

## **Progetto Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna**

### **“Identificazione di sistemi innovativi di trasferimento del complesso enzimatico crispr/cas9 per la terapia genica in distrofie muscolari”**

Responsabile del progetto: Giovanna Lattanzi - CNR Istituto di Genetica Molecolare” Luigi Luca Cavalli-Sforza”, Bologna Collaboratori: Dr. Caterina Cinti, Dr. Greta Varchi - CNR Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività, Bologna Prof. Alessandra Recchia - Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

#### **Relazione finale**

#### **INTRODUZIONE**

Il finanziamento ottenuto dalla Fondazione del Monte di Bologna e Ravenna ci ha permesso di conferire un assegno di ricerca a un giovane ricercatore per portare avanti di un progetto scientifico in collaborazione tra Istituto di Genetica Molecolare del CNR di Bologna; Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività del CNR di Bologna e Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia. Il Progetto è stato cofinanziato dalle associazioni AIDMED e Alessandra Proietti per lo studio della distrofia muscolare di Emery-Dreifuss.

**La ricerca si proponeva di mettere a punto un sistema di correzione del difetto genico basato sulla tecnologia CRISPR/Cas9 in distrofie muscolari causate da mutazione del gene LMNA e di studiare diversi sistemi di trasferimento del complesso enzimatico CRISPR/Cas9 in cellule umane e in modelli animali per identificare il miglior veicolo da utilizzarsi nella terapia genica delle distrofie muscolari.** La tecnica che utilizza CRISPR/Cas9 è il più innovativo e preciso sistema di correzione genica attualmente disponibile. Si tratta in pratica di un complesso molecolare costituito da una proteina in grado di aprire e tagliare specifiche sequenze di DNA indicate da un RNA guida ad essa associato. Disegnando opportunamente la sequenza dell'RNA guida, è possibile rimuovere la sequenza di interesse. Il sistema è applicabile a molte mutazioni patogenetiche. Scopo della nostra ricerca è stato applicarlo a mutazioni del gene *LMNA* in cellule da pazienti affetti da Distrofia muscolare di Emery- Dreifuss di tipo 2 (EDMD2). Abbiamo inoltre corretto mutazioni del gene *EMD* in cellule da pazienti con la forma X-linked della Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD1).

Obiettivo principale del progetto era identificare la tecnica ottimale per il trasferimento (delivery) di CRISPR/Cas9. La tecnica utilizzata per la proof of principle del nostro studio è stata basata su vettori virali, in particolare lentivirus. Abbiamo inoltre sperimentato l'utilizzo di vettori non virali quali globuli rossi ingegnerizzati associate a particelle magnetiche e abbiamo iniziato la sperimentazione di vescicole extracellulari prodotte da cellule (esosomi).

#### **METODI UTILIZZATI**

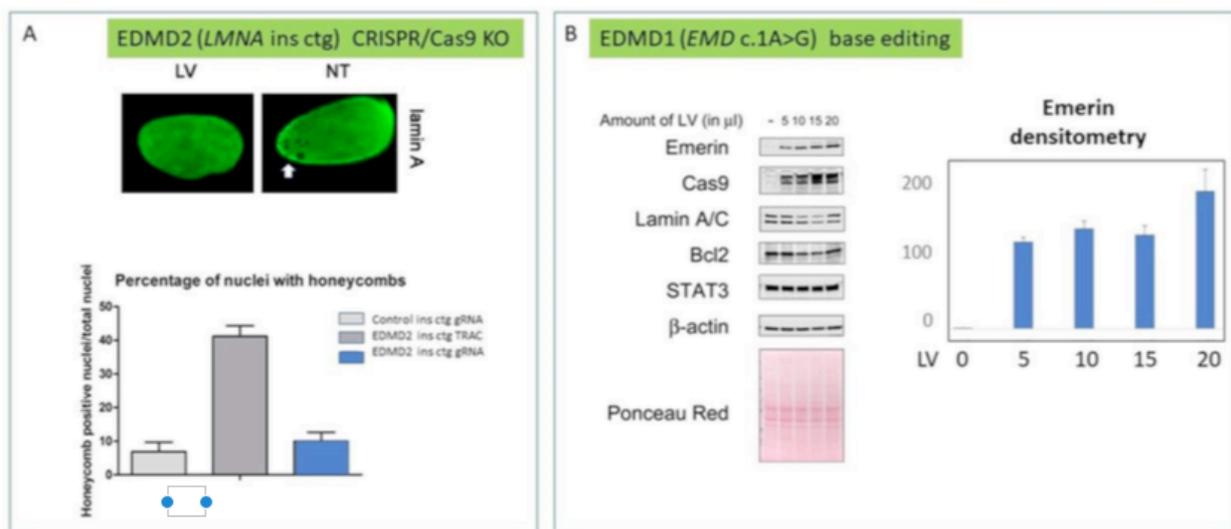
1. Preparazione dei costrutti CRISPR/Cas9 e gRNA plasmidici specifici per la mutazione *LMNA* c.1580 C>G (p.R527P) e per la mutazione *LMNA* c.103\_104 ins CTG per la correzione di cellule EDMD2 da pazienti.
2. Preparazione dei costrutti CRISPR/Cas9 e gRNA plasmidici specifici per la mutazione *EMD* c.1 A>G (non senso) per la correzione di cellule EDMD1 da paziente.
3. Preparazione di vettori virali e ribonucleoparticelle (RNP) per il trasferimento del complesso CRISPR/Cas9 ingegnerizzato.
4. Preparazione di globuli rossi ingegnerizzati veicolanti il complesso CRISPR/Cas9 ingegnerizzato.
5. Trasferimento di complessi CRISPR/Cas9 associati a una proteina fluorescente (GFP) in cellule HEK293 per la valutazione dell'efficienza di trasferimento in un sistema sperimentale umano facilmente modificabile.

