

TITOLO DEL PROGETTO:

**“LE MALATTIE NEUROMUSCOLARI DEL BOVINO COME MODELLO DI
MEDICINA TRANSLAZIONALE”**
**“BOVINE NEUROMUSCULAR DISEASES AS A MODEL FOR TRANSLATIONAL
RESEARCHES”**

Docente tutor: Prof. Arcangelo Gentile

Durata: 1 anno

DESCRIZIONE DEL PROGETTO

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI RIFERIMENTO: VET08
ERC DI RIFERIMENTO: MEDICAL SCIENCES – VETERINARY MEDICINE

MOTIVAZIONI DI PARTENZA

L'assegno di ricerca è inserito nel progetto: **BOVINE NEUROMUSCULAR DISEASES AS A MODEL FOR TRANSLATIONAL RESEARCHES** finanziato nell'ambito del PRIN: PROGETTI DI RICERCA DI RILEVANTE INTERESSE NAZIONALE – Bando 2022, codice CUP J53D23003300006.

Il gruppo di ricerca proponente (PRG) questo progetto lavora da quasi due decenni nello studio delle malattie neuromuscolari ereditarie dei bovini, avendo acquisito una significativa esperienza. Il PRG ha accertato la patogenesi e le varianti causative della pseudomiopia congenita bovina (PMT) correlata ad ATP2A1 e della canalopatia neuromuscolare congenita correlata a KCNG1. Per altre malattie neuromuscolari, in particolare la Paresi Spastica Bovina (BSP) e la Sindrome Spastica Bovina (BSS), la base genetica è ancora oscura.

Diverse malattie neuromuscolari nei bovini hanno una malattia corrispondente nella medicina umana (ad esempio PMT = Brody disease; BSP e BSS = Paraplegia Spastica Ereditaria Umana). Ciò rende il bovino un modello eccezionale per studi traslazionali.

CONTESTO DI PARTENZA

Punto di partenza del progetto sono i risultati ottenuti per la PMT dal gruppo di ricerca, soprattutto in relazione alla responsabilità del gene ATP2A1: il gene ATP2A1 genera una proteina SERCA1 corrotta nel corretto ripiegamento, prematuramente degradata dal sistema del proteasoma dell'ubiquitina, ma ancora attivo.

Questi risultati hanno spinto il gruppo di ricerca a concepire una nuova terapia farmacologica basata sulla capacità dei correttori CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) di prevenire lo smaltimento e preservare il livello di espressione di il SERCA1, ripristinando le proprietà funzionali del mutante SERCA.

SCOPO FINALE DEL PROGETTO

Lo scopo di questo progetto è lo studio delle malattie neuromuscolari ereditarie del bovino come modello privilegiato per il miglioramento e la comprensione di patologie umane comparabili, con conseguente proposta di nuovi approcci terapeutici.

SVILUPPO DEL PROGETTO

L'assegnista interverrà soprattutto nella parte del progetto dedicata alla individuazione e riconoscimento delle malattie neuromuscolari del bovino, studio del fenotipo, studio del genotipo, gestione dei pazienti, prelievo di materiale biologico, verifica della efficacia clinica delle terapie proposte.

Nello specifico, per ogni malattia che diventerà oggetto di studio, l'operatività dell'assegnista sarà suddivisa in macro aree:

A) STUDIO DEL FENOTIPO, finalizzato alla:

- caratterizzazione degli aspetti clinici;
- evidenziazione dei quadri diagnostico-collaterali ed anatomico-istopatologici caratterizzanti;
- approfondimento degli aspetti patogenetici.

A tal fine verranno quindi svolte: indagini cliniche e clinico/morfologiche; esami di diagnostica collaterale (biochimica clinica, ematologia, prelievo del liquido cerebrospinale, gas analisi, etc.); ricerca di antigeni ed anticorpi nei confronti di agenti biologici teratogeni per l'esclusione di questo tipo di eziologia; indagini di diagnostica per immagini (ecografia, RX, CT, MR, etc.) biopsie muscolari, approfondimenti anatomopatologici.

B) STUDIO DEL GENOTIPO, finalizzato alla:

- identificazione della mutazione causativa;
- predisposizione di un test genetico utile al riconoscimento degli animali portatori
- stima dell'impatto della malattia sulla popolazione bovina e sui processi di miglioramento genetico.

A tal fine verranno quindi svolte:

- a) indagini genealogiche per la conferma del sospetto di ereditarietà e per la individuazione del tipo di ereditarietà (recessivo, dominante, ex novo, etc.);
- b) indagini genomiche per la ricerca della mutazione causativa (tramite PCR e Sanger sequencing, Whole-genome sequencing (WGS), whole transcriptome sequencing (RNA-seq)).

In relazione allo studio genomico, particolare novità sarà l'approccio TRIO-WGS. Si tratta dell'estensione del WGS non solo sull'animale malato ma anche sui rispettivi genitori. Questo metodo porta la maggiore efficacia per l'identificazione di nuove varianti patogene candidate e può essere applicato a tutti i tipi di ereditarietà, non solo recessiva ma anche dominante (de novo o ereditata). Si tratta di un'approccio non scontato, perché fra le maggiori difficoltà dello studio di questo genere di malattie vi è il riconoscimento, con certezza totale, della paternità. L'esperienza insegna, infatti, che molte registrazioni delle fecondazioni artificiali, o la sicurezza del toro fecondatore in monta naturale con la presenza di più animali, risultano spesso alla preliminare verifica della paternità.

