

Cystinosis Network Europe

Conferenza Europea per la Cistinosi, 13-15 Luglio, Berlino

VENERDI' MATTINA – Sessione scientifica

Nuove terapie per la cistinosi - Meeting del consorzio *E-rare* (Prof Francesco Emma, Bambino Gesù, Roma; Prof Elena Levtchenko, Belgio; Prof Paul Goodyer, Canada; Dr Masereew, Olanda)

Il consorzio ha appena concluso lo studio NTC (Novel Therapies for Cystinosis), un progetto di 3 anni finanziato dall'UE. Questa è la fase di divulgazione.

I ricercatori hanno fatto un test *in vivo* per un composto selezionato e uno screen *in vitro* di migliaia di composti su cellule progenitori renali umane CD24⁺. Il composto identificato potrà poi essere usato nella fase pre-clinica e successivamente clinica (nell'uomo).

Risultati:

1. Risultato negativo: **Disulfiram** - *In vivo*, abbassa i livelli di cistina e riduce apoptosi
 - Ha un'emivita più lunga della cisteamina
 - Assunta con la cisteamina, ha un effetto additivo
 - <100 volte più economico del Cystagon
 - <1000 volte più economico del Procsybi

Tuttavia gli animali che assumono questo composto perdono peso e sembrano malati, in più tale composto è molto tossico anche in zebrafish.

2. I ricercatori hanno scoperto difetti mitocondriali nella cistinosi e che cAMP è ridotto in cellule CTNS^{-/-} ciPTEC (conditionally immortalized proximal tubular epithelial cells). 8-Br-cAMP (un analogo di cAMP) può risanare i difetti mitocondriali quando assunto assieme alla cisteamina (Bellomo et al, Impact of atypical mitochondrial cyclic-AMP level in nephropathic cystinosis. *Cell Mol Life Sci* 2018).

Inoltre, i ricercatori hanno scoperto che il modello di topo CTNS^{-/-} ha un fenotipo incompleto e il ratto è un modello migliore – hanno 4 modelli di ratto KNOCKOUT per CTNS.

Modello di Zebrafish per la cistinosi – Sante Berlingerio, Leuven (Belgio)

E

Una nuova potenziale molecola per il trattamento della cistinosi nefropatica - Ester De Leo e Laura Rega, Bambino Gesù (Roma)

70% dei geni dello Zebrafish (ZF) sono connessi con i geni umani; 84% dei geni associati con malattie umane hanno una controparte nello ZF. ZF è un ottimo modello da usare perché ha uno sviluppo veloce, un'alta fertilità, le larve sono trasparenti, esistono tecniche di manipolazione genetica conosciute, il genoma è completamente sequenziato e, soprattutto, ha pro-nefroni che sono simili ai nefroni umani.

ZF sta iniziando ad essere usato come modello per la cistinosi, dato che il modello di topo non è accurato nella parte renale.

Conferenza Europea per la Cistinosi, 13-15 Luglio, Berlino

La proteina CTNS nello ZF e' per il 60% identica all proteina umana. ZF CTNS^{-/-} ha una mutazione non-senso nel gene CTNS, che rende la proteina non funzionale.

Il fenotipo della larva di ZF CTNS^{-/-}:

- Sviluppo rallentato e deformita' pronunciate
- Alta mortalita' embrionale, ma l'adulto e' fertile
- Livelli di cistina e apoptosi elevate
- Le dimensioni e il numero dei lisosomi sono elevati
- Selettivita' glomerulare danneggiata (il glomerulo non funziona bene e proteine ad alto peso molecolare lo attraversano)
- Riassorbimento tubulare danneggiato

Dopo l'assunzione della cisteamina, c'e' un aumento della sopravvivenza e tutte le caratteristiche menzionate sopra migliorano.

Il messaggio importante e' che il modello di Zebrafish per la cistinosi presenta proteinuria, un sintomo della sindrome di Fanconi, esattamente come la cistinosi umana.

I ricercatori al Bambino Gesù (Roma) hanno scoperto che la proteina p62 si accumula nelle cellule cistinotiche attraverso un meccanismo danneggiato di degradazione. P62 e' un marker dell'autofagia, il che significa che la cistinosi presenta un danneggiamento della via metabolica autofagica/endocitica. Si potrebbe usare p62 come un marker per identificare il risultato clinico di diversi composti? P62 e' elevato in cellule umane CTNS^{-/-} ciPTEC.

