



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2021  
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente: Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza

Codice fiscale: 00138660717

Sede legale: Viale Cappuccini, 71013 San Giovanni Rotondo

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: segreteria.scientifica@operapadrepio.it

Dati del rappresentante legale: Michele Giuliani

**Titolo del progetto:** Riprogrammazione cellulare quale strumento per l'identificazione di target terapeutici e per lo sviluppo di terapie cellulari delle malattie genetiche rare

**Abstract dei risultati ottenuti:**

Nell’ambito del progetto nel periodo 2021 le principali attività svolte sono state: i) bancaggio di linee di 24 linee di fibroblasti provenienti da biopsie cutanee; ii) produzione di 9 linee di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) ottenute da fibroblasti cutanei di pazienti affetti da varie malattie genetiche e 1 linea di iPSC ottenuta dalle cellule mononucleate del sangue da un donatore sano; iii) differenziamento in motoneuroni delle linee di iPS ottenute da pazienti SLA; iv) utilizzo di molecole, già utilizzate come farmaci in vari tipi di malattie, sui fibroblasti ottenuti da pazienti affetti da Huntington. v) caratterizzazione del metabolismo dei fibroblasti ottenuti da pazienti affetti da SLA portatori di due mutazioni diverse nel gene SOD1. vi) produzione di una libreria di lentivirus esprimenti i geni del SARS-COV2.

i) Grazie alla collaborazione tra il nostro IRCCS, il Campus Biomedico di Roma e l’Ospedale dei Bambini V. Buzzi, abbiamo ottenuto 12 biopsie cutanee: 6 provenienti da pazienti affetti da Parkinson idiopatico, 1 da SCA1, 1 da una paziente affetta da leucodistrofia (HLD7) e 2 da soggetti sani appartenente alla stessa famiglia, portatori della mutazione in eterozigosi e non affetti dalla malattia, 2 donatori sani. Tramite la collaborazione con la Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta abbiamo ottenuto 12 biopsie cutanee, 6 da pazienti affetti da Smith-Magenis e 6 appartenenti ai genitori non portatori di mutazione. Tramite la collaborazione con la Fondazione IRCCS Policlinico Gemelli abbiamo ottenuto 2 biopsie cutanee da pazienti affetti da Smith-Magenis.

ii) Abbiamo riprogrammato due linee di fibroblasti con mutazione causante la mucopolisaccaridosi, uno con fenotipo grave e uno intermedio; una linea avente una delezione del cromosoma 17 con aploinsufficienza di 73 geni e causante la sindrome di Smith-Magenis, una linea di fibroblasti con una mutazione in eterozigosi nel gene GBA che causa il Parkinson, una linea con mutazione nel gene FUS proveniente da un paziente affetto da SLA, una linea di fibroblasti avente una mutazione composta che provoca la HDL7 (leucodistrofia ipomielinizzante) nel gene POLR3A e una linea che possiede una mutazione nel gene POLR3A in eterozigosi, due linee di fibroblasti provenienti da pazienti affetti da Charcot Marie Tooth di tipo 4 e di tipo 2. La completa caratterizzazione delle linee di iPS è stata eseguita con tutti i controlli di qualità necessari per poter registrare la linea nella Banca Europea delle iPS (hPSCReg). Sono stati fatti controlli di tipo genetico per dimostrare che l'identità delle iPSC fosse uguale a quella dei fibroblasti, di tipo citogenetico per dimostrare che non ci fossero anomalie cromosomiche generate in seguito alla riprogrammazione, analisi molecolari e di fluorescenza per dimostrare l'espressione dei geni della staminalità e la perdita di espressione dei geni utilizzati nella riprogrammazione. Abbiamo prodotto la prima linea di iPSC usando come cellule di partenza le cellule del sangue. Le cellule mononucleate sono state nucleofettate dopo due settimane di amplificazione usando il programma DS150 (dopo ottimizzazione). Le cellule sono state mantenute nel terreno di crescita per due giorni dopo la trasfezione e poi trasferite nel terreno di crescita delle iPSC. I cloni che si sono formati sono stati piccati e amplificati per la caratterizzazione completa.

