

DECRETO N. 79

del 27/08/2024

OGGETTO: BANDO EJP RD JOINT TRANSNATIONAL CALL FOR PROPOSALS 2019 — EROGAZIONE IN FAVORE DELLA FONDAZIONE I.R.C.C.S. ISTITUTO NEUROLOGICO "CARLO BESTA" DELLA TRANCHE FINALE DI PAGAMENTO PARI A **€ 10.785,60**, CORRISPONDENTE ALLE SPESE SOSTENUTE CONSIDERATE ELEGGIBILI A CONCLUSIONE DEI SEI MESI DI PROROGA (CUP J44I200000540001)

*L'atto si compone di 21 pagine
di cui 16 pagine di allegati*

IL DIRETTORE GENERALE DELLA FONDAZIONE REGIONALE PER LA RICERCA BIOMEDICA

RICHIAMATI:

- la DGR nr. IX/2401 del 26.10.2011 con la quale Regione Lombardia ha costituito la "Fondazione Regionale per la Ricerca Biomedica" (di seguito "FRRB"), il cui scopo statutario è quello di promuovere la ricerca scientifica e sanitaria nel settore delle Scienze della Vita;
- la DGR nr. XI/1016 del 17.12.2018 con la quale è stato approvato lo schema di Accordo di collaborazione tra FRRB e la Direzione Generale Welfare di Regione Lombardia;
- la DGR n. XI/1106 del 19.12.2018 con la quale è stato approvato il Piano di Azione 2018 che prevede, al suo interno, l'allocazione fino ad un massimo di € 1.300.000,00 per la partecipazione di FRRB programma europeo European Joint Programme on Rare on Diseases (EJP RD) Bando JTC 2019;
- la DGR n. XI/5786 del 21.12.2021 con la quale è stato approvato il nuovo Statuto di FRRB;

VISTI:

- il Regolamento (UE) nr. 1291/2013 del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'11.12.2013 che istituisce il Programma Quadro di Ricerca e Innovazione (2014-2020) "Horizon 2020" quale strumento di finanziamento della ricerca scientifica e dell'innovazione per progetti di ricerca o azioni volte all'innovazione scientifica e tecnologica che portino un significativo impatto sulla vita dei cittadini europei;
- il Grant Agreement nr. 825575 partito il 1° gennaio 2019, con l'obiettivo di supportare e coordinare gli sforzi nel campo della ricerca di Stati membri, associati e Paesi extra-europei, nel campo delle malattie rare, anche al fine di implementare gli obiettivi dell'International Rare Disease Research Consortium (IRDiRC);
- la Comunicazione della Commissione Europea nr. 2014/C 198/01 "Disciplina degli aiuti di Stato a favore di ricerca, sviluppo e innovazione" e ss.mm.ii;
- il Regolamento UE nr. 2021/1237 della Commissione del 23 luglio 2021 che ha modificato il Regolamento UE nr. 651/2014 che dichiara alcune categorie di aiuti

compatibili con il mercato interno in applicazione degli articoli 107 e 108 del Trattato;

DATO ATTO CHE:

- il progetto dal titolo *"The rarest of the rare – exploring noncoding RNA in the disease pathogenesis of Hutchinson-Gilford progeria syndrome"*, Acronimo PROGERIA (EJPRD19-206) è risultato tra i progetti ammessi a finanziamento nell'ambito del programma europeo European Joint Programme on Rare Diseases (EJP RD) Bando JTC 2019;
- all'interno del progetto transnazionale EJPRD 19-206 il partner nr. 4, la Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico "Carlo Besta" con Responsabile scientifico la Dr.ssa Paola Cavalcante (di seguito "Beneficiario"), è risultato assegnatario di un contributo complessivo da parte di FRRB pari a **€ 150.000,00**;
- il Beneficiario ha inviato, a FRRB, a mezzo PEC, in data 21.01.2020 (Prot. nr. 20200014E) la *"Dichiarazione di svolgimento di attività non economica ai sensi delle norme in materia di aiuti di Stato"* e la *"Dichiarazione di accettazione del contributo"*;

CONSIDERATO CHE:

- in data 01.05.2020 ha avuto avvio il progetto Acronimo PROGERIA (EJPRD19-206) per una durata di 36 mesi, come comunicato dal Responsabile Scientifico con PEC del 21.01.2020 (Prot. nr. 20200014E) e riportato nella Convenzione stipulata con il Beneficiario;
- in data 12.04.2023, su richiesta dei due Partner lombardi, FRRB ha concesso una proroga di 6 mesi dei termini di conclusione del progetto PROGERIA (EJPRD19-206) che ne ha determinato lo spostamento della data finale al 31.10.2023;
- l'Art. 8.1 (Erogazione del contributo) della citata Convenzione specifica, al comma 2, le modalità erogative delle successive tranches di pagamento come segue:
 - *"due tranches successive entro 60 giorni dalla presentazione della prima e della seconda rendicontazione annuale, previa accettazione della documentazione ricevuta da parte di FRRB. L'importo del contributo sarà calcolato in base ai costi eleggibili effettivamente rendicontati da ciascun Beneficiario"*;

DATO ATTO CHE:

- in data 01.02.2024 è pervenuta dal Beneficiario, via PEC, la documentazione economica relativa agli ultimi sei mesi di attività– periodo 01.05.2023 - 31.10.2023 – del progetto acronimo PROGERIA;
- in data 27.06.2024 il Direttore Generale di FRRB ha comunicato, via PEC (Prot. nr. 20240222U l'esito positivo dell'istruttoria di verifica della rendicontazione economica pervenuta richiedendo, al contempo, l'invio della richiesta di erogazione dell'ultima tranche di finanziamento;