6. Trasferimento dei complessi CRISPR/Cas9 ingegnerizzati in cellule EDMD2 mediante vettori virali (lentivirus) e ribonucleoparticelle.
7. Trasferimento dei complessi CRISPR/Cas9 ingegnerizzati in cellule EDMD1 mediante vettori virali (lentivirus) e ribonucleoparticelle.
8. Trasferimento dei complessi CRISPR/Cas9 ingegnerizzati in cellule EDMD1 mediante globuli rossi ingegnerizzati.
9. Trasferimento dei complessi CRISPR/Cas9 ingegnerizzati in cellule EDMD1 mediante terreni contenenti esosomi.
10. Misurazione dell'efficienza e della specificità di editing a carico delle mutazioni bersaglio mediante sequenziamento Sanger del DNA delle cellule corrette.
11. Misurazione dell'efficacia della correzione genica in cellule EDMD2 mediante analisi del numero di nuclei portatori di difetti associati alla patologia (strutture honeycomb).
12. Misurazione dell'efficacia della correzione genica in cellule EDMD1 mediante analisi del numero di nuclei esprimenti emerina, la proteina mancante nella EDMD1, e del numero di nuclei con strutture honeycomb.
13. Valutazione dell'efficacia funzionale della correzione genica in cellule EDMD2 ed EDMD1 mediante analisi del complesso proteico LINC deficitario nelle cellule dei pazienti. È stata valutata l'espressione delle proteine LINC, sono state inoltre analizzate le interazioni molecolari delle proteine mediante tecnologia PLA (proximity ligation assay).

## RISULTATI

### *Generazione di complessi enzimatici specifici molto efficienti per mutazioni LMNA ed EMD*

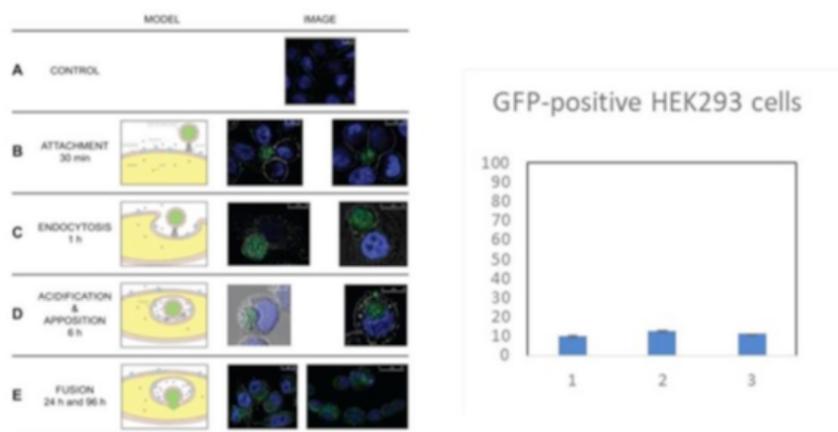
È stato generato un gRNA specifico per ciascuna delle mutazioni EDMD2 ed EDMD1 elencate nel paragrafo precedente. I quattro gRNA generati sono stati separatamente combinati con la proteina Cas9 generando due tipi di RNP, o clonati separatamente all'interno di plasmidi di espressione per Cas9 generando così 2 plasmidi effettori. Il plasmide di controllo esprimeva solo Cas9 senza alcun gRNA. I plasmidi effettori circolarmente chiusi o linearizzati e i due tipi di RNP sono stati introdotti/trasfettati in vitro in fibroblasti di paziente EDMD2 mediante nucleofezione con lo strumento Nucleofector (AMAXA). La scarsa efficienza di trasferimento ci ha indotto ad utilizzare lentivirus per il trasferimento di tutti i complessi enzimatici allo scopo di valutare l'efficacia e la correttezza della modificazione dei geni bersaglio (*LMNA* ed *EMD*). In questo modo abbiamo ottenuto alte efficienze di trasferimento come indicato in Figura 1.



