

Con il patrocinio di



# Approcci multi-omici per l'identificazione di meccanismi patogenetici nella sindrome di Ehlers-Danlos vascolare



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA



Presidio Ospedaliero  
di Brescia

Sistema Socio Sanitario



Regione  
Lombardia

ASST Spedali Civili

**Marco Ritelli**

*Sezione di Biologia e Genetica*

*Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale*

*Laboratorio di Genetica Medica*

*ASST Spedali Civili di Brescia*

# Sindrome di Ehlers-Danlos vascolare (vEDS)

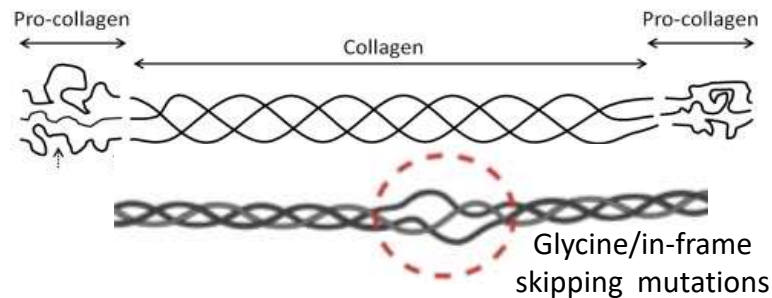
Prevalenza stimata 1/50.000-100.000 nati

Caratterizzata da gravi complicanze vascolari, intestinali e ostetriche

Trasmissione autosomica dominante, causata da mutazioni in *COL3A1*, 50% dei casi insorge *de novo*



Collagene di tipo III (COLLIII), componente fondamentale della matrice extracellulare (ECM) dei tessuti connettivi particolarmente abbondante nella cute, vasi sanguigni e organi cavi (cuore, polmone, intestino, utero)

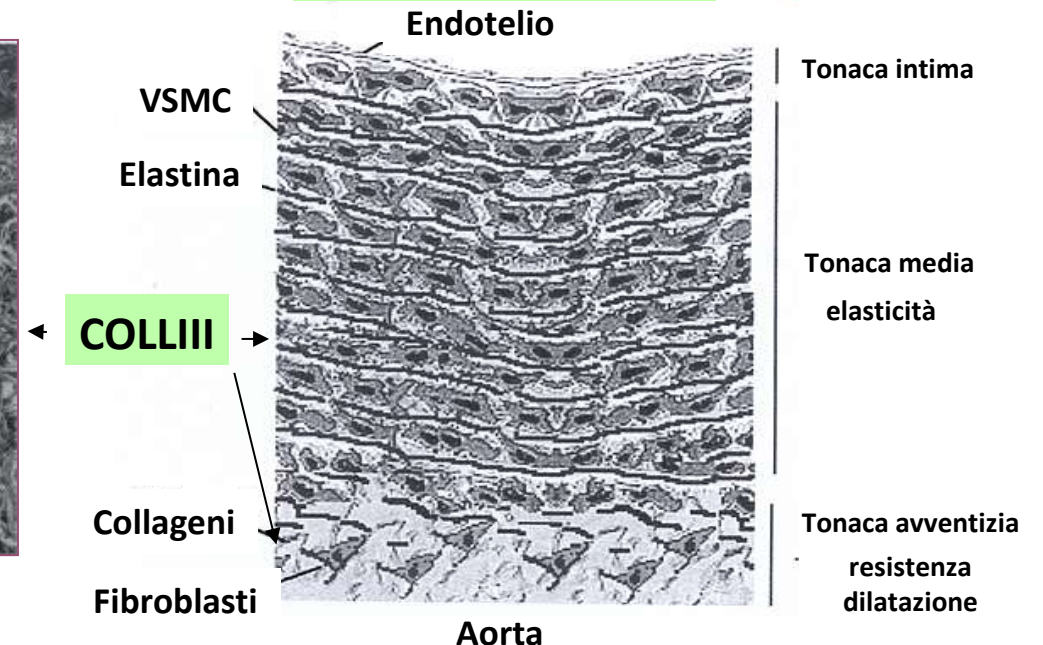


Derma sottocutaneo



Matrice extracellulare

Parete dei vasi sanguigni



La maggior parte delle varianti patogenetiche nel gene *COL3A1* sono sostituzioni missenso (Gly-X-Y) e varianti di splicing (in-frame) nel dominio collagenico  
**Effetto dominante negativo**

Alleli nulli (**aploinsufficienza**) sono rari associati a un fenotipo clinico meno severo

# Sindrome di Ehlers-Danlos vascolare (vEDS)

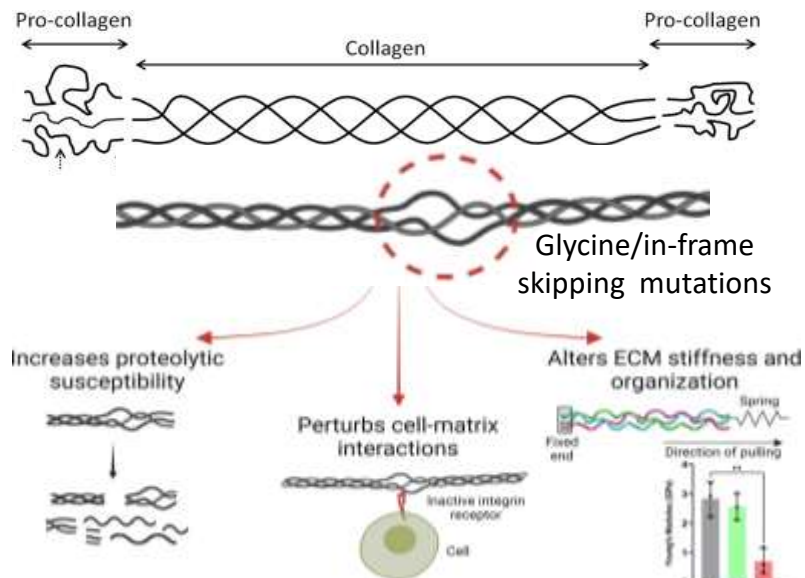
Prevalenza stimata 1/50.000-100.000 nati

Caratterizzata da gravi complicanze vascolari, intestinali e ostetriche

Trasmissione autosomica dominante, causata da mutazioni in *COL3A1*, 50% dei casi insorge *de novo*

