•C (5,6). Utilizzando una strategia di "*single-swap editing*" con ABE per interrompere i siti di splicing accettori o donatori che fiancheggiano un esone target, si induce il salto di tale esone nel trascritto finale dell'mRNA maturo (7). Recentemente, abbiamo applicato questa strategia di "*single-swap editing*" per saltare 4 degli esoni più rilevanti dal punto di vista terapeutico, con benefici potenziali per circa il 30% dei pazienti con DMD (8). Tuttavia, questi approcci di salto degli esoni non sono applicabili alle mutazioni nei domini essenziali della distrofina (come il dominio N-terminale). Pertanto, sia l'*editing* con nucleasi che con *base editors* per la DMD dovrebbero essere sviluppati in modo specifico per ciascuna mutazione, richiedendo strategie diverse per trattare tutte le 7.000 mutazioni uniche della DMD.

Un approccio terapeutico promettente per la DMD è la sovraespressione dell'utrofina, un paralogo autosomico della distrofina. L'utrofina potrebbe compensare funzionalmente la mancanza di distrofina, grazie alla sua elevata somiglianza strutturale e funzionale (9). Il gene dell'utrofina (*UTRN*) si trova sul cromosoma 6q24 umano e presenta una struttura introne-esone simile a quella del gene della distrofina. Tuttavia, utrofina e distrofina differiscono nella loro espressione spaziale e temporale. L'utrofina è espressa ubiquitariamente nei tessuti embrionali, mentre nei muscoli adulti è principalmente confinata alla giunzione neuromuscolare. La distrofina, invece, è espressa nei muscoli scheletrici, cardiaci e lisci nell'adulto (10).

PROF. FRANCESCO CHEMELLO

Via Francesco Selmi 3 | 40126 Bologna | Italia | Tel. + 39 051 2094167 | francesco.chemello2@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Evidenze che utrofina possa compensare la mancanza di distrofina sono state ottenute in topi transgenici *mdx* che non esprimono distrofina e come meccanismo compensatorio sovraesprimono utrofina (11). È importante notare che un modesto aumento dell'espressione di utrofina (1,5 volte) è benefico, e che la sovraespressione ubiquitaria di utrofina nel topo *mdx* non è tossica (12). Questo rende la sovraespressione di utrofina una strategia terapeutica interessante per la DMD, teoricamente applicabile a tutti i pazienti, indipendentemente dalla mutazione. Studi sui pazienti con DMD hanno mostrato che l'espressione di utrofina ha effetti positivi sulla gravità della malattia, ritardandone la progressione. Diverse molecole tras-attivatrici del promotore di utrofina sono in fase di sviluppo preclinico e clinico, ma tutti questi trattamenti richiedono una somministrazione continua e la loro efficienza rimane bassa.

L'espressione di utrofina è repressa post-trascrizionalmente da diversi microRNA (miRNA), che sono piccole molecole non codificanti (~22 nt) che si legano a siti complementari nella regione non codificante al 3' degli mRNA (3' UTR) (13). L'obiettivo generale di questo progetto è l'utilizzo della tecnologia del *base editing* per distruggere con precisione i siti di legame dei miRNA nella 3' UTR di utrofina, promuovendone la sovraespressione costitutiva.

Piano esecutivo e di formazione

Per rispondere agli obiettivi del progetto, l'assegnista si occuperà di determinare le strategie ottimali di base editing per eliminare i siti di legame dei miRNA nella 3' UTR del gene *UTRN*. Dimostrerà quindi la sovraespressione di utrofina in miotubi e cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs) con diverse mutazioni identificate nei pazienti DMD. Inoltre, dimostrerà in vivo che la distruzione mediata da *base editing* dei siti di legame dei miRNA nella 3' UTR di *Utrn* porta a un miglioramento funzionale nei muscoli scheletrici e cardiaci.