**Figura 2.** (A) Nuclei di cellule EDMD2 sottoposte a correzione genica (LV) mediante CRISPR/Cas9 per l'eliminazione dell'allele *LMNA* mutato (ins ctg) o prima del trattamento (NT). Le cellule NT presentano nuclei con strutture honeycomb (freccia). Le percentuali di nuclei con strutture honeycomb (grafico in (A)) sono indice del grado di correzione del gene *LMNA*. (B) Analisi in Western blot di cellule EDMD1 non trattate (NT) o sottoposte a correzione mediante base editing per il ripristino dell'adenina in posizione 1 del gene *EMD*. Sono state rilevate anche la proteina Cas9 (nucleasi) e altre proteine indice della funzionalità cellulare. Actina e rosso ponceau sono i controlli di carica proteica. Il grafico mostra la densitometria delle bande di emerina.

### *Preparazione di globuli rossi ingegnerizzati veicolanti plasmidi esperimenti CRISPR/Cas9*

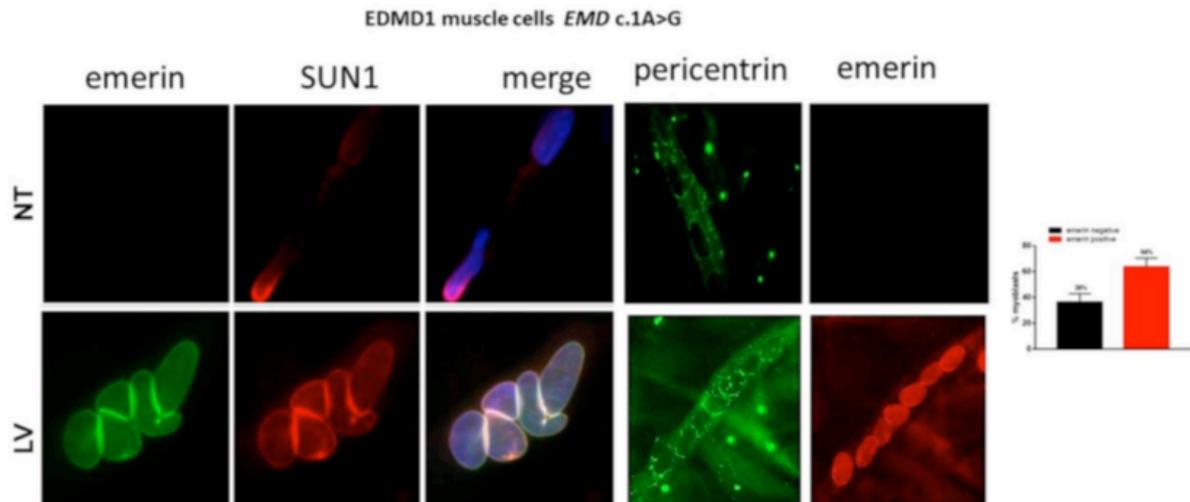
Le formulazioni/plasmidi effettori efficaci sono stati forniti ai collaboratori del CNR per generare micro- nano-formulazioni con i sistemi di veicolazione oggetto di studio da trasferire in vitro nei fibroblasti di paziente EDMD2 ed EDMD1. Abbiamo inserito plasmidi contenenti la sequenza per CRISPR/Cas9 coniugata alla proteina fluorescente GFP in globuli rossi ingegnerizzati. I risultati dell'osservazione in microscopia a fluorescenza sono riportati nella figura 2 e indicano un'efficienza di espressione del complesso CRISPR/Cas9 del 10%, non soddisfacente per l'utilizzo del sistema come veicolo in cellule di paziente. In cellule HEK293 o in fibroblasti controllo trattati con i globuli rossi ingegnerizzati, non abbiamo osservato infatti segnali fluorescenti da GFP.