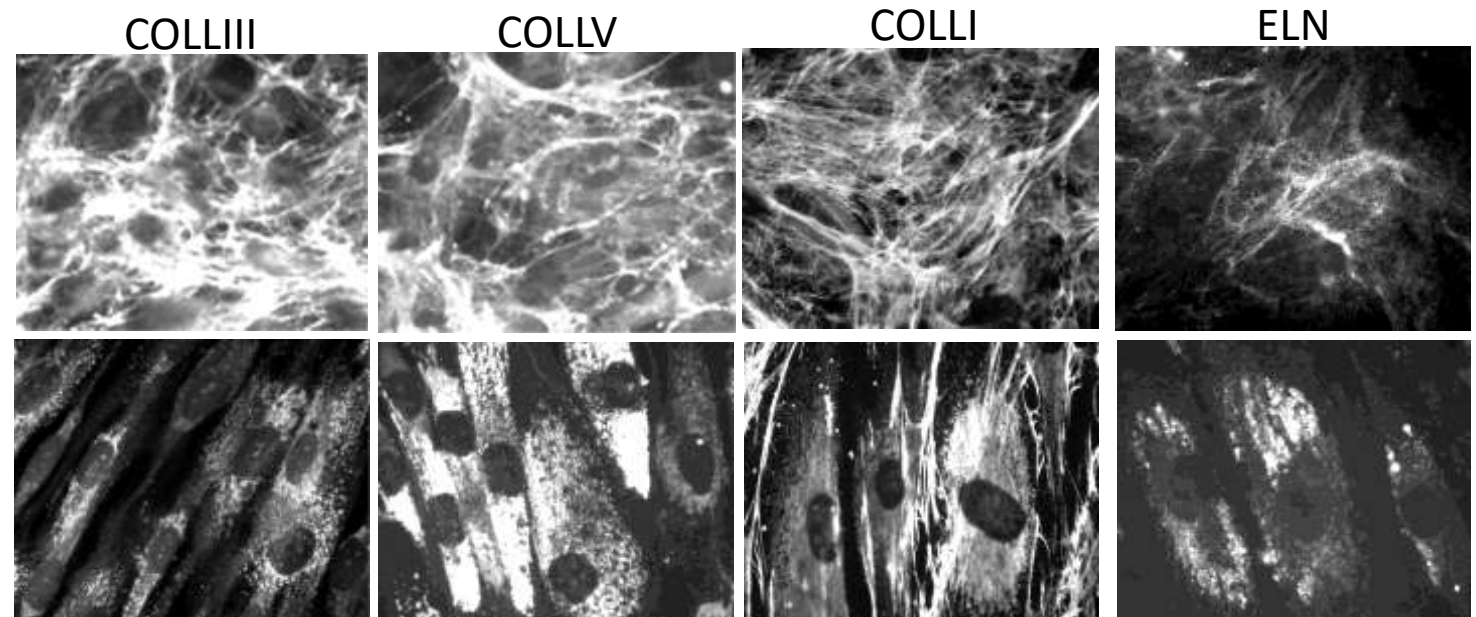


Collagene di tipo III (COLLIII), componente fondamentale della matrice extracellulare (ECM) dei tessuti connettivi particolarmente abbondante nella cute, vasi sanguigni e organi cavi (cuore, polmone, intestino, utero)



vEDS

Mutazioni con effetto dominante negativo in *COL3A1* riducono la disponibilità di COLLIII e alterano sia le interazioni cellula-matrice sia l'organizzazione e la resistenza meccanica dell'ECM



I fibroblasti dermici di pazienti affetti da vEDS presentano una disorganizzazione generalizzata della ECM  
COLL: collagene, ELN: elastina  
Zoppi et al., 2004 e 2012; Chiarelli et al., 2018



# Sindrome di Ehlers-Danlos vascolare (vEDS)

Prevalenza stimata 1/50.000-100.000 nati

Caratterizzata da gravi complicanze vascolari, intestinali e ostetriche

Trasmissione autosomica dominante, causata da mutazioni in *COL3A1*, 50% dei casi insorge *de novo*



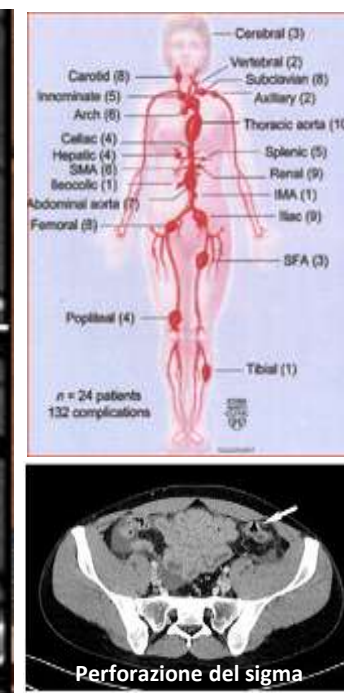
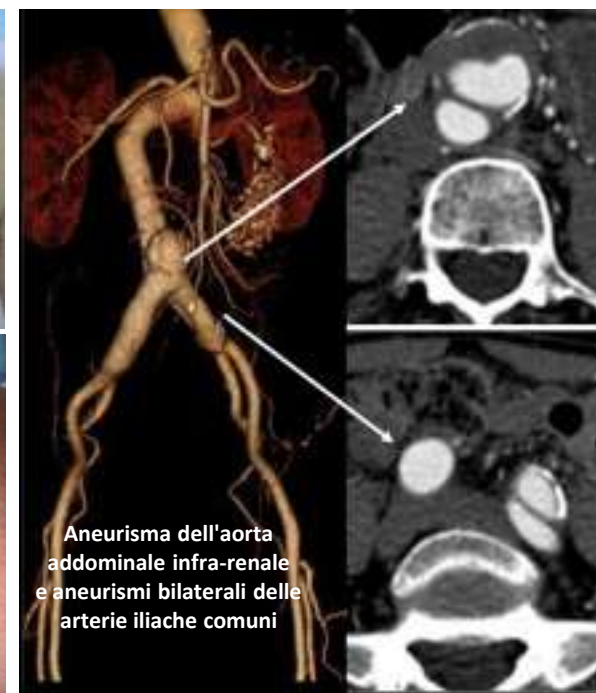
Collagene di tipo III (COLLIII), componente fondamentale della matrice extracellulare (ECM) dei tessuti connettivi particolarmente abbondante nella cute, vasi sanguigni e organi cavi (cuore, polmone, intestino, utero)

## Segni e sintomi della vEDS

- ✓ Cute sottile e trasparente con reticolo venoso evidente
- ✓ Marcata propensione alla formazione di ecchimosi
- ✓ Fragilità tissutale e d'organo



Mutazioni con effetto dominante negativo in *COL3A1* riducono la disponibilità di COLLIII e alterano sia le interazioni cellula-matrice sia l'organizzazione e la resistenza meccanica dell'ECM



## CRITERI DIAGNOSTICI MAGGIORI

- **Storia familiare di vEDS con mutazione nota (1)**
- **Rottura arteriosa in giovane età <40 anni (2)**
- **Perforazione spontanea del sigma** in assenza di malattia diverticolare nota o altre patologie intestinali **(3)**
- **Rottura uterina nel III trimestre** in assenza di precedente taglio cesareo e/o severe lacerazioni perineali peri-partum **(4)**
- **Fistola carotido-cavernosa** in assenza di traumi **(5)**