VISTI:

- la scheda di rendicontazione economica (*Financial report*) contenente il dettaglio dei costi sostenuti dal Beneficiario nel corso degli ultimi sei mesi di attività per complessivi **€ 10.785,60** (*Reporting period 01/05/2023 – 31/10/2023*) (**Allegato 1**);
- la richiesta di erogazione pervenuta, a mezzo PEC, in data 28.06.2024 (Prot. nr. 20240225E) per un importo pari a **€ 10.785,60** (**Allegato 2**), corrispondente ai costi rendicontati e ritenuti eleggibili da FRRB a conclusione degli ultimi sei mesi di attività;
- il report scientifico finale inviato dal Dr. Fabrizio D'Adda di Fagagna (**allegato 3**);

VISTA E VERIFICATA:

- la regolarità contributiva dell'ente assegnatario del contributo – Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta" – tramite il DURC inviato dall'Istituto Neurologico "Carlo Besta" (**Allegato 4**);

DECRETA

per i motivi espressi in premessa, parte integrante del presente provvedimento:

- di autorizzare l'erogazione in favore della Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico "Carlo Besta" con sede legale in Milano, via Celoria nr. 11, di una rata pari a **€ 10.785,60**, corrispondente a quanto rendicontato dal Partner nr. 4 e ritenuto eleggibile da parte di FRRB a conclusione degli ultimi sei mesi di attività del progetto dal titolo "*The rarest of the rare – exploring non-coding RNA in the disease*

pathogenesis of Hutchinson-Gilford progeria syndrome", acronimo PROGERIA (EJPRD19-206), Responsabile Scientifico Dr.ssa Paola Cavalcante (CUP J44I20000540001)

IL DIRETTORE GENERALE
Veronica Comi



Veronica
Comi
27.08.2024
16:03:22
GMT+02:00

COST STATEMENT

NAME OF LOMBARDY BENEFICIARY FONDAZIONE IRCCS "ISTITUTO NEUROLOGICO CARLO BESTA"

NAME OF PRINCIPAL INVESTIGATOR PAOLA CAVALCANTE

PROJECT ID EJPRD 19-206

CUP NUMBER J44I20000540001

REPORTING PERIOD (FROM-TO) 01/05/2023-31/10/2023

IS VAT RECOVERABLE? (YES/NO) NO

COST CATEGORIES	TOTAL BUDGET	REPORTING PERIOD 1	REPORTING PERIOD 2	REPORTING PERIOD 3	REPORTING PERIOD 4	TOTAL COST STATEMENT	DEVIATION FROM ORIGINAL BUDGET
TOTAL PERSONNEL COSTS	€ 60.000,00	€ 12.045,00	€ 19.071,50	€ 12.045,00	€ 0,00	€ 43.161,50	€ 16.838,50
-Scientist						€ 0,00	€ 0,00
-PhD Student						€ 0,00	€ 0,00
-Technician						€ 0,00	€ 0,00
-Other (please specify)						€ 0,00	€ 0,00
CONSUMABLES	€ 56.950,00	€ 6.092,81	€ 23.193,52	€ 30.688,12	€ 7.967,40	€ 67.941,85	-€ 10.991,85
EQUIPMENT (LEASING OR ON HIRE)						€ 0,00	€ 0,00
STUDY/CLINICAL TRIAL						€ 0,00	€ 0,00
TRAVEL & ACCOMODATION	€ 4.000,00				€ 69,00	€ 69,00	€ 3.931,00
OTHER DIRECT COSTS	€ 2.800,00					€ 0,00	€ 2.800,00
SUBTOTALE	€ 123.750,00	€ 18.137,81	€ 42.265,02	€ 42.733,12	€ 8.036,40	€ 111.172,35	€ 12.577,65
OVERHEADS	€ 24.750,00	€ 3.627,56	€ 8.453,00	€ 8.546,62	€ 1.607,28	€ 22.234,47	€ 2.515,53
SUBCONTRACTING COSTS	€ 1.500,00				€ 1.141,92	€ 1.141,92	€ 358,08
TOTAL REQUESTED BUDGET	€ 150.000,00	€ 21.765,37	€ 50.718,02	€ 51.279,74	€ 10.785,60	€ 134.548,74	€ 15.451,26

EQUIPMENT (LEASING OR ON HIRE)

NAME	ITEM DESCRIPTION	INVOICE NR.	INVOICE DATE	EURO AMOUNT	% OF USE OF THE EQUIPMENT FOR PROJECT'S PURPOSES	AMORTISATION MONTHS	EURO AMOUNT
TOTAL € AMOUNT							0,00

TRAVEL AND ACCOMODATION

Max 10% of direct costs

NAME	MOTIVATION	DESTINATION	PERIOD (FROM - TO)	EURO AMOUNT
Cavalcante Paola	XXVII Meeting del Network Italiano Laminopatie	Bologna	13/10/2023-13/10/2023	69,00
TOTAL € AMOUNT				69,00

SUBCONTRACTING

Max 20% of direct costs

NAME	PROCEDURE APPLIED	DESCRIPTION (provide details on service duration)	INVOICE NR.	INVOICE DATE	EURO AMOUNT
Dott. Gianluca Caimi	Attività di audit finale	18/12/2023-31/12/2023	4/PA	14/12/23	1.141,92
TOTAL € AMOUNT					1.141,92

OTHER DIRECT COSTS

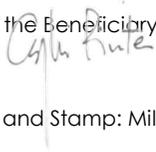
Publication costs can be listed here up to a maximum of 5% of direct costs

NAME	DESCRIPTION	INVOICE NR.	INVOICE DATE	EURO AMOUNT
TOTAL € AMOUNT				0,00

I declare that all the documentation listed in this table is archived at the Beneficiary premises and available in case of financial audits.