iii) Grazie ad una collaborazione con l'Università di Palermo, che ci ha messo a disposizione le cellule di pazienti SLA da cui abbiamo ottenuto le linee di iPS, abbiamo differenziato le cellule staminali pluripotenti indotte in motoneuroni. Il differenziamento è avvenuto ingegnerizzando le cellule con un piggybac esprimente due fattori di trascrizione implicati nel differenziamento dei motoneuroni. Dopo la nucleofezione delle iPS, abbiamo selezionato le cellule esprimenti i fattori di trascrizione per mezzo di un antibiotico. Dopo la selezione, le cellule iPS sono state amplificate e differenziate tramite l'aggiunta di specifici fattori di crescita. Abbiamo quindi congelato le fasi intermedie di differenziamento e abbiamo cominciato a caratterizzare il comportamento dei motoneuroni in risposta a stimoli che provocano stress.

iv) In collaborazione con l'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari del CNR, abbiamo pubblicato un lavoro in cui volevamo capire in che modo l'uso di alcune molecole, presenti tra i farmaci approvati dal FDA per l'uso sull'uomo, potesse influenzare il comportamento cellulare dei fibroblasti provenienti da pazienti Huntington. Queste molecole sono state selezionate in base alla loro capacità di associarsi al recettore Sigma1, un recettore del reticolo endoplasmatico la cui deregolazione è associata alla malattia di Huntington e ad altre malattie neurodegenerative. Abbiamo utilizzato tre linee di fibroblasti Huntington con un numero di espansioni di triplette nel gene Htt pari a 43, 64 e 85 ripetizioni, per studiare il comportamento dei farmaci selezionati rispetto alla pridopidina, farmaco usato nel trial clinico di fase I sui malati di Huntington. I risultati sono stati interessanti: sono state selezionate molecole con gli stessi effetti della pridopidina o addirittura con effetti migliori. Alcune di queste molecole miglioravano significativamente la capacità proliferativa dei fibroblasti, riducendo significativamente la morte cellulare.

v) In collaborazione con l'Università Bicocca di Milano abbiamo studiato il metabolismo di due linee di fibroblasti ottenute da pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) con due mutazioni diverse nel gene SOD1, SOD1<sup>S135N</sup> and SOD1<sup>L145F</sup>. A partire dall'osservazione che le cellule SLA avevano un grado di proliferazione maggiore rispetto ai sani, abbiamo dimostrato che queste due mutazioni, non comuni, influenzano il

metabolismo energetico alterando in modo diverso la funzionalità mitocondriale, meccanismi diversi che portano però allo stesso fenotipo patologico.

vi) nell'ambito di un progetto su SARS-COV2 abbiamo prodotto una collezione di lentivirus esprimenti tutte le ORF del SARS-COV2 al fine di infettare cellule staminali neurali e comprendere la sua influenza su questo tipo di cellule.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

**Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate:**

1. Generation of an induced pluripotent stem cell line (CSS012-A (7672)) carrying the p.G376D heterozygous mutation in the TARDBP protein. D'Anzi A, Altieri F, Perciballi E, Ferrari D, Torres B, Bernardini L, Lattante S, Sabatelli M, Vescovi AL, Rosati J. Stem Cell Res. 2021 May;53:102356. doi: 10.1016/j.scr.2021.102356. Epub 2021 Apr 18. PMID: 34087986
2. Known Drugs Identified by Structure-Based Virtual Screening Are Able to Bind Sigma-1 Receptor and Increase Growth of Huntington Disease Patient-Derived Cells. Battista T, Pascarella G, Staid DS, Colotti G, Rosati J, Fiorillo A, Casamassa A, Vescovi AL, Giabbai B, Semrau MS, Fanelli S, Storici P, Squitieri F, Morea V, Ilari A. Int J Mol Sci. 2021 Jan 28;22(3):1293. doi: 10.3390/ijms22031293. PMID: 33525510
3. COVID-19 Specific Immune Markers Revealed by Single Cell Phenotypic Profiling. Sansico F, Miroballo M, Bianco DS, Tamiro F, Colucci M, Santis E, Rossi G, Rosati J, Di Mauro L, Miscio G, Mazza T, Vescovi AL, Mazzoccoli G, Giambra V, On Behalf Of Csa-Covid Group. Biomedicines. 2021 Nov 29;9(12):1794. doi: 10.3390/biomedicines9121794. PMID: 34944610

Data 29/03/2022

Il Responsabile del Progetto  
Dott.ssa Jessica Rosati

Il Legale Rappresentante  
Dott. Michele Giuliani

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante  
Dott. Michele Giuliani