I ricercatori hanno sviluppato un high throughput screening e scoperto che il composto N4 puo' ridurre i livelli di p62 e stimolare il flusso autofagico. In piu', migliora i lisosomi e protegge le cellule cistinotiche dallo stress ossidativo. Induce, oltretutto, la traslocazione di Nrf2 nel nucleo: Nrf2 e' un fattore trascrizionale che risponde allo stress ossidativo.

Queste caratteristiche sono state confermate in cellule primarie prossimo tubulari di topo.

La cisteamina non ripristina il pathway autofagico/endocitico, ma... quando il composto N4 viene somministrato a Zebrafish, pur non avendo un effetti sulla sopravvivenza delle larve CTNS^{-/-}, migliora la schiusa delle uova e, in congiunzione con la cisteamina, migliora parzialmente il pathway endocitico (Megalin, EEA1 e Rab11) e migliora anche il riassorbimento di destrosio (anche assunto da solo).

I ricercatori stanno testando diversi composti e stanno sviluppando un modello transgenico in ZF per studiare diverse mutazioni.

Livelli di cistina e analisi metabolica in cellule cistinotiche – Manoe Janssen e Amer Jamalpoor (Olanda)

I ricercatori usano in questo studio cellule PTEC (Proximal Tubular Epithelial Cells), che sono cellule immortalizzate condizionalmente derivanti da urina o biopsie renali.

Le cellule cistinotiche sono piu' sensibili al Disulfiram (che pero' e' tossico, vedi sopra) e Genistein (che non e' tossico).

I ricercatori hanno prodotto cellule CTNS^{-/-} isogeniche: le cellule PTEC sono transfettate con CRISPR/Cas9, che genera cellule cistinotiche. Queste cellule isogeniche sono simili a quelle dei pazienti

affetti da cistinosi. Altri pathways and metaboliti sono interessati in cellule cistinotiche, quali: cystine-cysteine-gluthatione, hypoxanthine pathway; acetyl-L-carnitine, betain e creatine pathway.

Questa nuova linea cellulare sara' usata per identificare altri pathways interessati nella speranza che in futuro, la terapia genica riparativa possa essere possibile.

Effetti della somministrazione di Genistein ai topi cistinotici – Laura Rega, Bambino Gesu' (Roma)

TFEB e' un fattore di trascrizione, il regolatore per eccellenza della network dei geni lisosomiali. L'attivazione di TFEB promuove la clearance dei lisosomi in un'altra malattia che interessa i lisosomi (mucopolysaccharidosis). L'attivazione di TFEB reduce i livelli di cistina, ripristina la morfologia aberrante dei lisosomi e migliora il processo rallentato del carico lisosomiale.

Genistein attiva TFEB e ha un buon profilo di sicurezza. E' un composto basato sulla soia, che e' conosciuta per rallentare la malattia renale.

I ricercatori usano topi femmine sia wt che CTNS^{-/-} con due diete: una di controllo e una con Genistein aggiunta, dai 2 ai 14 mesi.

Dal punto di vista della sicurezza, Genistein non influenza il peso (sia totale e dei singoli organi), la fertilita' non cambia e non si nota epatotossicita'.

Dal punto di vista dell'efficacia, Genistein migliora la funzione renale (eliminazione della creatinina), rallenta la proteinuria, ripristina parzialmente i livelli di mRNA di Megalin e cubilin in reni di topo CTNS^{-/-}; Genistein recupera la morfologia aberrante dei lisosomi nei reni CTNS^{-/-} (strutture LAMP-1) e vi riduce l'area dei cristalli di cistina. In general, Genistein rallenta la disfunzione renale.

La Genistein e' gia' approvata per uso umano (e' un antiossidante), ma non e' approvata per questa malattia dalla FDA.

Referenza: Rega LR, Polishchuk E, Montefusco S, Napolitano G, Tozzi G, Zhang J, Bellomo F, Taranta A, Pastore A, Polishchuk R, Piemonte F, Medina DL, Catz SD, Ballabio A, Emma F. Activation of the transcription factor EB rescues lysosomal abnormalities in cystinotic kidney cells. *Kidney Int.* 2016

Rigenerazione disadattata dei reni nella cistinosi – Fanny Arcolino, Belgio

I ricercatori hanno scoperto che pazienti cistinotici perdono cellule renali (podociti) e cellule progenitori renali (KPC) nell'urina, una perdita che e' 10 volte piu' alta di persone senza cistinosi. Questo viene definito una rigenerazione renale disadattata. Se la perdita di cellule e' maggiore dell'80%, il rene raggiunge lo stadio finale.