Name of the Beneficiary Legal Representative
Prof. Giuseppe Lauria Pinter, con delega di firma

Signature of the Beneficiary Legal Representative



Date, Place and Stamp: Milano, 29/12/2023



RICHIESTA EROGAZIONE CONTRIBUTO DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DI ATTO NOTORIO (D.P.R. 445/2000)

Spett.le
Fondazione Regionale
per la Ricerca Biomedica
Via T. Taramelli, 12
20124 Milano

PEC:

fondazioneregionalericercabiomedica@pec.it

OGGETTO: Bando EJPRD JTC 2019 - Erogazione saldo finale progetto *PROGERIA* - ID 206

TITOLO PROGETTO: *The rarest of the rare – exploring non-coding RNA in the disease pathogenesis of Hutchinson- Gilford PROGERIA syndrome*

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Paola Cavalcante

CODICE CUP: J44I20000540001

Il sottoscritto GIUSEPPE LAURIA PINTER nato a [REDACTED], codice fiscale [REDACTED], residente [REDACTED], che sottoscrive il presente atto in forza di delega del potere di firma conferita con Deliberazione del C.d.A. n. 16 del 08/03/2024, in qualità di Direttore Scientifico dell'Ente:

FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NEUROLOGICO "C. BESTA"
Con sede in VIA CELORIA 11, 20133, MILANO,
Partita Iva: 04376340156
Codice Fiscale 01668320151

dirsci@pec.istituto-besta.it
ufficioricerca@istituto-besta.it

consapevole delle sanzioni penali previste in caso di dichiarazioni non veritiere, di formazione o uso di atti falsi e della conseguente decadenza dai benefici di cui agli artt. 75 e 76 del D.P.R. 28 dicembre 2000 n. 445, in relazione al progetto sopra indicato

CHIEDE

l'erogazione del saldo pari a € 10.785,60

Le coordinate per il versamento sono le seguenti:

- ❖ Banca Popolare di Sondrio Agenzia 9 di Milano viale Romagna, 24
- ❖ IBAN IT26 A056 9601 6080 0000 6200 X21

Si dichiara inoltre che la Fondazione IRCCS Istituto Neurologico C.Besta, in quanto Ente di diritto pubblico, non è tenuta alla presentazione del DURC.

Cordiali saluti,

Milano, 28/06/2024

F.to DIGITALMENTE
DAL LEGALE RAPPRESENTANTE
(o suo delegato, ai sensi dell'Art. 24
del DLgs n. 82/2005)

Firmato da:
GIUSEPPE LAURIA PINTER
Codice fiscale: LRP65C22A757P
Valido da: 27-12-2023 12:36:09 a: 27-12-2026 02:00:00
Certificato emesso da: InfoCert Qualified Electronic Signature CA 3, InfoCert S.p.A., IT
Riferimento temporale 'SigningTime': 28-06-2024 17:19:28
Motivo: Approvo il documento

Titolo progetto e acronimo: The rarest of the rare – exploring non-coding RNA in the disease pathogenesis of Hutchinson-Gilford progeria syndrome” - PROGERIA

ID Progetto: EJPRD 19-206

Ente Beneficiario: Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “Carlo Besta”

Responsabile Scientifico: Dott.ssa Paola Cavalcante

Codice CUP: J44I20000540001

Coordinatore: Maria Eriksson, Dept of Biosciences and Nutrition, Center for Innovative Medicine, Karolinska Institutet

Altri Partners: Fabrizio D’Adda di Fagagna, DNA Damage Response and Cellular Senescence Laboratory, IFOM, Milano; Roland Foisner, Max F. Perutz Laboratories, Medical University di Vienna; Karima Djabali, Department of Dermatology, Technical University di Monaco.

Background e obiettivi del progetto:

La Progeria o Sindrome di Hutchinson-Gilford è una malattia genetica rara caratterizzata da invecchiamento prematuro e accelerato a insorgenza post-natale. Nella maggior parte dei casi (>90%), la malattia è causata da una mutazione puntiforme (c.1824C>T, p.G608G) de novo nell’esone 11 del gene LMNA, codificante la lamina A, che causa un’alterazione dello splicing e la produzione di una proteina tronca chiamata progerina [Eriksson et al. *Nature* 2003; Gordon et al. *Cell* 2014]. Il gene LMNA codifica due importanti proteine della lamina nucleare, la lamina A e C, che costituiscono l’“impalcatura” molecolare del nucleo cellulare, fondamentali per la stabilità del nucleo stesso e del genoma, per il mantenimento dei telomeri, l’organizzazione della cromatina e l’espressione genica [Gruenbaum et al. *Annu Rev Biochem* 2015]. Esistono diverse patologie causate da mutazioni nel gene LMNA, collettivamente chiamate laminopatie, che includono neuropatie, distrofie muscolari, lipodistrofie e sindromi da invecchiamento precoce [Worman *J Pathol* 2012]. Nei pazienti affetti da progeria, la progerina ha un effetto negativo dominante con impatto devastante sulle cellule. L’accumulo di danni al DNA e l’accorciamento dei telomeri costituiscono la caratteristica patogenetica principale delle cellule esprimenti progerina [Osmanagic-Myers et al. *Genes Develop* 2015]. Tuttavia, il ruolo di questa proteina nei meccanismi di senescenza cellulare non è del tutto chiaro, ed in particolare non sono noti gli esatti eventi molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione della patologia.