## CRITERI DIAGNOSTICI MINORI

Marcata propensione alla formazione di ecchimosi; Cute sottile e trasparente con reticolo venoso evidente; Facies caratteristica  
Pneumotorace; Acrogeria; Piede torto congenito; Lussazione congenita dell'anca; Ipermobilità delle piccole articolazioni  
Rottura di tendini e/o muscoli; Cheratocono; Recessione gengivale; Vene varicose a esordio precoce



### Sospetto diagnostico:

**criterio maggiore (1) o (2) o (3)** o pneumotorace in combinazione con altri segni suggestivi  
Il test genetico è indicato anche in presenza di una combinazione minima di criteri minori



**Facies:**  
Magrezza  
zigomi prominenti  
proptosi oculare  
naso e labbra sottili  
gote scavate  
lobo dell'orecchio  
ipoplasico



## CRITERI DIAGNOSTICI MAGGIORI

- **Storia familiare di vEDS con mutazione nota (1)**
- **Rottura arteriosa in giovane età <40 anni (2)**
- **Perforazione spontanea del sigma** in assenza di malattia diverticolare nota o altre patologie intestinali **(3)**
- **Rottura uterina nel III trimestre** in assenza di precedente taglio cesareo e/o severe lacerazioni perineali peri-partum **(4)**
- **Fistola carotido-cavernosa** in assenza di traumi **(5)**

## CRITERI DIAGNOSTICI MINORI

Marcata propensione alla formazione di ecchimosi; Cute sottile e trasparente con reticolo venoso evidente; Facies caratteristica  
Pneumotorace; Acrogeria; Piede torto congenito; Lussazione congenita dell'anca; Ipermobilità delle piccole articolazioni  
Rottura di tendini e/o muscoli; Cheratocono; Recessione gengivale; Vene varicose a esordio precoce



### Sospetto diagnostico:

**criterio maggiore (1) o (2) o (3)** o pneumotorace in combinazione con altri segni suggestivi  
Il test genetico è indicato anche in presenza di una combinazione minima di criteri minori



### COMPLICANZE VASCOLARI MAGGIORI

IN GRAN PARTE IMPROVVISE E INASPETTATE

Dissecazione o rottura di arterie  
di grosso/medio/piccolo calibro (80%)



### Complicanze gastrointestinali:

nel 30% dei pazienti, letali nel 3% dei casi  
la maggior parte colpisce il sigma (80%)  
rare le perforazioni di stomaco e intestino tenue

### Rottura d'organo:

Polmoni (pneumotorace 15%), utero, milza, fegato

### Complicanze operatorie e post-operatorie:

Fragilità tessuti/vasi, riparo difettoso, fistole, deiscenza delle suture

## PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI

2022-2023: Studio dei meccanismi patogenetici e identificazione di nuovi target nella sindrome di Ehlers-Danlos vascolare attraverso analisi del trascrittoma e miRNoma in fibroblasti dermici di pazienti

2024-2025: Esplorare i difetti della matrice extracellulare, della proteostasi e dell'autofagia nella sindrome di Ehlers-Danlos vascolare: un approccio proteomico e funzionale mirato

## RAZIONALE E OBIETTIVI DELLE RICERCHE

**Non esiste un trattamento risolutivo per la vEDS**

I trattamenti sono principalmente **sintomatici** (prevenzione vascolare con celiprololo/losartan) e **chirurgici**

Da un punto di vista biologico, nonostante il difetto di produzione/maturazione/organizzazione di COL1A1 sia considerato la causa principale della fragilità dei tessuti connettivi che si osserva nei pazienti

**le conoscenze sui meccanismi biologici alterati nella vEDS restano limitate**

**Definire i processi patofisiologici coinvolti nella vEDS e identificare potenziali target terapeutici**

mediante un'analisi multi-omica dei profili d'espressione di diverse specie di RNA

(analisi del trascrittoma – miRNoma) e delle proteine (analisi del proteoma)

in fibroblasti dermici di pazienti vEDS e di individui di controllo



2022-2023: Studio dei meccanismi patogenetici e identificazione di nuovi target nella sindrome di Ehlers-Danlos vascolare attraverso analisi del trascrittoma e miRNoma in fibroblasti dermici di pazienti

BBA - Molecular Basis of Disease 1870 (2024) 166915



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbadis](https://www.elsevier.com/locate/bbadis)



Deciphering disease signatures and molecular targets in vascular Ehlers-Danlos syndrome through transcriptome and miRNome sequencing of dermal fibroblasts

Nicola Chiarelli <sup>a,\*</sup>, Valeria Cinquina <sup>a</sup>, Paolo Martini <sup>a</sup>, Valeria Bertini <sup>a</sup>, Nicoletta Zoppi <sup>a</sup>, Marina Venturini <sup>b</sup>, Marco Ritelli <sup>a</sup>, Marina Colombi <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Biology and Genetics, Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, 25121 Brescia, Italy

<sup>b</sup> Division of Dermatology, Department of Clinical and Experimental Sciences, Spedali Civili University Hospital Brescia, 25121 Brescia, Italy



2022-2023: Studio dei meccanismi patogenetici e identificazione di nuovi target nella sindrome di Ehlers-Danlos vascolare attraverso analisi del trascrittoma e miRNoma in fibroblasti dermici di pazienti

## L'identificazione di variazioni d'espressione dell'RNA

sia di **geni codificanti proteine (mRNA\*)** che di **trascritti non codificanti (miRNA\* - regolatori dell'espressione/funzione degli mRNA)**

**in cellule di pazienti vEDS rispetto a cellule di donatori sani**

**permette di capire quali processi biologici sono potenzialmente alterati nella malattia anche *in vivo***

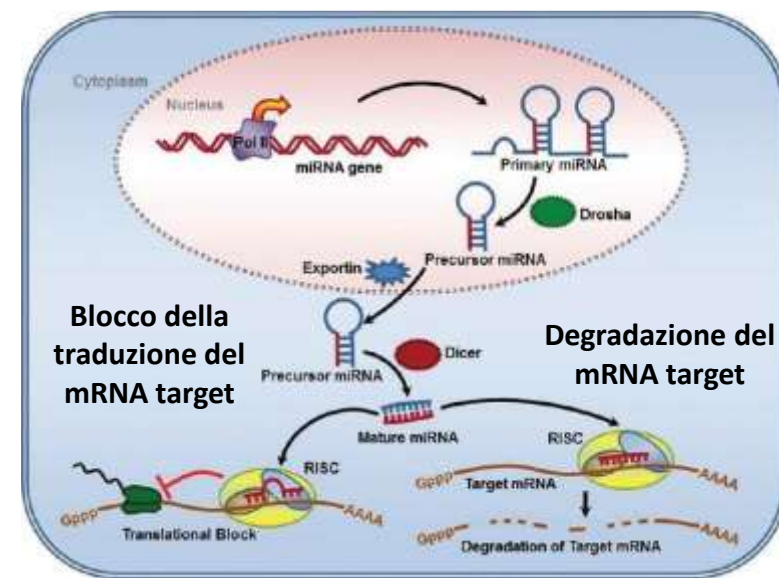
\*mRNA: RNA messaggero, \*miRNA: microRNA