I ricercatori hanno isolato le cellule progenitori renali (KPC) e l'obiettivo e' di compiere una correzione/terapia cellulare attraverso l'aggiunta del gene CTNS via trasduzione lentivirale. Queste KPC corrette hanno la capacita' di integrarsi e differenziarsi in cellule renali funzionali.

Le KPC dei pazienti cistinotici crescono molto velocemente e possono differenziarsi sia in podociti funzionali (con alto influsso di Ca²⁺) o acquisire il fenotipo dei PTEC (Proximal Tubular Epithelial Cells).

La correzione del gene CTNS attraverso un self-inactivating lentivirus, causa un overespressione di CTNS che risulta in un livello ridotto di cistina nei podociti.

Questo e' un nuovo modello cellulare per studiare la cistinosi *in vitro* usando un metodo non-invasivo.

Conferenza Europea per la Cistinosi, 13-15 Luglio, Berlino

Il passo successivo sarà trasdurre i KPCs e trapiantarli, una volta corretti, in topi cistinotici.

Soppressione della mutazione nonsense come terapia per la cistinosi - Paul Goodyer, McGill University, Montreal

I due tipi di mutazioni più comuni nel gene CTNS sono:

1. Delezione di 57Kb (50% dei pazienti cistinotici europei). Per correggere questa mutazione, il gene dovrebbe essere completamente sostituito.
2. Mutazione nonsense W138X (20% dei pazienti Nord Americani and 50% dei pazienti Franco-Canadesi). Questa mutazione interrompe la traduzione del gene dato che inserisce un codone STOP prima del dovuto. La proteina che viene prodotta è quindi troncata e si deteriora. **Aminoglycoside** (NB124) è un antibiotico, come la gentamicina, che si lega al ribosoma creando plasticità e di conseguenza il ribosoma accetta un aminoacido e la traduzione può procedere. Questo antibiotico è tossico normalmente, ma si è trovato un modo di eliminarne la tossicità. NB124 ha perciò superato la Fase I (di sicurezza) nei test clinici.

Fibroblasti vengono transfettati con un gene CTNS esogeno con la mutazione nonsense W138X. Se NB124 viene aggiunto, il gene CTNS viene tradotto. NB124 permette una traduzione del gene CTNS sufficiente da ridurre i livelli di cistina in un modello di topo con mutazione nonsense di CTNS. I reni accumulano alti livelli di NB124 per 3/4 giorni successivi alla somministrazione e questo vi riduce l'accumulo di cistina.

Test clinici sono previsti in Canada (Montreal) e Nord America (Chicago, San Francisco) in 6/12 mesi, ma non saranno solo ristretti a quelle aree.

Difetti nel rimodellamento osseo in topi cistinotici – A. Taranta & A. Del Fattore, Bambino Gesù (Roma)

Il rachitismo è definito come un danneggiamento della mineralizzazione ossea. La sindrome di Fanconi causa la riduzione di fosfato e Vitamina D13 a causa delle perdite renali.

La cistinosi può quindi causare un difetto nelle cellule ossee? I ricercatori hanno analizzato *in vivo* il rimodellamento osseo in topi maschi CTNS^{-/-}. In topi CTNS^{-/-} di 1 mese senza la sindrome di Fanconi, sia i marker per gli osteoblasti che per gli osteoclasti sono ridotti (basso turnover osseo). In topi CTNS^{-/-} di 9 mesi, hanno anche trovato, oltre al basso turnover osseo, un aumento di cistina, difetti di differenziazione e riduzione della lunghezza del femore.

Il gene CTNS è espresso sia in osteoblasti che osteoclasti in topi wild type.

Biomarker alternativi per il monitoraggio terapeutico della cistinosi nefropatica – K Veys, Leuven (Belgio)

Ci sono parecchie difficoltà nel monitoraggio terapeutico dei livelli di cistina:

- Disponibilita' e costo dell'esame del livello della cistina leucocitaria (LCL)
- Competenza
- Affidabilita' (variazione nei diversi laboratori)
- Fattibilita', dato che c'è una finestra temporale per il prelievo

Conferenza Europea per la Cistinosi, 13-15 Luglio, Berlino

- Rilevanza clinica, dato che e' un parametro di breve durata
- Si puo' usare in trattamenti futuri?