Diverse strategie di trattamento sono state testate in modelli in vitro ed in vivo di Progeria diretti a modificare i meccanismi di maturazione della progerina, ma attualmente non esistono terapie per contrastare efficacemente la malattia.

Il progetto PROGERIA è nato dall’ipotesi secondo cui gli RNA non codificanti (ncRNAs), sia lncRNAs che microRNAs (miRNAs), possano giocare un ruolo rilevante nei meccanismi patogenetici responsabili della Progeria, quali lo splicing alterato, la risposta al danno del DNA, la senescenza cellulare e l’attivazione di vie del segnale pro-fibrotiche nel tessuto cardiovascolare, rappresentando quindi dei possibili target terapeutici su cui agire per contrastare la progressione della patologia.

Pertanto, il progetto si è proposto i seguenti obiettivi:

1. Identificare ncRNAs alterati nelle cellule di pazienti affetti da Progeria e nei relativi modelli animali **(WP1)**;
2. Confermare la specificità dei ncRNAs associati a Progeria, valutandone l'espressione in altre laminopatie, e stabilire il loro contributo ai cambiamenti patogenetici tipici della malattia **(WP2)**;
3. Testare nei modelli in vivo di Progeria nuove terapie basate sulla modulazione di specifici ncRNAs associati alla malattia, in particolare miRNAs, per dimostrarne l'efficacia nel migliorare il decorso di malattia e la durata della vita **(WP3)**.

In qualità di Partners del Consorzio con esperienza nell'ambito delle laminopatie non progeroidi, l'obiettivo principale delle attività svolte presso il nostro Istituto (FINCB) è stato quello di contribuire all'identificazione di ncRNAs implicati in modo specifico nella Progeria **(WP2)** attraverso l'analisi di queste molecole in pazienti laminopatici non-progeroidi come gruppo di controllo. Ci siamo, inoltre, posti come obiettivo quello di identificare ncRNAs alterati in pazienti affetti da laminopatie non progeroidi, che possano rappresentare possibili biomarcatori e nuovi bersagli terapeutici per la cura di queste patologie. In parallelo, la nostra attività ha avuto lo scopo di contribuire alla comprensione del ruolo dell'infiammazione nei meccanismi associati alla senescenza cellulare, e in particolare a valutare l'effetto di trattamenti modulanti i ncRNAs sulla risposta infiammatoria in modelli in vitro e in vivo di Progeria e di senescenza, tramite la realizzazione di saggi immunologici diretti a valutare il profilo di citochine e chemochine infiammatorie in surnatanti cellulari e nel plasma degli animali **(WP3)**.

Risultati complessivi ottenuti dal Consorzio

WP1: È stato eseguito il sequenziamento totale dell'RNA a singola cellula, tramite Smart-Seq2 (Illumina), su cellule della muscolatura liscia vascolare (VSMC) provenienti dal modello di topo progeria LmnaG609G/G609G knock-in a 6, 10 e 12 settimane e topi wild-type. Si tratta di cellule che esprimono progerina e che vengono perse a partire dalla settima settimana in questo modello animale, quale segno distintivo del fenotipo patologico cardiovascolare associato a Progeria. È stato ottenuto un set di dati relativo al trascrittoma di queste cellule che ha rivelato geni alterati coinvolti nello stress da reticolo endoplasmatico (ER). Si tratta di dati nuovi e rilevanti, che evidenziano in questi geni e nello stress da ER dei possibili target terapeutici per contrastare la patologia vascolare fatale tipica di Progeria.

È stato, inoltre, ottimizzato un protocollo di sequenziamento specifico per lunghi RNA indotti dal danno telomerico (tncRNAs) mediante tecnologia Oxford Nanopore (ONT), protocollo che possa garantire specificità per i trascritti telomerici.

Mediante analisi del miRNoma, sono stati identificati miRNAs significativamente associati al fenotipo senescente nelle cellule endoteliali esprimenti progerina e nel plasma dei topi Progeria.

Il profilo di miRNA e mRNAs in queste cellule ha mostrato una significativa up-regolazione di geni coinvolti nei pathways legati alla senescenza nonché alterazione di miRNAs associati a senescenza. Nel plasma degli animali è stato osservato un incremento di marcatori di senescenza e di alcuni specifici miRNAs alterati anche nelle cellule endoteliali.

Fondazione I.R.C.C.S. Istituto Neurologico Carlo Besta

Via Celoria 11, 20133 Milano - Tel 02 2394 1

CF 01668320151 - PI 04376340156 - www.istituto-besta.it

WP2: Relativamente all'identificazione di miRNAs associati in modo specifico a Progeria, i miRNAs più promettenti sono risultati essere miR-31 and miR-34, trovati up-regolati sia nelle cellule endoteliali esprimenti progerina che nel plasma del modello animale, ma anche in cellule non endoteliali non esprimenti progerina, ad indicare che le cellule endoteliali esprimenti la proteina mutata siano in grado di inviare un segnale paracrino alle cellule circostanti inducendo l'espressione di miRNAs associati a senescenza. Questo effetto paracrino è stato confermato mediante co-cultura di cellule endoteliali da topi progeria e fibroblasti da topi wild-type. I suddetti miRNAs sono stati identificati nel surnatante delle colture all'interno di piccole vescicole extracellulari, ad indicare il loro ruolo in questo signaling paracrino. Per comprendere se il pathway di p53 fosse in grado di indurre l'espressione di questi miRNAs nelle cellule endoteliali esprimenti progerina, sono state, inoltre, generate cellule endoteliali p53 knockout mediante CRISPR/Cas9, la cui analisi è in corso.