Particolare attenzione sarà dedicata alla Pseudomiopia congenita, alla Paresi Spastica ed alla Sindrome Spastica, malattie che troveranno poi approfondimento nelle altre azioni del progetto generale PRIN.

RISULTATO E RICADUTE FINALI

Il risultato delle attività dell'assegnista sarà l'individuazione e lo studio di nuove malattie potenzialmente utilizzabili in patologia comparata, il collezionamento di materiale per le ulteriori indagini del progetto PRIN, così come la verifica in vivo dell'efficacia delle eventuali terapie proposte dagli studi in vitro degli altri gruppi di ricerca,

TITLE OF THE PROJECT:

**“LE MALATTIE NEUROMUSCOLARI DEL BOVINO COME MODELLO DI
MEDICINA TRASLAZIONALE”**
**“BOVINE NEUROMUSCULAR DISEASES AS A MODEL FOR TRANSLATIONAL
RESEARCHES”**

Tutor: Prof. Arcangelo Gentile

Duration: 1 anno

DESCRIPTION OF THE PROJECT

DISCIPLINARY SCIENTIFIC AREA OF REFERENCE: VET08
ERC OF REFERENCE: MEDICAL SCIENCES – VETERINARY MEDICINE

REASONS FOR STARTING

The research cheque is part of the project: BOVINE NEUROMUSCULAR DISEASES AS A MODEL FOR TRANSLATIONAL RESEARCHES funded under the PRIN: RESEARCH PROJECTS OF RELEVANT NATIONAL INTEREST - Call for proposals 2022, CUP code J53D23003300006.

The research group proposing (PRG) this project has been working for almost two decades in the study of hereditary neuromuscular diseases in cattle, having gained significant experience. The PRG has ascertained the pathogenesis and causative variants of ATP2A1-related bovine congenital pseudomyotonia (PMT) and KCNG1-related congenital neuromuscular channelopathy. For other neuromuscular diseases, in particular Bovine Spastic Paresis (BSP) and Bovine Spastic Syndrome (BSS), the genetic basis is still obscure.

Several neuromuscular diseases in cattle have a corresponding disease in human medicine (e.g. PMT = Brody disease; BSP and BSS = Human Hereditary Spastic Paraplegia). This makes the bovine an exceptional model for translational studies.

STARTING POINT

The starting point of the project are the results obtained for PMT by the research team, especially in relation to the responsibility of the ATP2A1 gene: the ATP2A1 gene generates a SERCA1 protein that is corrupted in correct folding, prematurely degraded by the ubiquitin proteasome system, but still active.

These findings prompted the research team to devise a new drug therapy based on the ability of CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) correctors to prevent the disposal and preserve the expression level of SERCA1 by restoring the functional properties of the SERCA mutant.

ULTIMATE GOAL OF THE PROJECT

The aim of this project is to study hereditary neuromuscular diseases of cattle as a privileged model for the improvement and understanding of comparable human diseases, leading to the proposal of new therapeutic approaches.

PROJECT DEVELOPMENT

The assignee will be mainly involved in the part of the project dedicated to the identification and recognition of bovine neuromuscular diseases, phenotype study, genotype study, patient management, collection of biological material, verification of the clinical efficacy of the proposed therapies.

Specifically, for each disease that will be studied, the assignee's work will be divided into macro areas:

A) PHENOTYPE STUDY, aimed at:

- characterisation of clinical aspects;
- highlighting of the characterising diagnostic and anatomo-isto-pathological pictures;
- in-depth examination of pathogenetic aspects.

To this end, the following will be carried out: clinical and clinical/morphological investigations; collateral diagnostic examinations (clinical biochemistry, haematology, cerebrospinal fluid sampling, gas analysis, etc.); search for antigens and antibodies to teratogenic biological agents for the exclusion of this type of aetiology; diagnostic imaging investigations (ultrasound, X-ray, CT, MR, etc.) muscle biopsies, anatomopathological investigations.

B) STUDY OF THE GENOTYPE, aimed at:

- identification of the causative mutation;
- preparation of a genetic test useful for recognising carrier animals;
- estimation of the impact of the disease on the cattle population and genetic improvement processes.

To this end, the following will be carried out:

- a) genealogical investigations for confirmation of suspected heredity and identification of the type of inheritance (recessive, dominant, ex novo, etc.);
- b) genomic investigations to search for the causative mutation (by PCR and Sanger sequencing, Whole-genome sequencing (WGS), whole transcriptome sequencing (RNA-seq)).

In relation to the genomic study, a particular novelty will be the TRIO-WGS approach. This is the extension of WGS not only on the diseased animal but also on its parents. This method brings the greatest efficiency for the identification of new candidate pathogenic variants and can be applied to all types of inheritance, not only recessive but also dominant (de novo or inherited). This approach is not a foregone conclusion, because one of the greatest difficulties in studying this type of disease is the recognition, with total certainty, of paternity. Experience shows, in fact, that many records of artificial inseminations, or the safety of the fertilising bull in natural studs with the presence of several animals, often result in the preliminary verification of paternity.

Particular attention will be paid to Pseudomyotonia Congenita, Spastic Paresis and Spastic Syndrome, diseases that will be further investigated in the other actions of the overall PRIN project.

OUTCOME AND SPIN-OFFS

The outcome of the assignee's activities will be the identification and study of new diseases that can potentially be used in comparative pathology, the collection of material for further investigations of the PRIN project, as well as the in vivo verification of the effectiveness of any therapies proposed by the in vitro studies of the other research groups.