I miRNA (20-22 nucleotidi) esercitano una regolazione post-trascrizionale molto complessa sugli mRNA

I miRNA hanno specifici mRNA target a cui si possono legare  
questo legame miRNA-mRNA è in grado di

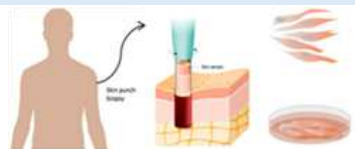
- **indurre la degradazione del target**
- **reprimere la traduzione (sintesi della proteina codificata dal target)**

Ogni miRNA (~3000) può interagire anche con più di 500 mRNA bersaglio e un singolo mRNA può essere regolato da decine di miRNA diversi



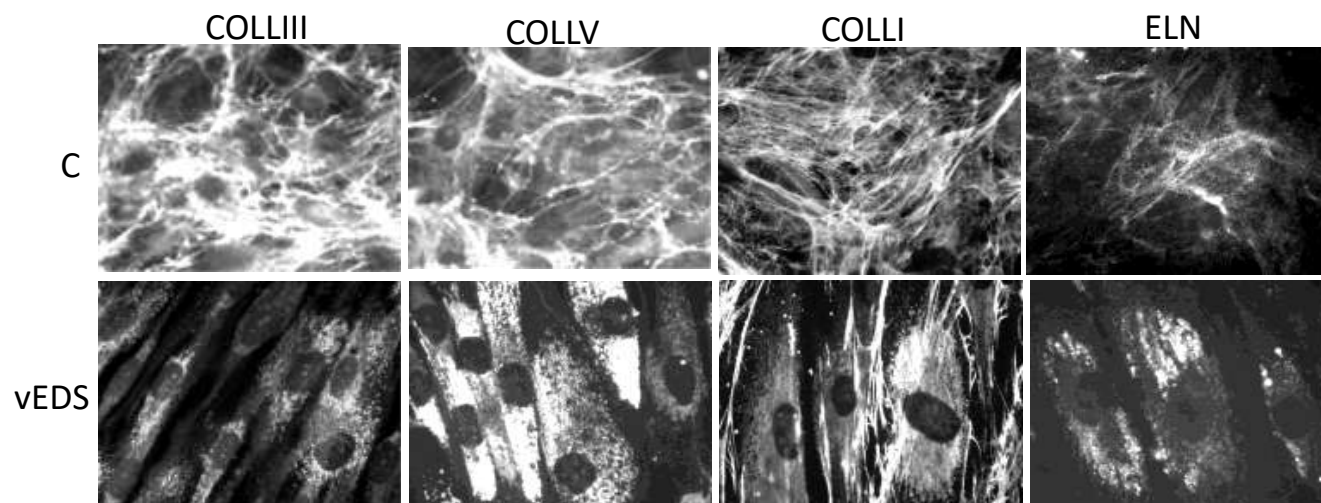
## Coorte di studio

- 36 donatori sani (30 F, 6 M)
- 18 vEDS (10 F, 8 M)



## Biopsia cutanea e caratterizzazione cellulare

Tutti i fibroblasti dermici vEDS inclusi nello studio presentano  
**una disorganizzazione generalizzata dell'ECM**



COLL: collagene; ELN: elastina

| Pazienti | Mutazione          | Effetto           | Posizione |
|----------|--------------------|-------------------|-----------|
| P.1      | c.3417+1G>A        | Skipping esone 47 | Int47     |
| P.2      | c.1761+1G>A        | Skipping esone 25 | Int25     |
| P.3      | c.2897G>T          | p.Gly966Val       | Ex41      |
| P.4      | c.2797G>A          | p.Gly933Arg       | Ex40      |
| P.5      | c.1835G>A          | p.Gly612Asp       | Ex27      |
| P.6      | c.2986G>A          | p.Gly996Arg       | Ex42      |
| P.7      | c.951+6T>C         | Skipping esone 47 | Int14     |
| P.8      | c.3508G>A          | p.Gly1170Ser      | Ex48      |
| P.9      | c.674G>A           | p.Gly225Asp       | Ex9       |
| P.10     | c.709G>A           | p.Gly237Arg       | Ex10      |
| P.11     | c.1655G>A          | p.Gly552Glu       | Ex24      |
| P.12     | c.2077G>A          | p.Gly693Arg       | Ex31      |
| P.13     | c.3509G>A          | p.Gly1170Asp      | Ex48      |
| P.14     | c.836G>A           | p.Gly279Asp       | Ex12      |
| P.15     | c.3563G>T          | p.Gly1188Val      | Ex49      |
| P.16     | c.1808G>A          | p.Gly603Asp       | Ex26      |
| P.17     | c.2607+4_2607+7del | Skipping esone 38 | Int38     |
| P.18     | c.3509G>A          | p.Gly1170Asp      | Ex48      |

**Effetto dominante negativo:** 14 missenso di una glicina e 4 in-frame splicing

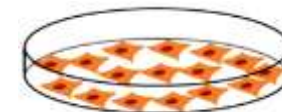
## Purificazione RNA totale

### Fibroblasti di controllo (36)

sequenziati tutti come replicati biologici  
(differenti estrazioni di RNA)

### Fibroblasti vEDS (18)

sequenziati tutti come replicati biologici  
(differenti estrazioni di RNA)



## Preparazione delle librerie e sequenziamento

### 1. Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression panel

### 2. QIAseq miRNA Library Kit

permettono di quantificare i livelli di espressione  
di **20.802 geni (mRNA)** e **tutti i miRNA** con NGS Ion S5



## Analisi dell'espressione genica differenziale

### Transcriptome Analysis Console/DESeq2 R package

criteri di filtraggio per **identificare geni/miRNA differenzialmente espressi (DEGs/DEmiRNAs)**  
ANOVA, *fold-change*  $\pm 1.5$ ; p-value  $< 0.05$  (Benjamini & Hochberg)