WP3: Sono stati disegnati oligonucleotidi neutralizzanti (antagomiRs) il miRNA candidato principale associato a Progeria quale target terapeutico, ovvero miR-34, che è stato associato alla patologia cardiovascolare nei pazienti con Progeria. Questi antagomiRs sono stati testati nelle cellule endoteliali. Gli esperimenti condotti hanno rivelato un riproducibile miglioramento del fenotipo senescente, ma purtroppo troppo lieve per proseguire con gli esperimenti in vivo. Saranno pertanto testati antagomiRs neutralizzanti altri miRNAs identificati nel progetto.

In parallelo, è stato generato un modello di Progeria privo di attività telomerasica (Terc KO mice) per caratterizzare il fenotipo di invecchiamento accelerato e l'impatto dell'inibizione della risposta al danno del DNA telomero in diversi organi e tessuti. È stato osservato come i fenotipi patologici del modello Terc KO sono causati dall'attivazione della risposta al danno del DNA a livello di telomeri criticamente corti determinando senescenza cellulare. I topi Terc KO si sono rivelati un buon modello da utilizzare in combinazione con il modello LMNA G609G per studiare la Progeria. È stato, inoltre, osservato come il modello Terc KO risponda bene al trattamento con oligonucleotidi telomerici antisense. Infatti, dopo trattamento sia a livello polmonare che ematopoietico si è osservato un recupero del fenotipo patologico.

Risultati specifici ottenuti presso la Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

WP2: Nel corso del progetto è stato collezionato il materiale biologico di pazienti affetti da laminopatie non-progeroidi seguiti presso il nostro Istituto e ben caratterizzati dal punto di vista genetico e clinico, con implementazione della bio-banca dedicata alle laminopatie.

È stato disegnato un pannello di miRNAs candidati per essere associati alle laminopatie non progeroidi e miRNAs associati a Progeria identificati nel corso del progetto (**WP1**), allo scopo di definire i miRNAs coinvolti in modo specifico nella Progeria e miRNAs comunemente coinvolti nelle laminopatie. Il pannello ha compreso i seguenti miRNAs: miR-192, -335 e -100, quali miRNAs noti per essere associati a disordini muscolari e coinvolti nella proliferazione e differenziazione dei mioblasti, e miR-34a, -34b e -34c, quali possibili miRNAs Progeria-specifici [Sylvius et al. *Faseb J* 2011]. Nello specifico, miR-192 e -335 promuovono la proliferazione e miR-100 il differenziamento di mioblasti, eventi cruciali nei processi di riparazione del muscolo. La loro espressione è alterata nel muscolo di pazienti laminopatici [Sylvius et al. *Faseb J* 2011], ad indicare l'inesco

di meccanismi di riparazione mediati dai miRNAs come tentativo di contrastare la patologia. MiR-34a, -34b e 34c costituiscono una famiglia di miRNAs la cui inibizione, mediante un antagomiR specifico per tutti e tre i miRNAs, determina un significativo miglioramento della funzionalità cardiaca, in topi Progeria, secondo dati ottenuti dal Consorzio.

È stato analizzato il profilo dei miRNAs selezionati nel siero di 21 pazienti affetti da laminopatie (**Tabella 1**) e 21 controlli sani di pari età e sesso rispetto ai pazienti mediante TaqMan qPCR.

È stato interessante osservare un significativo incremento di miR-192, -335 e -100 (**Figura 1**) nel siero dei pazienti laminopatici rispetto ai controlli, confermando un significativo coinvolgimento di questi miRNAs nelle laminopatie ed evidenziando la loro alterazione, non solo nel muscolo, ma anche nel siero dei pazienti affetti da queste patologie. In particolare, i risultati ottenuti dall'analisi delle Curve ROC (Receiver Operating Characteristic) suggeriscono come questi miRNAs possano fungere da biomarcatori di malattia (**Figure 1**), la cui analisi, non invasiva, nel siero potrebbe essere utile per il monitoraggio e la valutazione longitudinale della malattia.

In merito alla famiglia di miRNAs miR-34, è stata osservata, anche in questo caso, una significativa up-regolazione di miR-34a e miR-34c, mentre i livelli di miR-34b sono risultati in media incrementati, ma non in modo significativo rispetto ai controlli sani (**Figura 2**). L'analisi delle curve ROC rivela il potenziale di miR-34a e -34c quali possibili biomarcatori. Sulla base di dati ottenuti nei modelli in vitro e in vivo di Progeria, questi miRNAs, in particolare miR-34a, sono stati descritti come fattori molecolari coinvolti nello sviluppo del fenotipico fibrotico e senescente nel tessuto cardiaco e nelle cellule endoteliali progeroidi. I nostri dati suggeriscono come essi possano essere coinvolti anche nelle laminopatie non progeroidi in relazione ad un possibile ruolo nella fibrosi muscolare ed essere rilasciati nel siero fungendo da marcatori molecolari della patologia.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti laminopatici inclusi nello studio.

