

**Riattivazione di neuroni derivati da cellule iPSCs  
di pazienti affetti da FXS:  
un approccio preclinico.**

**Durata: 24 mesi**

## ABSTRACT

Il nostro principale obiettivo continua ad essere quello di riattivare in maniera sempre più specifica il gene *FMRI* mutato e metilato, causa della sindrome X fragile (FXS).

Per questo progetto intendiamo impiegare neuroni differenziati da cellule iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells), a loro volta derivate da pazienti affetti da FXS e da individui maschi non affetti e precedentemente caratterizzate (Brykczynska et al., 2016). Poichè si tratta delle cellule bersaglio per questa condizione, il presente progetto può essere considerato come approccio preclinico alla sindrome, in quanto potrebbe essere successivamente traslato in futuri studi clinici.

Il primo obiettivo si propone di superare il silenziamento trascrizionale del gene *FMRI* mutato trasfettando cellule FXS con un mRNA sintetico in grado di essere tradotto in proteina FMRP. Questa strategia coinvolgerà la collaborazione di esperti nel campo della terapia ad mRNA, che stanno traslando in trial clinici i loro risultati *in vitro* sulla metilmalonico acidemia (An et al., 2017). Grazie alla collaborazione con il Dr. Paolo G.V. Martini (Moderna Therapeutics, Cambridge, MA, USA), trasfetteremo i nostri neuroni FXS con un mRNA sintetico modificato codificante per FMRP (già presente nei nostri laboratori). Come controllo dei normali livelli di trascrizione e traduzione di *FMRI* verranno impiegati i neuroni derivati da individui maschi di controllo. Questi ultimi saranno pure trasfettati con l'mRNA sintetico di *FMRI* per verificare eventuali effetti avversi. Verrà inoltre analizzata la morfologia dell'arborizzazione dendritica sia in neuroni derivati da pazienti FXS che da controlli dopo trasfezione con l'mRNA di sintesi.

Secondo obiettivo sarà quello di continuare i trattamenti *in vitro* con il composto demetilante il DNA, la 5-aza-2-deossicitidina (5-azadC), sia in neuroni derivati da FXS che da controlli. Risultati precedentemente pubblicati in letteratura scientifica su linee cellulari di linfoblasti derivate da pazienti FXS dimostravano che la 5-azadC è in grado di riattivare il gene *FMRI* attraverso una demetilazione non casuale dell'isola CpG del promotore del gene (Tabolacci et al., 2016). Uno studio della metilazione del DNA (metiloma) e dello stato di trascrizione (trascrittoma) estesi all'intero genoma verranno condotti sui neuroni derivati da FXS e controlli trattati con 5-azadC, in modo da ottenere una visione generale degli effetti epigenetici e trascrizionali di tale composto.

Nel complesso queste conoscenze si rendono necessarie al fine di pianificare nuove strategie terapeutiche per la FXS attraverso una riattivazione sempre più mirata del gene *FMRI* mutato.

## Referenze

An D, Schneller JL, Frassetto A, Liang S, Zhu X, Park JS, Theisen M, Hong SJ, Zhou J, Rajendran R, Levy B, Howell R, Besin G, Presnyak V, Sabnis S, Murphy-Benenato KE, Kumarasinghe ES, Salerno T, Mihai C, Lukacs CM, Chandler RJ, Guey LT, Venditti CP, Martini PGV. 2017. Systemic Messenger RNA Therapy as a Treatment for Methylmalonic Acidemia. Cell Rep. 21(12):3548-3558.

Brykczynska U, Pecho-Vrieseling E, Thiemeyer A, Klein J, Fruh I, Doll T, Manneville C, Fuchs S, Iazeolla M, Beibel M, Roma G, Naumann U, Kelley N, Oakeley EJ, Mueller M, Gomez-Mancilla B, Bühler M, Tabolacci E, Chiurazzi P, Neri G, Bouwmeester T, Di Giorgio FP, Fodor BD. 2016. CGG Repeat-Induced FMR1 Silencing Depends on the Expansion Size in Human iPSCs and Neurons Carrying Unmethylated Full Mutations. *Stem Cell Reports*. 7(6):1059-1071.

Tabolacci E, Mancano G, Lanni S, Palumbo F, Goracci M, Ferrè F, Helmer-Citterich M, Neri G. 2016. Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells. *Epigenetics Chromatin*. 9:12.