Transcriptome  
Analysis Console

## Analisi bioinformatiche sul significato biologico dei DEGs e DEmiRNA



### Analisi di Gene Ontology (GO)

Identificazione di tutti i potenziali mRNA target dei DEmiRNAs  
Costruzione di possibili network di interazioni tra DEmiRNA-DEGs

mRWalk

DIANA TOOLS

miRBase

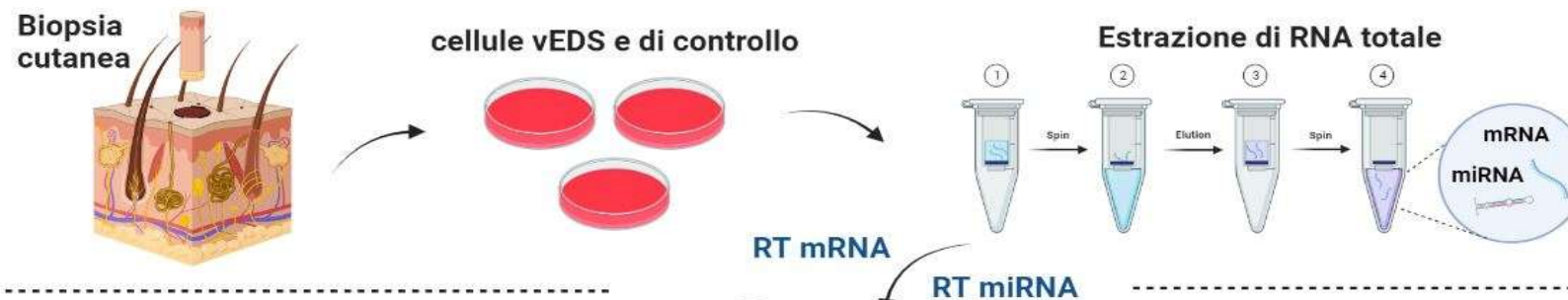
**ATTRAVERSO L'ANALISI DI GO È POSSIBILE CLASSIFICARE TUTTI I GENI/PROTEINE  
IN BASE ALLA LORO FUNZIONE SVOLTA ALL'INTERNO DELLE CELLULE  
E COLLOCARLI NEI PRINCIPALI PROCESSI BIOLOGICI POTENZIALMENTE DEREGOLATI**





# Analisi del trascrittoma - miRNoma

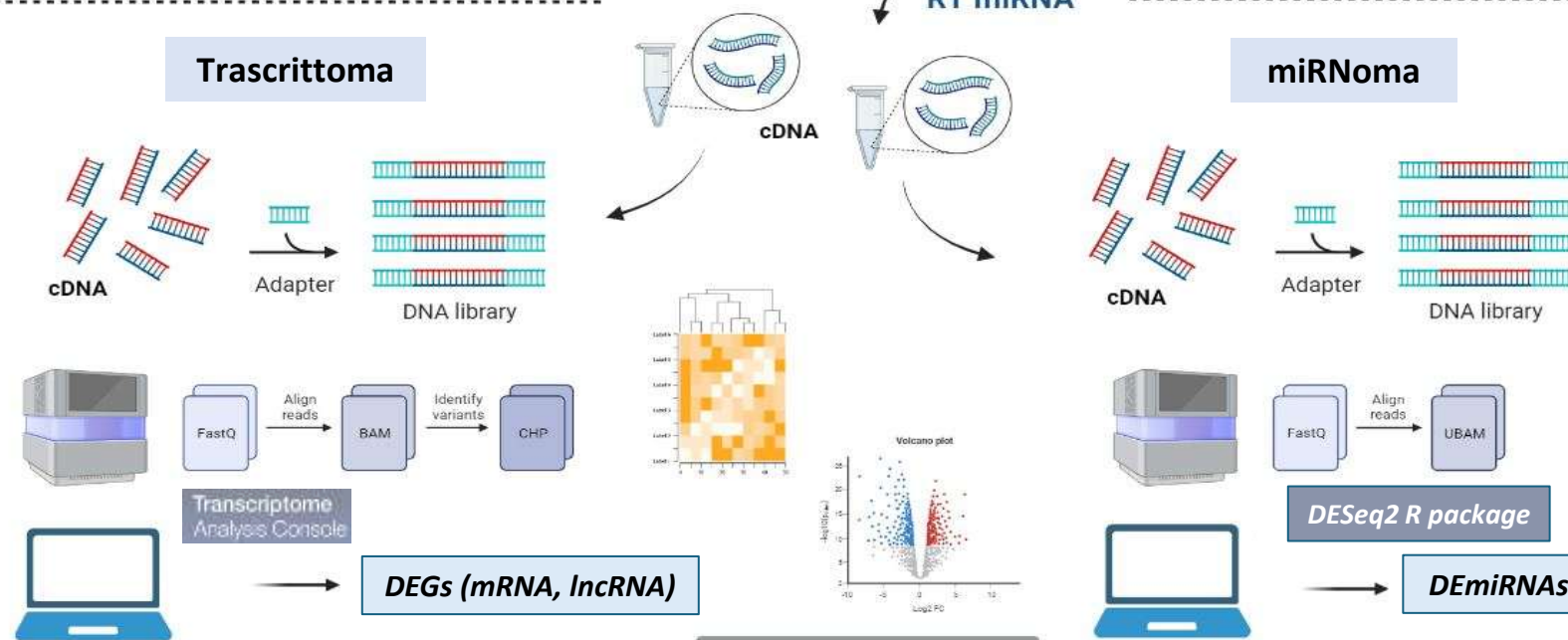
Purificazione  
RNA totale



Preparazione delle  
librerie e  
sequenziamento

Trascrittoma

miRNoma



Analisi  
dell'espressione  
genica differenziale

Analisi  
bioinformatiche  
sul significato  
biologico dei DEGs  
e DE-miRNA



vEDS vs. cellule di controllo:

3.189 geni espressi in maniera differenziale (DEGs)

➤ 571 con espressione aumentata

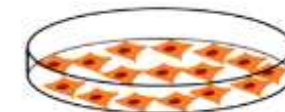
➤ 2.618 con una espressione diminuita

vEDS vs. cellule di controllo:

137 miRNAs espressi in maniera differenziale (DE-miRNAs)