LMNA-mutated PATIENTS (n)	21
Gender	
F - n (%)	12 (57.1%)
Age at onset (y)	
Median (range)	15 (3-50)
Age at sampling (y)	
Mean \pm SD	44 \pm 14.5
Disease duration at sampling (y)	
Mean \pm SD	25.3 \pm 11.6
Median (range)	23 (6-47)
Contractures	
Yes - n (%)	15 (71.4%)
Cardiac involvement	
Yes - n (%)	16 (76.2%)
Arrhythmic - n (%)	15 (71.4%)
Dilated - n (%)	6 (28.6%)
Hypertrophic - n (%)	5 (23.8%)
Respiratory involvement (NIV)	
Yes - n (%)	5 (23.8%)
North Star Ambulatory Assessment score	
Mean \pm SD	20.15 \pm 11.0
Median (range)	18.5 (0-34)

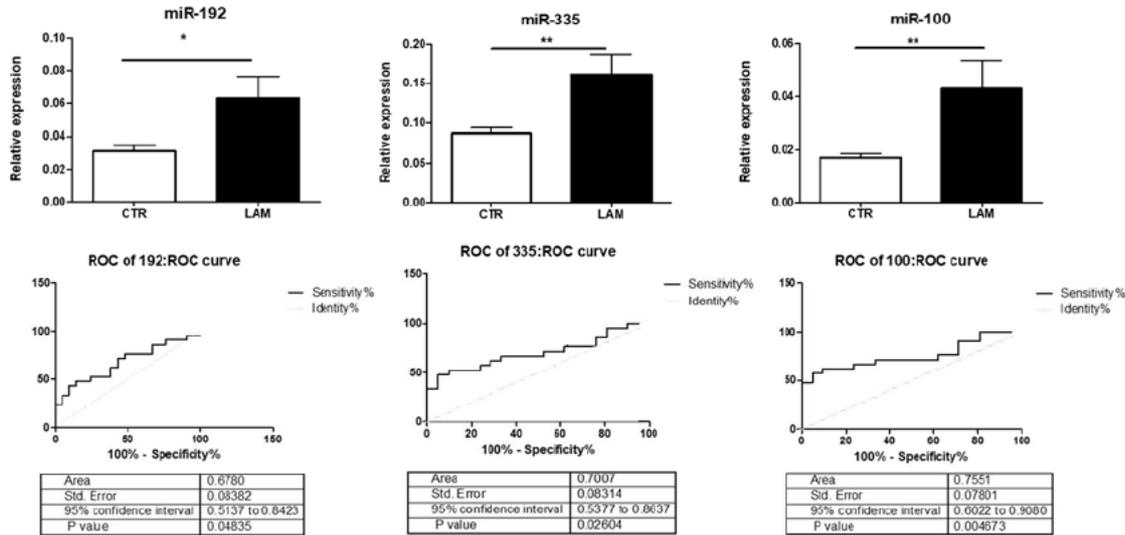


Figura 1. Livelli di espressione relativa di miR-192, -335 e -100 nel siero di pazienti affetti da laminopatie non progeroidi (LAM) e controlli (CTR) sani. I dati sono stati normalizzati rispetto all'espressione del miRNA endogeno miR-24-3p, stabilmente espresso nei campioni, ed espressi secondo la formula $2^{\Delta\Delta CT} \times 100$. Mann-Whitney test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Curve ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare la sensibilità e la specificità di miR-192, -335, e -100 come potenziali biomarcatori sierici di laminopatia.

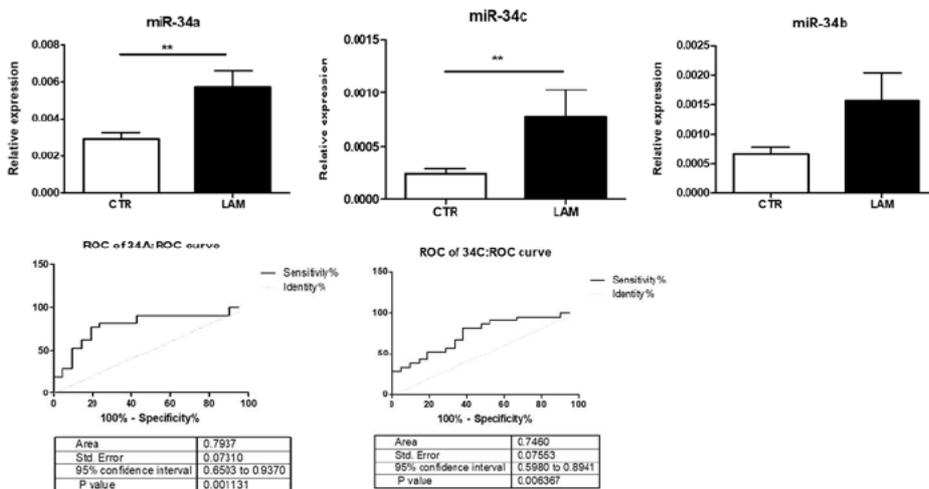


Figura 2. Livelli di espressione relativa di miR-34a, -34c e -34b nel siero di pazienti affetti da laminopatie (LAM) e controlli (CTR) sani. I dati sono stati normalizzati rispetto all'espressione del miRNA endogeno miR-24-3p ed espressi secondo la formula $2^{\Delta\Delta CT} \times 100$. Mann-Whitney test, ** $p < 0,001$. Curve ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare la sensibilità e la specificità di miR-34a e -34c come potenziali biomarcatori sierici di laminopatia.

Alla luce dei dati relativi a miR-192, -335, e -100 abbiamo ipotizzato un possibile ruolo dei miRNAs musco-specifici, noti come myomiRs, quali biomarcatori di laminopatie. Si tratta di miRNAs arricchiti nei muscoli cardiaci e scheletrici e coinvolti significativamente nei processi miogenici e nell'omeostasi muscolare, poiché hanno come bersaglio diversi geni legati all'atrofia muscolare [Siracusa et al. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018].

