



Titolo del Progetto “Correzione dell’aploinsufficienza nell’anemia di Diamond Blackfan tramite l’utilizzo di molecole SINEUP”

Responsabile del progetto:

Anna Aspesi

Dipartimento di Scienze della Salute,
Università del Piemonte Orientale,
Via Solaroli 17, 28100 Novara

RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE

L’Anemia di Diamond Blackfan (DBA) è una rara aplasia eritroide causata da mutazioni in eterozigosi nei geni che codificano per le proteine ribosomali (RP) [1]. In questi pazienti, solo la RP prodotta a partire dalla copia del gene sano è funzionale, ma non è sufficiente a garantire le funzioni cellulari, un fenomeno chiamato aploinsufficienza. Il deficit di una RP impedisce la corretta maturazione dell’RNA ribosomiale (rRNA) e la biogenesi dei ribosomi inducendo una condizione di sofferenza cellulare chiamata stress ribosomiale, caratterizzata dall’aumento dei livelli della proteina p53, che porta a blocco della proliferazione e apoptosi [2].

L’obiettivo del progetto era di correggere l’aploinsufficienza osservata nella DBA aumentando il livello della RP deficitaria.

Come modello di studio abbiamo usato linee cellulari linfoblastoidi (LCL) derivate da linfociti di pazienti con DBA o di soggetti sani. Le LCL dei pazienti DBA avevano mutazioni nei geni *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* o *RPL35A*, e rispetto alle LCL dei controlli sani mostravano ridotto tasso di crescita, aumento della mortalità per apoptosi, riduzione della sintesi proteica e aumento dei livelli di p53 e del suo bersaglio trascrizionale p21.

L’utilizzo della tecnologia SINEUP, cioè di molecole in grado di aumentare la traduzione di un trascritto specifico, non si è dimostrata sufficiente a correggere il fenotipo patologico dovuto al deficit di RP. Questo può essere plausibilmente spiegato da particolari caratteristiche del trascritto

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235**



delle RP, come la presenza di una sequenza TOP (*terminal oligopyrimidine tract*), che potrebbero sfavorire l'interazione tra il trascritto e le molecole SINEUP.

Abbiamo quindi proseguito i nostri studi perseguendo una strategia alternativa per correggere il deficit di RP, e cioè attuando una terapia genica con il cDNA di *RPS19*, che è stato clonato in un vettore lentivirale e utilizzato per trasdurre tre LCL di controllo e tre LCL con mutazioni in *RPS19*. L'espressione del transgene ha permesso la correzione del difetto di proliferazione e maturazione dei pre-rRNA e dello stress ribosomiale. Anche la terapia genica attuata con cDNA di *RPL5* in LCL con mutazioni in *RPL5* ha permesso una correzione del fenotipo patologico, che però in questo caso è stata solo parziale. L'overespressione di *RPL5* ha provocato effetti deleteri sulle LCL di controllo, riducendo la sintesi proteica generale e inducendo l'aumento di p53 e p21, probabilmente a causa della capacità di *RPL5* di legare MDM2 inducendo la stabilizzazione di p53. Questi risultati suggeriscono che mentre il trasferimento genico di *RPS19* ha permesso la correzione del fenotipo patologico nei pazienti con mutazioni in *RPS19* senza provocare effetti avversi sulle cellule di controllo, il trasferimento del transgene *RPL5* deve essere attentamente dosato per consentire che la sua espressione sia sufficiente alle funzioni cellulari, ma non eccessiva.

Abbiamo pensato di sfruttare i risultati ottenuti con gli esperimenti di terapia genica su cellule con deficit di *RPS19* per realizzare un test funzionale che permettesse di valutare la patogenicità di varianti missenso e piccole inserzioni o delezioni in frame nel gene *RPS19*. Questo test può essere utilizzato quando in un paziente DBA viene riscontrata una mutazione di significato incerto (*variant of unknown significance*, VUS) cioè una variante di sequenza di cui non si conoscono gli effetti perché le conseguenze a livello della sequenza proteica sono minime (ad esempio la variazione di un solo aminoacido). Questa mutazione potrebbe effettivamente essere la causa della DBA, oppure potrebbe essere una variante benigna che non provoca effetti dannosi; in quest'ultimo caso la mutazione causativa della DBA sarà da ricercare in altri geni RP. La corretta classificazione delle VUS è essenziale per una consulenza genetica efficace ed è particolarmente importante quando si cerca di identificare tra i familiari del paziente un donatore adatto per il trapianto di cellule ematopoietiche.