➤ 66 con espressione aumentata

➤ 71 con una espressione diminuita



Transcriptome  
Analysis Console

mRWalk

DIANA TOOLS

miRBase

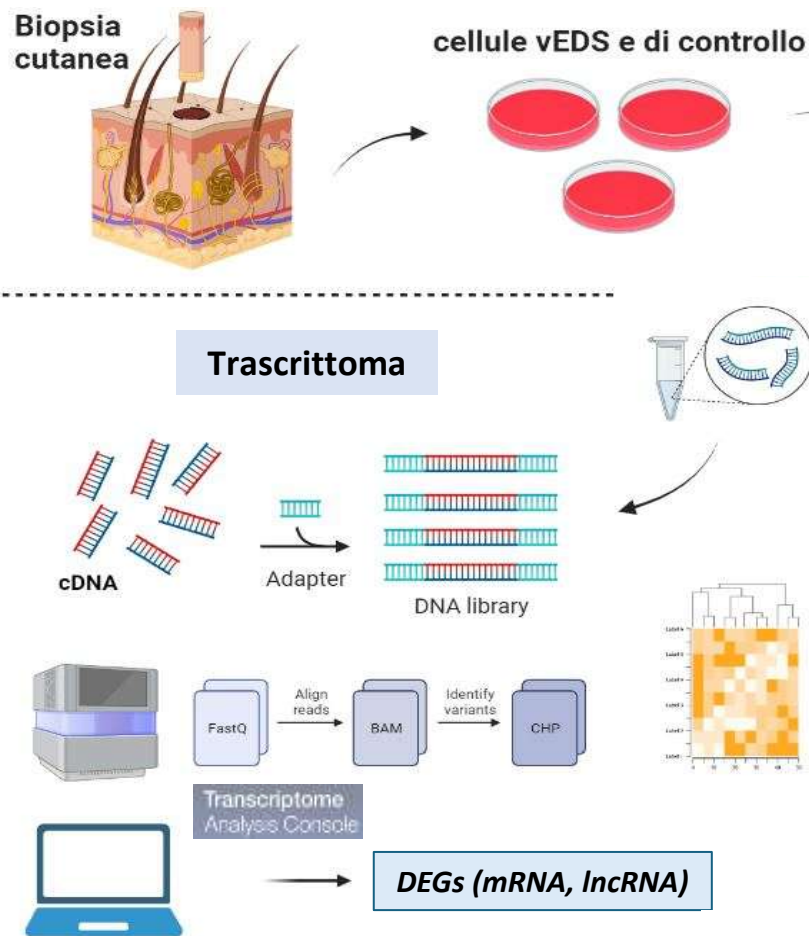


Purificazione  
RNA totale

Preparazione delle  
librerie e  
sequenziamento

Analisi  
dell'espressione  
genica differenziale

Analisi  
bioinformatiche  
sul significato  
biologico dei DEGs



vEDS vs. cellule di controllo:

3.189 geni espressi in maniera differenziale (DEGs)

➤ 571 con espressione aumentata

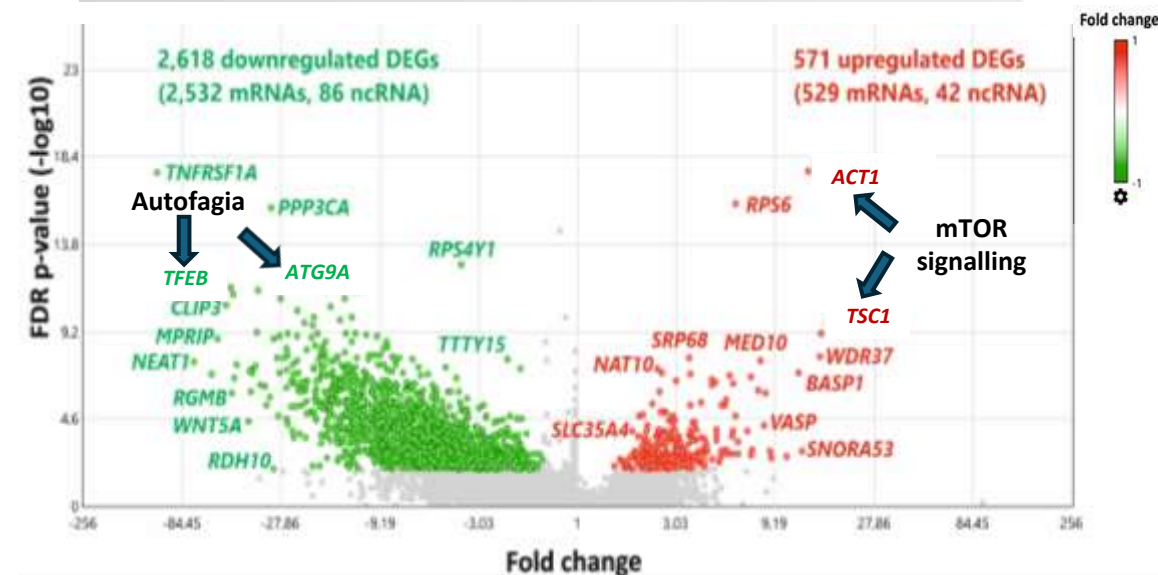
➤ 2.618 con una espressione diminuita

Principal component analysis (PCA)

72 campioni di controllo

I due gruppi sperimentali  
hanno una netta differenza  
di espressione genica

36 campioni vEDS

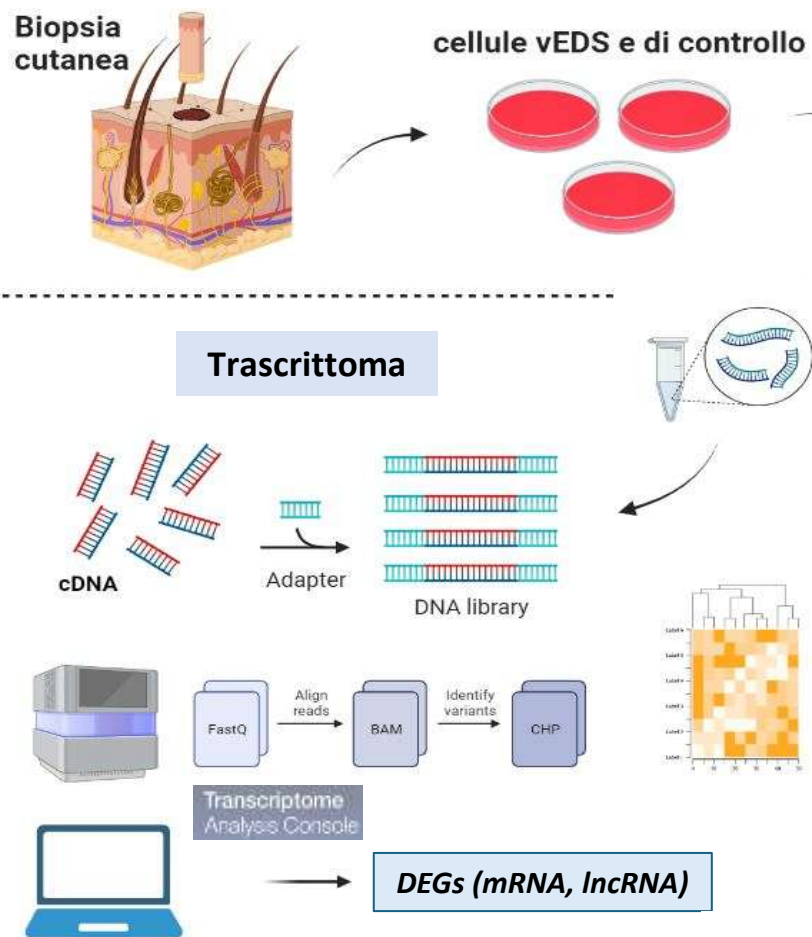


Purificazione  
RNA totale

Preparazione delle  
librerie e  
sequenziamento

Analisi  
dell'espressione  
genica differenziale

Analisi  
bioinformatiche  
sul significato  
biologico dei DEGs



vEDS vs. cellule di controllo:

3.189 geni espressi in maniera differenziale (DEGs)

➤ 571 con espressione aumentata

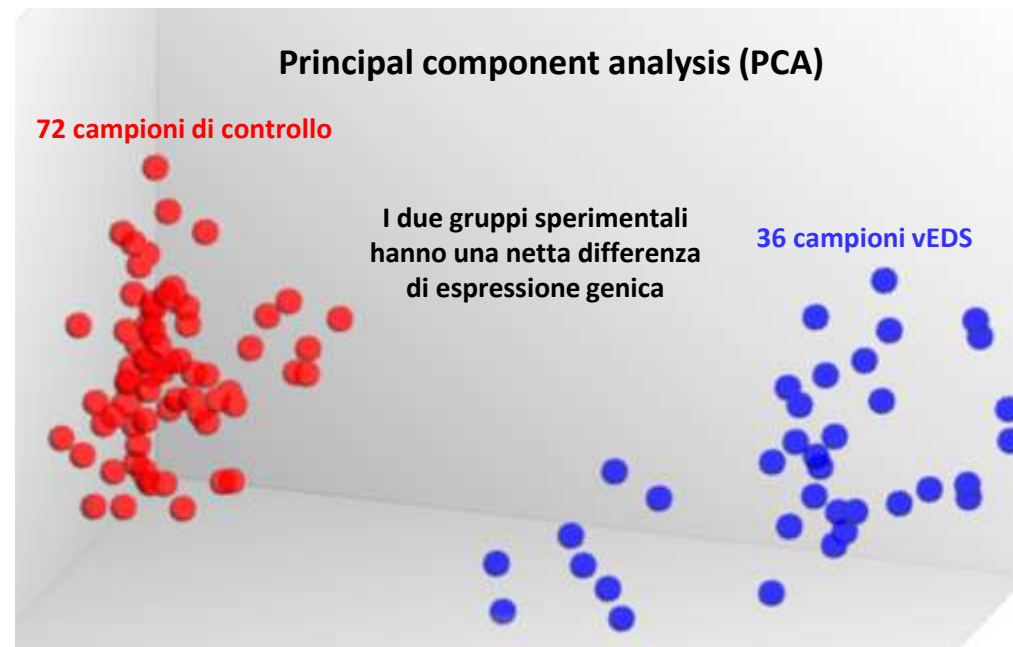
➤ 2.618 con una espressione diminuita

Principal component analysis (PCA)

72 campioni di controllo

I due gruppi sperimentali  
hanno una netta differenza  
di espressione genica

36 campioni vEDS



Analisi di GO

78 funzioni molecolari e 145 processi biologici  
significativamente alterati dai 3.189 DEGs





## Analisi di GO

78 funzioni molecolari e 145 processi biologici significativamente alterati dai 3.189 DEGs



| DEGs in vEDS vs. controlli                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Processi biologici alterati a causa dell'espressione differenziale                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>TFEB, ATG9A, GABARAP, UVRAG, GABARAPL1, ATP6AP2, ATP6V1A, WIPI1, VMP1, LAMP1, JMY, MAP1LC3A, CHMP2B, CHMP1A, CHMP4B, CHMP3, SNAP29 .....</i>                                                                                                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Perturbazione dell'autofagia:</b> processo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e per la risposta allo stress attraverso il quale la cellula degrada componenti citoplasmatici danneggiati, organelli malfunzionanti e proteine non correttamente assemblate e/o alterate</li> </ul>                                                                                                                   |
| <i>COL5A1, COL7A1, COL15A1, LAMC1, ADAM19, ADAM12, CANX, PDIA3, P3H1, ERP29, P4HB, TBCEL, HSPG, WIPF1, GNAI1, DNAJB5, GRPEL2, CCT3, CCT5, TXNDC5, HSPA1A, HSPA9, HSPA4L, SEC4A, PTGES3, TTC1, CLPX, PDCL3, DNAJB5, DNAJC1, DNAJC5, CDC37, DNAJA2, ATF6, PPID, TRAM1, EDEM1, HSPB7, TMBIM6, STT3B, TOR1B .....</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Alterazione dell'omeostasi dell'ECM</b> che coinvolge componenti strutturali essenziali per l'integrità dei vasi sanguigni (collageni, glicoproteine, proteoglicani) e enzimi deputati alla maturazione delle proteine strutturali dell'ECM</li> <li><b>Alterazioni dell'omeostasi del reticolo endoplasmatico (ER)</b> e delle funzioni correlate alla degradazione delle proteine non correttamente conformate</li> </ul> |
| <i>RB1, DYRK3, CCNT1, WASL, SMC3, USP39, TRIOBP, CDC73, SMC2, PPP1CC, CASP2, CASP7, NRAS....</i>                                                                                                                                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Alterazioni della proliferazione e morte cellulare (apoptosi)</b></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <i>MRPS17, RPL5, MRPS15, MRPL36, RPL8, MRPL35, YARS2, RPL6, RPS15, MRPL3, RPL36AL.....</i>                                                                                                                                                                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Alterazioni del processamento dell'mRNA e della sintesi proteica</b></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <i>AKT1, TSC1, EIF2B5, EIF2S3, RPS6, EIF2S1, MIOS, PRKCA, TSC2, PTEN, NRAS, IRS1, FZD6, SLC38A9, GRB10, PPP1CC, DYRK3, DYRK1A .....</i>                                                                                                                                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Alterazione della via di segnalazione di mTOR e di PKC</b>, coinvolte nella regolazione della crescita, motilità e sopravvivenza cellulare, nonché nella trascrizione genica, sintesi proteica, e autofagia</li> </ul>                                                                                                                                                                                                      |

In **verde** sono indicati i geni espressi in **quantità ridotta** e in **rosso** quelli espressi in **quantità maggiore** nelle cellule dei pazienti