Abbiamo analizzato l'espressione dei myomiRs miR-1, miR-206, miR-133a e miR-133b, insieme a miR-21, un miRNA noto per promuovere la fibrosi, in mioblasti e tenociti di pazienti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD1) e nelle rispettive cellule con mutazione corretta mediante CRISP-Cas gene editing. Si tratta di una patologia causata da mutazioni in LMNA o altri geni (i.e. EMD, SYNE1/2, SUN1/2 o FHL1). Il fenotipo è caratterizzato da atrofia e debolezza muscolare, contratture articolari e cardiomiopatia. La variabilità patogenetica e clinica rende difficile il corretto inquadramento diagnostico, suggerendo come l'identificazione di biomarcatori sierici da affiancare alla valutazione clinica potrebbe favorire una diagnosi più precoce.

È stato interessante osservare una significativa up-regolazione di miR-1, -206, -133a, e -133b nei mioblasti con genotipo corretto rispetto ai mioblasti EDMD1 (Figura 3). Al contrario, miR-21 è risultato significativamente down-regolato sia in mioblasti che tenociti con mutazione corretta, rispetto alle cellule EDMD1. Questi dati indicano la capacità della correzione genetica di incrementare/ripristinare i livelli dei myomiRs nei mioblasti e di ridurre, invece, l'espressione del miRNA pro-fibrotico miR-21, sia nei mioblasti che nei tenociti.

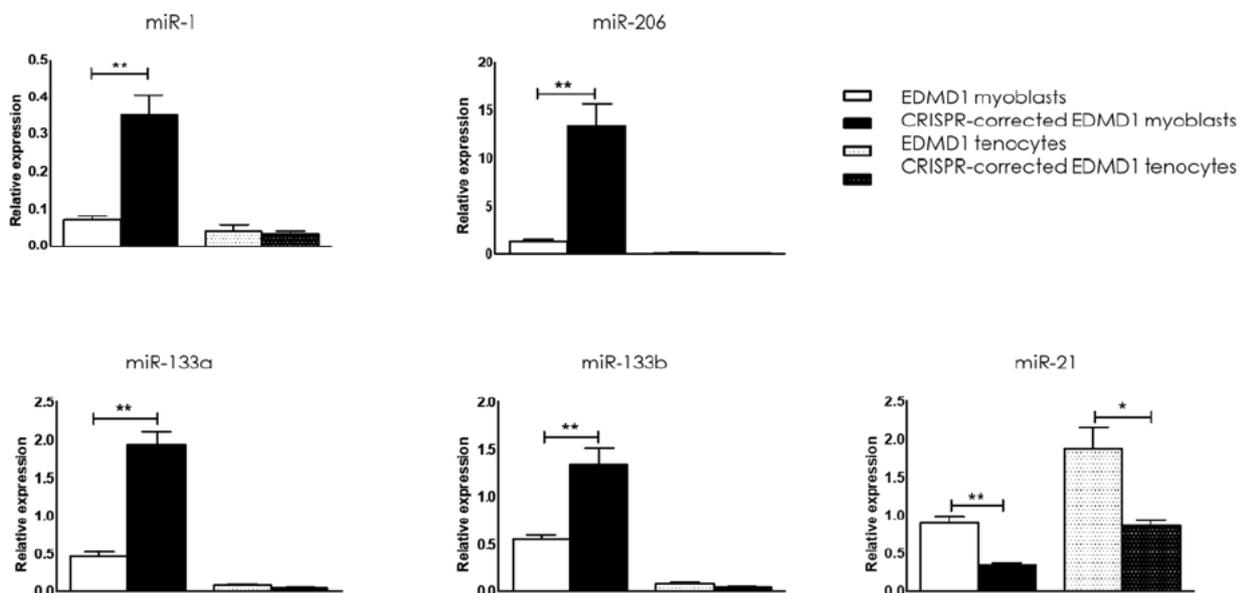


Figura 3. Livelli di espressione relativa di miR-1, -206, -133a, -133b e -21 in mioblasti e tenociti di pazienti EDMD1 e rispettive cellule con mutazione corretta mediante CRISP-Cas gene editing. I dati sono stati normalizzati ed espressi secondo la formula $2^{-\Delta CT} \times 100$. Mann-Whitney test, * p < 0,05; ** p < 0,001

Per verificare se i livelli di espressione di questi miRNAs fossero alterati nel siero di pazienti laminopatici, la loro espressione è stata analizzata mediante TaqMan real-time PCR nel siero dei 21 pazienti laminopatici (**Tabella 1**) e 21 controlli sani inclusi nelle analisi sopra descritte.

I dati ottenuti hanno rivelato una significativa up-regolazione di miR-206, miR-133b e miR-21 nel siero dei pazienti rispetto ai controlli (**Figura 4**). Il protocollo per l'analisi di miR-1 nel siero dovrà essere ottimizzato, non essendo riusciti a rilevarlo con sufficiente efficienza in real-time PCR. Mediante analisi delle curve ROC, per i tre miRNAs differenzialmente espressi, in particolare per miR-206 e -21, abbiamo ottenuti valori di sensibilità e specificità indicativi della loro capacità di discriminare tra pazienti e controlli (**Figura 4**) suggerendo il loro ruolo quali biomarcatori dello stato di malattia potenzialmente utili per il monitoraggio del decorso clinico.