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235**



Il test si basa sull'utilizzo di LCL ottenute da linfociti di pazienti affetti da DBA con mutazioni inattivanti di RPS19. Il trasferimento di un transgene che porta la mutazione può condurre a due diverse situazioni: se la variante è benigna, il fenotipo DBA verrà corretto completamente, come accade utilizzando il transgene wild type; se invece la variante è deleteria, non si verificherà la correzione del fenotipo patologico.

Sono state valutate 8 VUS identificate in pazienti DBA e 2 polimorfismi rari che causano sostituzioni missenso riportati nei database genomici di popolazione. Dopo mutagenesi sito-specifica del cDNA di RPS19 sono stati prodotti dei vettori lentivirali in modo da esprimere le RP mutate in due LCL con deficit di RPS19 e in una LCL di controllo. I vettori contenevano una cassetta bidirezionale per l'espressione contemporanea del transgene e del gene reporter GFP, che promuove l'emissione di fluorescenza verde. Le cellule positive per la GFP sono state quindi sortate e analizzate. Il processamento dei pre-rRNA è stato valutato tramite Northern Blot e l'espressione del trascritto di p21 tramite RT-PCR quantitativa. Nessuna delle VUS testate è risultata capace di correggere il fenotipo patologico delle cellule deficitarie per RPS19, con l'eccezione della variante p.Arg94Leu, la quale non mostrava una differenza statisticamente significativa con RPS19 wild type e dovrebbe quindi essere considerata non patologica. È interessante notare che anche le due varianti selezionate dai database di popolazione non erano in grado di correggere il fenotipo patologico delle LCL DBA, suggerendo che possano compromettere, almeno in parte, la funzionalità della proteina. Questa osservazione evidenzia la necessità di studi approfonditi per rilevare la presenza di portatori asintomatici di mutazioni nei geni RP nella popolazione generale.

Infine, abbiamo studiato il fenotipo di due LCL con mutazioni inattivanti in RPS26, confrontandole con LCL da controlli sani. Le LCL con deficit di RPS26 mostrano una crescita cellulare più lenta e l'aumento dell'espressione del trascritto di p21. Su queste cellule abbiamo attuato una strategia di terapia genica simile a quella utilizzata per RPS19; gli esperimenti sono in corso.

Bibliografia

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235**



1. Li H, Lodish HF, Sieff CA. Critical Issues in Diamond-Blackfan Anemia and Prospects for Novel Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018; 32:701-712.
2. Ellis SR. Nucleolar stress in Diamond Blackfan anemia pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842:765-8.

Pubblicazioni

I risultati ottenuti sono stati riportati nelle seguenti pubblicazioni:

- Aspesi A, Monteleone V, Betti M, Actis C, Morleo G, Sculco M, Guarrera S, Wlodarski MW, Ramenghi U, Santoro C, Ellis SR, Loreni F, Follenzi A, Dianzani I. Lymphoblastoid cell lines from Diamond Blackfan anaemia patients exhibit a full ribosomal stress phenotype that is rescued by gene therapy. *Scientific Reports*, 2017, 7:12010.
- Aspesi A, Betti M, Sculco M, Actis C, Olgasi C, Wlodarski MW, Vlachos A, Lipton JM, Ramenghi U, Santoro C, Follenzi A, Ellis SR, Dianzani I. A functional assay for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance in Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutation*, 2018, 39:1102-1111.

Inoltre, lo studio della letteratura scientifica sulla terapia genica e altre possibili terapie per la DBA, ha portato alla pubblicazione della seguente review:

- Aspesi A, Borsotti C, Follenzi A. Emerging Therapeutic Approaches for Diamond Blackfan Anemia. *Current Gene Therapy* 2018, 18:327-335.

Spett.le

**Via Pindemonte 15 37126 Verona
C.F./P.IVA 04373320235**