A tal fine, l'assegnista utilizzerà: 1. tecnologie molecolari avanzate che prevedono l'uso dei *base editors* per modificare il genoma e saggi di luciferasi per dimostrare l'efficacia della strategia; 2. modelli cellulari avanzati che prevedono l'utilizzo di cellule hiPSCs e il loro differenziamento in cardiomiociti e fibre muscolari; 3. modelli in vivo per testare sistemi innovativi di *delivery*, come i vettori virali miotropici.

L'assegnista avrà l'opportunità di collaborare con importanti gruppi di ricerca nazionali e internazionali, tra cui il gruppo della Prof.ssa Milena Bellin dell'Università di Padova (per il differenziamento di hiPSCs in cardiomiociti maturi) e il gruppo del Prof. Eric Olson dell'UT Southwestern Medical Center (Dallas, USA, per l'utilizzo di modelli murini umanizzati con mutazioni che causano DMD). L'attività, la crescita professionale e la produttività dell'assegnista saranno monitorate attraverso incontri periodici con il gruppo di ricerca, in cui l'assegnista presenterà i dati ottenuti, discutendo le difficoltà incontrate, le modalità sperimentali adottate per superarle e i progressi compiuti.

PROF. FRANCESCO CHEMELLO

Via Francesco Selmi 3 | 40126 Bologna | Italia | Tel. + 39 051 2094167 | francesco.chemello2@unibo.it



Bibliografia

1. Ahn, A.H., and Kunkel, L.M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* 3, 283–291. 10.1038/ng0493-283.
2. Bladen, C.L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M.E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H., Lamont, L., Roy, A.J., Chamova, T., et al. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum. Mutat.* 36, 395–402. 10.1002/humu.22758.
3. Beggs, A.H., Hoffman, E.P., Snyder, J.R., Arahata, K., Specht, L., Shapiro, F., Angelini, C., Sugita, H., and Kunkel, L.M. (1991). Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 54–67.
4. Min, Y.-L., Chemello, F., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Zhang, Y., Bassel-Duby, R., et al. (2020). Correction of Three Prominent Mutations in Mouse and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy by Single-Cut Genome Editing. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 28, 2044–2055. 10.1016/j.ymthe.2020.05.024.
5. Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424. 10.1038/nature17946.
6. Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471. 10.1038/nature24644.
7. Chemello, F., Chai, A.C., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., Sanchez-Ortiz, E., Atmanli, A., Mireault, A.A., Liu, N., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2021). Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. *Sci. Adv.* 7, eabg4910. 10.1126/sciadv.abg4910.
8. Chai, A.C., Chemello, F., Li, H., Nishiyama, T., Chen, K., Zhang, Y., Sánchez-Ortiz, E., Alomar, A., Xu, L., Liu, N., et al. (2023). Single-swap editing for the correction of common Duchenne muscular dystrophy mutations. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 32, 522–535. 10.1016/j.omtn.2023.04.009.
9. Love, D.R., Hill, D.F., Dickson, G., Spurr, N.K., Byth, B.C., Marsden, R.F., Walsh, F.S., Edwards, Y.H., and Davies, K.E. (1989). An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55–58. 10.1038/339055a0.
10. Helliwell, T.R., Man, N.T., Morris, G.E., and Davies, K.E. (1992). The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscul. Disord. NMD* 2, 177–184. 10.1016/0960-8966(92)90004-p.
11. Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J.M., and Davies, K. (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat. Med.* 4, 1441–1444. 10.1038/4033.
12. Fisher, R., Tinsley, J.M., Phelps, S.R., Squire, S.E., Townsend, E.R., Martin, J.E., and Davies, K.E. (2001). Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord. NMD* 11, 713–721. 10.1016/s0960-8966(01)00220-6.
13. Basu, U., Lozynska, O., Moorwood, C., Patel, G., Wilton, S.D., and Khurana, T.S. (2011). Translational Regulation of Utrophin by miRNAs. *PLoS ONE* 6, e29376. 10.1371/journal.pone.0029376.