



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Titolo: Caratterizzazione Funzionale di PRR12 nella sindrome Neuro-Oculare attraverso un approccio multi-omico

Introduzione

La Neuro-Ocular Syndrome (NOC) è una malattia genetica recentemente identificata, caratterizzata da deficit del neurosviluppo e anomalie oculari di severità variabile [1][2]. Varianti patogenetiche del gene PRR12 sono state individuate come causa principale della sindrome, ma la funzione fisiologica di PRR12 durante lo sviluppo neuro-oculare rimane in gran parte sconosciuta [1][3]. Le evidenze disponibili mostrano che PRR12 è altamente espresso in neuroni cerebrali e oculari e che la proteina è localizzata nel nucleo, suggerendo un possibile ruolo nella regolazione trascrizionale e nell'interazione con la cromatina [1][2]. Il modello zebrafish rappresenta un sistema ideale per studiare processi neuro-oculari grazie alla trasparenza embrionale, all'elevata conservazione dei pathway di sviluppo e alla disponibilità di linee transgeniche fluorescenti specifiche per popolazioni neuronali e oculari [4][6]. Queste linee transgeniche permettono la visualizzazione in tempo reale delle strutture neurologiche e oculari durante lo sviluppo, facilitando studi di alto livello sulla morfogenesi cellulare e tissutale attraverso biosensori fluorescenti e fenotipi osservabili [5]. Inoltre, tecniche di genome editing permettono la generazione rapida di mutanti knock-in e knock-out per validare la funzione di geni candidati associati a malattie rare [7]. Alla luce di questi elementi, questo progetto mira a chiarire la funzione di PRR12 nel neurosviluppo e nella morfogenesi oculare mediante approcci genetici in zebrafish, con l'obiettivo finale di comprendere come le mutazioni identificate nei pazienti NOC alterino la biologia cellulare e tissutale.

Bibliografia

- [1] Yang JW, Song QY, Zhang MX, Ai JL, Wang F, Kan GH, Wu B, Zhu SQ. Spaceflight-associated neuro-ocular syndrome: a review of potential pathogenesis and intervention. *Int J Ophthalmol*. 2022 Feb 18;15(2):336-341. doi: 10.18240/ijo.2022.02.21.
- [2] Reis, L. M., Costakos, D., Wheeler, P. G., Bardakjian, T., Schneider, A., Fung, S. S. M., University of Washington Center for Mendelian Genomics, & Semina, E. V. (2021). Dominant variants in PRR12 result in unilateral or bilateral complex microphthalmia. *Clinical genetics*, 99(3), 437–442. <https://doi.org/10.1111/cge.13897>
- [3] Lai, J., et al. (2024). Case report: Identification of a novel PRR12 variant in a Chinese boy with developmental delay and short stature. **Frontiers in Pediatrics**, *12*, 1367131. <https://doi.org/10.3389/fped.2024.1367131>
- [4] Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, *8*(5), 353-367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
- [5] Tesoriero, C., Greco, F., Cannone, E., Ghirotto, F., Facchinello, N., Schiavone, M., & Vettori, A. (2023). Modeling Human Muscular Dystrophies in Zebrafish: Mutant Lines, Transgenic Fluorescent Biosensors, and Phenotyping Assays. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8314. <https://doi.org/10.3390/ijms24098314>



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

- [6] Genet, M. C., et al. (2024). Shedding a light on dark genes: A comparative expression study of PRR12 orthologues during zebrafish development. **Genes**, **15**(4), 492. <https://doi.org/10.3390/genes15040492>
- [7] Hwang, W. Y., et al. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, **31**(3), 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>

Piano esecutivo e di formazione borsa #1:

Generazione di linee *prr12* knock-in. In una prima linea di lavoro verrà generata una mutazione *knock-in* di *prr12* che riproduce una variante identificata nei pazienti NOC. Dopo l'identificazione dell'ortologo zebrafish e della regione conservata da modificare, saranno progettati sgRNA e ssODN contenenti la mutazione da introdurre. Il complesso Cas9/sgrNA e il donore verranno microiniettati in embrioni allo stadio di una cellula, e i fondatori mosaico F0 saranno selezionati tramite PCR e sequenziamento. Gli animali positivi saranno quindi incrociati per ottenere una linea stabile F1/F2 portatrice dell'allele KI. La caratterizzazione preliminare includerà l'analisi del fenotipo neuro-oculare, della morfologia dell'occhio e del comportamento larvale di base, integrati da saggi cellulari (proliferazione e apoptosi) utili a identificare alterazioni precoci dello sviluppo. L'attività sarà seguita attraverso incontri periodici con il team di ricerca per monitorare i progressi, discutere difficoltà e favorire la crescita scientifica e professionale.

Piano esecutivo e di formazione borsa # 2:

Caratterizzazione funzionale *prr12* knock-out (sintetico). La seconda linea di lavoro prevede lo studio di una linea *knock-out* di *prr12* per comprendere gli effetti della perdita completa del gene. Dopo la conferma del KO mediante RT-PCR e, se possibile, Western blot, verranno valutati i principali geni coinvolti nello sviluppo neuro-oculare. La caratterizzazione morfologica verrà realizzata incrociando i mutanti con linee transgeniche fluorescenti che marcano specifiche popolazioni neuronali e oculari, permettendo analisi confocali ad alta risoluzione delle strutture retiniche e del sistema nervoso. Infine, le conseguenze funzionali del KO saranno valutate tramite l'analisi della locomotor activity larvale, un indicatore globale della funzionalità neuro-sensoriale e motoria. L'attività sarà seguita attraverso incontri periodici con il team di ricerca per monitorare i progressi, discutere difficoltà e favorire la crescita scientifica e professionale.