I ricercatori stanno studiando due nuovi possibili marker dei livelli di cistina:

1. I macrofagi che sono attivati sotto stress producono **chitotriosidase**, un enzima che e' stato scoperto nella malattia di Gaucher. I cristalli di cistina attivano i macrofagi e la chitotriosidase e' stato trovato sia nel supernatante che nel lisato cellulare. L'attivita' della chitotriosidase e' elevata in pazienti cistinotici ed e' controllata con l'esame della macchia di sangue. Inoltre, in pazienti cistinotici, i marker infiammatori (come IL-1 β and IL-18) sono anch'essi elevati.
Studio: 2 anni, multicentro, 3 centri europei, 54 pazienti nefropatici (24 bambini e 38 adulti). L'attivita' della chitotriosidase e' elevata ed e' in correlazione con LCL e con la funzione renale (proteinuria).

2. **HD-OCT** – e' una tecnica non invasiva di diagnostica per immagini della pelle e mostra la deposizione dei cristalli di cistina e i segni sulla pelle. La cistinosi causa un danneggiamento della melanogenesi (ipopigmentazione dei capelli e della pelle), progressivi lineamenti ruvidi sul viso, lesioni e invecchiamento prematuro della pelle. Finora, la valutazione dell'accumulo di cistina sul corpo utilizzava un *in vivo* RCM (reflectance confocal microscopy) – Chiaverini et al, *J Am Acad Dermatol* 2013 -, ma i cristalli sotto la giunzione derma/epiderma non potevano essere visti.

HD-OCT permette una penetrazione piu' profonda (560 μ m), una visualizzazione in tempo reale, ricostruzione 3D, tempo veloce di acquisizione (30sec) e una buona risoluzione (3 μ m).

Descrizione: in pazienti cistinotici adolescenti, prima del trapianto renale, lo spessore dell'epidermide e delle papille dermali e' ridotto in modo significativo. Questo assottigliamento non e' correlato con LCL o la funzione renale e predice complicazioni extra-renali (cio' e' vero almeno per i pazienti con la delezione da 57Kb).

L'invecchiamento cutaneo viene controllato usando sia RCM che HD-OCT (in modo complementare).

Cystinosis Network Europe

Conferenza Europea per la Cistinosi, 13-15 Luglio, Berlino

Riassunto della sessione scientifica:

- Il composto 8-Br-cAMP, quando assunto con la cisteamina, può risanare difetti mitocondriali in ciPTEC CTNS ^{-/-} (Emma, Bambin Gesù’).
- Lo Zebrafish è un nuovo modello usato per studiare la cistinosi (Berlingiero, Belgio).
- Il composto N4 ha effetti benefici sia su cellule renali di topo che su Zebrafish CTNS ^{-/-} (De Leo, Bambino Gesù’).
- Cellule PTEC transfettate con CRISPR/Cas9 diventano cellule cistinotiche: le stanno usando per scoprire nuovi pathways (Janseen, Olanda).
- Genistein (usato in topi modello della cistinosi) migliora la funzione renale, rallenta la proteinuria e riduce l’area dei cristalli di cistina nei reni (Rega, Bambin Gesù’)
- Cellule progenitori renali (KPC) vengono corrette attraverso l’aggiunta del gene CTNS via trasduzione lentivirale: questo causa un’overespressione di CTNS che risulta in un livello ridotto di cistina. Nuovo modello cellulare per studiare la cistinosi. Il passo successivo sarà trasdurre le cellule KPCs e trapiantare i KPCs corretti in topi cistinotici (Arcolino, Belgio).
- L’antibiotico aminoglycoside (NB124) permette, in topi con cistinosi con mutazione nonsense W138X, di tradurre la proteina CTNS e ridurre i livelli di cistina soprattutto nei reni. Previsto uno studio clinico in Canada e Nord America fra 6/12 mesi (Goodyer, Canada).
- In topi maschi cistinotici, c’è un basso turnover osseo e difetti di differenziazione ossea (Taranta, Bambino Gesù’)
- Hanno trovato altri due metodi per monitorare i livelli di cistina: l’enzima chitotriosidase, prodotto dai macrofagi sotto stress, è elevato in pazienti cistinotici; l’HD-OCT è una tecnica a immagini per valutare l’accumulo di cistina nella pelle (Veys, Belgio)

Conferenza Europea per la Cistinosi, 13-15 Luglio, Berlino