**Figura 2.** (A-E) Schema del metodo di trasferimento basato su eritrociti ingegnerizzati (Cinti et al., 2011). Nel grafico a destra è rappresentata l'efficienza di trasferimento del complesso CRISPR/Cas9-GFP in cellule HEK293. I dati sono riportati in percentuale e sono state osservate 200 cellule in tre esperimenti indipendenti (1-3).

### *Trasferimento dei complessi CRISPR in fibroblasti e mioblasti EDMD2 ed EDMD1*

I sistemi di trasferimento lentivirali sono risultati altamente efficaci nel correggere mutazioni nei geni *LMNA* ed *EMD* sia in fibroblasti che in mioblasti da pazienti. In particolare, l'efficienza di correzione nei mioblasti EDMD1 è stata tale (in media il 60% delle cellule muscolari in coltura) da consentirci di valutare il recupero di alcuni fenotipi cellulari descritti in precedenza e associati alla patologia (Mattioli et al 2011; Meinke et al 2014). La Figura 3 mostra il recupero della localizzazione di due proteine, SUN1 e pericentrina in cellule muscolari di un paziente EDMD1. Queste proteine sono alterate sia in EDMD2 che in EDMD1. SUN1 è un componente del complesso LINC sulla membrana nucleare, la pericentrina è una proteina del centrosoma. SUN1 e pericentrina svolgono un ruolo fondamentale nel posizionamento dei nuclei nelle cellule muscolari in formazione (miotubi). La figura 3 mostra i difetti di ancoraggio di entrambe le proteine alla periferia nucleare in nuclei di miotubi EDMD1 e il recupero della corretta localizzazione in cellule che esprimono emerina grazie al base editing.



**Figura 3.** Miotubi EDMD1 con mutazione *EMD c.1A>G* non trattati (NT) o sottoposti a base editing (LV). Nei miotubi EDMD1 NT, SUN1, una proteina della membrana nucleare, è assente da quasi tutto il perimetro dei nuclei (marcati in blu con DAPI), mentre è ben distribuito nei nuclei che esprimono emerina dopo base editing. Anche la pericentrina (pericentrin) è assente in porzioni dei nuclei EDMD1, mentre è uniformemente distribuita nei miotubi corretti. Il grafico indica la percentuale di miotubi EDMD1 esprimenti emerina ed è la media di tre esperimenti con deviazione standard.

## CONCLUSIONI

I sistemi di correzione genica basati su CRISPR/Cas9 o base editing si sono rivelati molto efficienti nel correggere i difetti molecolari associati alle EDMD1 ed EDMD2. Siamo riusciti ad ottenere percentuali di correzione del 60% in media nei mioblasti e nei miotubi e fino al 90% in fibroblasti cutanei da pazienti. Il sistema di trasferimento enzimatico più efficiente è tuttora quello basato su vettori virali, ma stiamo lavorando per mettere a punto sistemi alternativi basati su esosomi prodotti dalle cellule dei pazienti. Stiamo inoltre valutando sistemi di trasferimento basati su liponanoparticelle. Nel corso del 2022, è stato pubblicato il primo caso di utilizzo di esosomi per il trasporto del sistema CRISPR/Cas9 in vivo in patologie epatiche. I nostri studi qui riportati possono rappresentare un punto di partenza per l'ottimizzazione dei trattamenti di correzione genica in vista di applicazioni terapeutiche.

I dati ottenuti sono in corso di pubblicazione in due articoli scientifici che sottometeremo a breve alla rivista *Cells* (IF 7.66).

Il Dr. Vizzoca che ha usufruito dell'assegno di ricerca grazie al quale ha lavorato in questo progetto, è attualmente un ricercatore a contratto dell'IIT di Genova.

Bologna, 31 ottobre 2022

In fede

Giovanna Lattanzi

Dirigente di Ricerca

CNR Istituto di Genetica Molecolare

Responsabile del Progetto