Title: Functional Characterization of PRR12 in Neuro-Ocular Syndrome through a Multi-Omic Approach

Introduction

Neuro-Ocular Syndrome (NOC) is a recently identified genetic condition characterized by neurodevelopmental deficits and ocular abnormalities of variable severity [1][2]. Pathogenic variants in the PRR12 gene have been recognized as a principal cause of this syndrome, yet the physiological role of PRR12 during neuro-ocular development remains largely unknown [1][3]. Current evidence indicates that PRR12 is highly expressed in brain and ocular neurons and that the protein localizes to the nucleus, suggesting a potential role in transcriptional regulation and chromatin interaction [1][2]. The zebrafish represents an ideal model for studying neuro-ocular disorders due to its embryonic transparency, strong conservation of developmental pathways, and the availability of numerous fluorescent transgenic lines that allow real-time visualization of neuronal and ocular structures [4][6][7]. These tools, combined with advanced genome-editing techniques such as CRISPR/Cas9, enable rapid generation of knock-in and knock-out models for functional validation of genes implicated in rare diseases [7]. This project aims to elucidate the role of PRR12 in neurodevelopment and ocular morphogenesis using zebrafish, with the ultimate goal of understanding how PRR12 variants identified in NOC patients affect cellular and tissue-level biology.

Bibliography

- [1] Yang JW, Song QY, Zhang MX, Ai JL, Wang F, Kan GH, Wu B, Zhu SQ. Spaceflight-associated neuro-ocular syndrome: a review of potential pathogenesis and intervention. *Int J Ophthalmol*. 2022 Feb 18;15(2):336-341. doi: 10.18240/ijo.2022.02.21.
- [2] Reis, L. M., Costakos, D., Wheeler, P. G., Bardakjian, T., Schneider, A., Fung, S. S. M., University of Washington Center for Mendelian Genomics, & Semina, E. V. (2021). Dominant variants in PRR12 result in unilateral or bilateral complex microphthalmia. *Clinical genetics*, 99(3), 437–442. <https://doi.org/10.1111/cge.13897>
- [3] Lai, J., et al. (2024). Case report: Identification of a novel PRR12 variant in a Chinese boy with developmental delay and short stature. **Frontiers in Pediatrics**, *12*, 1367131. <https://doi.org/10.3389/fped.2024.1367131>
- [4] Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, *8*(5), 353-367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
- [5] Tesoriero, C., Greco, F., Cannone, E., Ghirotto, F., Facchinello, N., Schiavone, M., & Vettori, A. (2023). Modeling Human Muscular Dystrophies in Zebrafish: Mutant Lines, Transgenic Fluorescent Biosensors, and Phenotyping Assays. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8314. <https://doi.org/10.3390/ijms24098314>
- [6] Genet, M. C., et al. (2024). Shedding a light on dark genes: A comparative expression study of PRR12 orthologues during zebrafish development. **Genes**, *15*(4), 492. <https://doi.org/10.3390/genes15040492>
- [7] Hwang, W. Y., et al. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, *31*(3), 227-229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Executive and Training Plan of fellowship #1:

Generation of the prr12 Knock-In zebrafish line. The first research line will focus on generating a prr12 knock-in mutation that reproduces a pathogenic variant observed in NOC patients. After identifying the zebrafish ortholog and the conserved region to modify, sgRNAs and a donor ssODN carrying the desired mutation will be designed. The Cas9/sgRNA complex and donor will be microinjected into one-cell embryos, and mosaic F0 founders will be screened via PCR and sequencing. Positive individuals will be crossed to establish a stable F1/F2 line carrying the knock-in allele. Preliminary characterization will assess neuro-ocular morphology, eye development, and basic larval behavioral features, complemented by cellular assays such as proliferation and apoptosis to identify early developmental alterations. The activity will be monitored through regular meetings with the research team to track progress, address challenges, and support scientific and professional growth.

Executive and Training Plan of fellowship #2:

Functional Characterization of the prr12 Knock-Out zebrafish line. The second research line involves an in-depth analysis of a prr12 knock-out line to determine the biological consequences of complete loss of gene function. Initial validation will include confirmation of transcript reduction or absence using RT-PCR and, when feasible, evaluation of PRR12 protein absence by Western blot. Neuro-ocular developmental impact will be examined by analyzing expression of key regulatory genes. Morphological characterization will be enhanced by crossing the knock-out line with fluorescent transgenic zebrafish marking neuronal and ocular tissues, enabling high-resolution confocal imaging of retinal and neural structures. Functional consequences of PRR12 loss will be evaluated through larval locomotor activity assays, a general indicator of neuro-sensory and motor system performance. The activity will be monitored through regular meetings with the research team to track progress, discuss potential difficulties, and promote scientific and professional development.