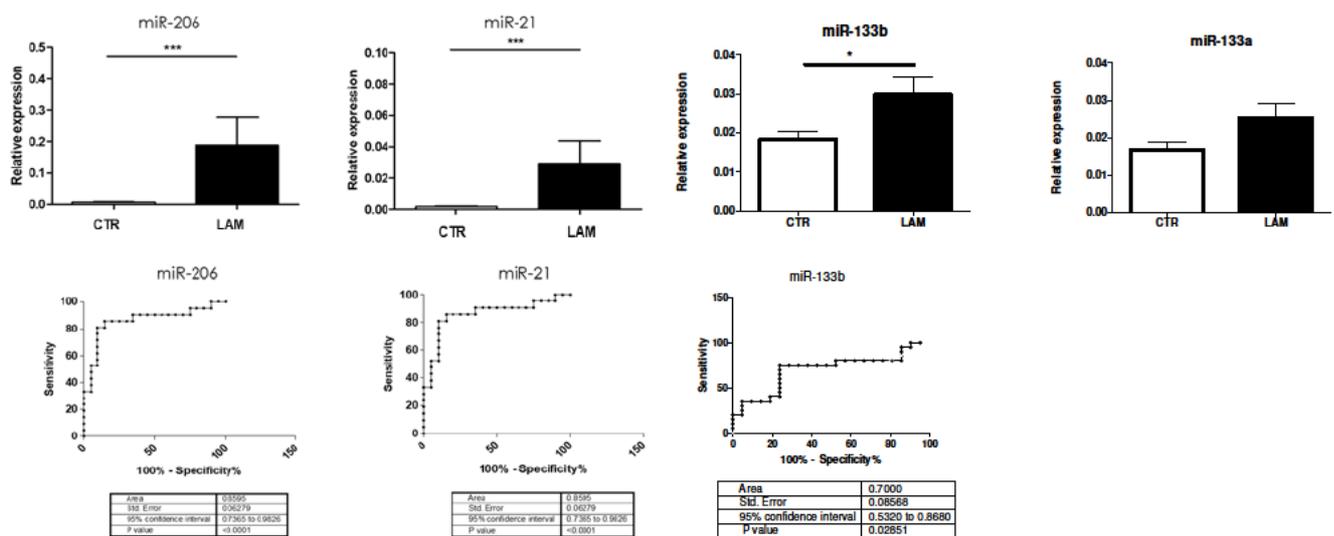


Figura 4. Livelli di espressione relativa di miR-206, miR-21, miR-133b e miR-133a nel siero di pazienti laminopatici (LAM) e controlli (CTR) sani. I dati sono stati normalizzati rispetto al miR-24-3p ed espressi secondo la formula $2^{-\Delta CT} \times 100$. Mann-Whitney test, * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. Curve ROC (Receiver Operating Characteristic) per valutare la sensibilità e la specificità di miR-206, miR-21 e miR-133b come potenziali biomarcatori sierici di laminopatia.

Nel complesso i risultati ottenuti hanno rivelato un set di myomiRs quali fattori coinvolti nei meccanismi patogenetici associati alle laminopatie, nonché possibili target terapeutici e biomarcatori utili nella pratica clinica. Essi promettono di migliorare la conoscenza su queste patologie e le possibilità di trattamento attraverso lo sviluppo di approcci molecolari avanzati diretti a contrastare la progressione di malattia.

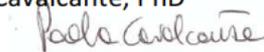
Questi dati, unitamente a quelli relativi ai myomiRs in mioblasti e tenociti, sono stati presentati come comunicazione orale durante il XXVII Meeting del Network Italiano Laminopatie tenutosi a Bologna il 13 ottobre 2023. È in corso la preparazione del manoscritto.

WP3:

Nel corso del progetto, abbiamo partecipato al WP3 attraverso l'analisi di campioni di plasma e surnatanti cellulari di modelli in vivo ed in vitro di Progeria e di senescenza per la valutazione del profilo di citochine e chemochine infiammatorie. In particolare, sono state eseguite analisi multiplex per la quantificazione delle seguenti proteine mediante tecnologia Luminex: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e TNF- α . Per i modelli in vivo, tali analisi sono state eseguite anche in animali trattati e non trattati con antagomiRs o oligonucleotidi telomerici antisense per valutare l'effetto dei trattamenti sulla risposta pro-infiammatoria, che è strettamente implicata nel processo di senescenza. I risultati di queste analisi, che riflettono un effetto della terapia sullo stato infiammatorio, saranno inclusi in manoscritti, realizzati in collaborazione con gli altri centri del consorzio, relativi all'impatto degli oligonucleotidi testati sui pathways pro-fibrotici e infiammatori, sulla risposta al danno del DNA, sui processi di senescenza e sul fenotipo patologico.

Milano, 22/12/2023

Paola Cavalcante, PhD



Neurologia 4 – Neuroimmunologia e Malattie Neuromuscolari

Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta

Tel. +39 0223944650

Email: paola.cavalcante@istituto-besta.it

Per presa visione

F.to Il Direttore scientifico – Prof. Giuseppe Lauria Pinter

Durc On Line

Numero Protocollo	INAIL_44077431	Data richiesta	11/06/2024	Scadenza validità	09/10/2024
-------------------	----------------	----------------	------------	-------------------	------------

Denominazione/ragione sociale	FONDAZIONE IRCCS ISTITUTO NEUROLOGICO C.BESTA
Codice fiscale	01668320151
Sede legale	VIA GIOVANNI CELORIA, 11 20133 MILANO (MI)

Con il presente Documento si dichiara che il soggetto sopra identificato **RISULTA REGOLARE** nei confronti di

I.N.P.S.
I.N.A.I.L.

Il Documento ha validità di 120 giorni dalla data della richiesta e si riferisce alla risultanza, alla stessa data, dell'interrogazione degli archivi dell'INPS, dell'INAIL e della CNCE per le imprese che svolgono attività dell'edilizia.