**vEDS vs. cellule di controllo:**

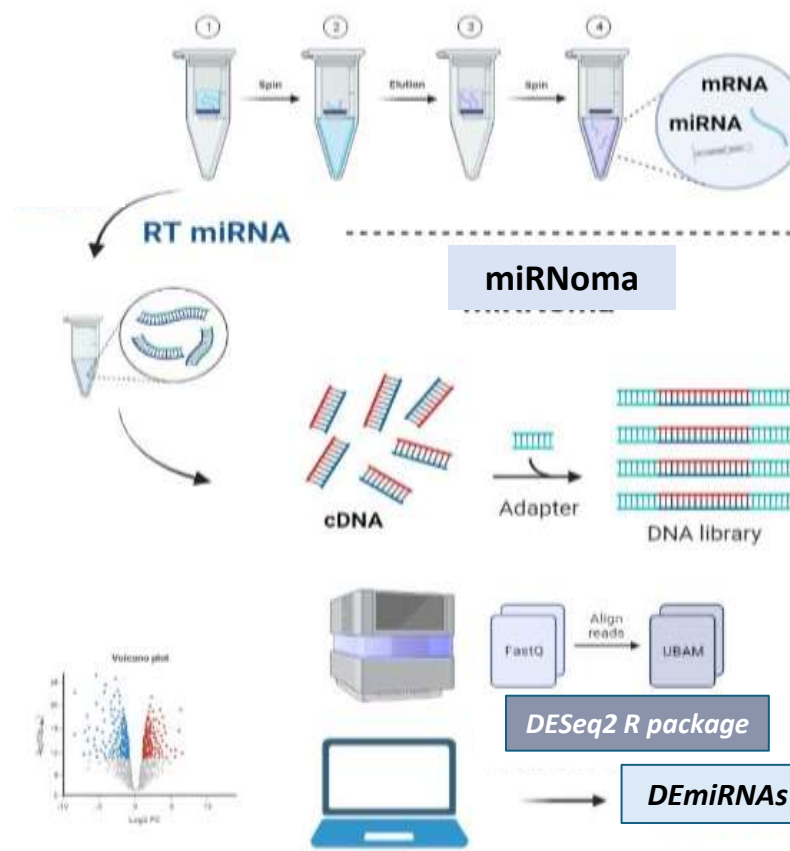
**137 miRNAs espressi in maniera differenziale (DE-miRNAs)**

- **66 up-regolati**
- **71 down-regolati**

I miRNA hanno specifici mRNA bersaglio/target a cui si possono legare e questo legame miRNA-mRNA è in grado di

- **indurre la degradazione del target**
- **reprimere la traduzione (sintesi della proteina codificata dal target)**

Ogni miRNA può interagire anche con più di 500 mRNA bersaglio e un singolo mRNA può essere regolato da decine di miRNA diversi



**Purificazione  
RNA totale**

**Preparazione delle  
librerie e  
sequenziamento**

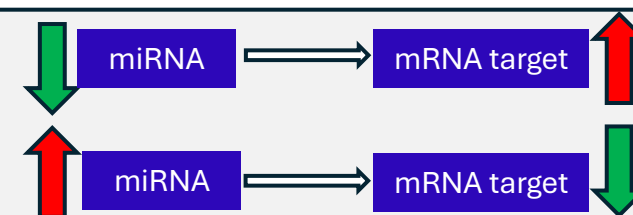
**Analisi  
dell'espressione  
genica differenziale**

**Analisi  
bioinformatiche  
sul significato  
biologico dei  
DEmiRNA**

**Analisi bioinformatiche  
per identificare tutti i  
potenziali mRNA target**



**Comparazione mRNA target dei 137 DEmiRNA  
(66 up e 71 down) con la lista dei 3.189 DEGs  
(571 up e 2.618 down) in vEDS vs controlli**



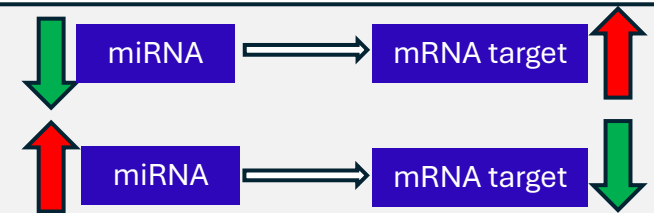
Analisi bioinformatiche  
per identificare tutti i  
potenziali mRNA target

mRWalk

DIANA TOOLS

miRBase

Comparazione mRNA target dei 137 DEmiRNA  
(**66 up** e **71 down**) con la lista dei 3.189 DEGs  
(**571 up** e **2.618 down**) in vEDS vs controlli



Potenziali mRNA target dei DEmiRNA (137): 12.639

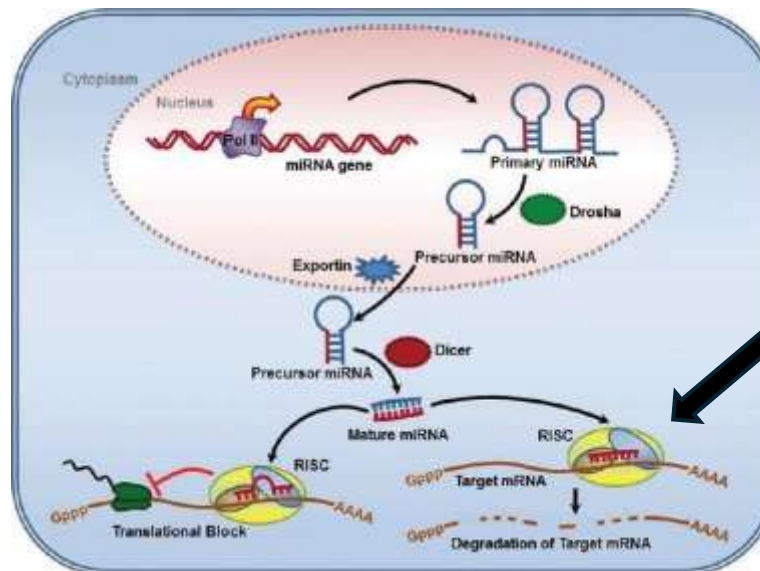
mRNA target che sono DEGs (3.189): 2.133

Potenziali target dei **DEmiRNA down** (71): 9.864

mRNA target che sono **DEGs up** (571): **352**

Potenziali target dei **DEmiRNA up** (66): 10.093

mRNA target che sono **DEGs down** (2.618): **1.781**



Degradazione  
del mRNA target



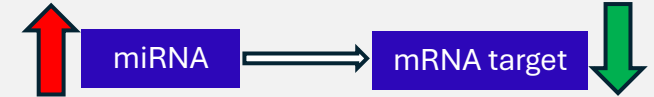
Analisi bioinformatiche  
per identificare tutti i  
potenziali mRNA target

miRWalk

DIANA TOOLS

miRBase

Comparazione mRNA target dei 137 DEmiRNA  
(66 up e 71 down) con la lista dei 3.189 DEGs  
(571 up e 2.618 down) in vEDS vs controlli



Potenziali mRNA target dei DEmiRNA (137): 12.639

mRNA target che sono DEGs (3.189): 2.133

Potenziali target dei DEmiRNA up (66): 10.093

mRNA target che sono DEGs down (2.618): 1.781

Potenziali target del miR-29b-3p: 974

mRNA target del miR-29b-3p che sono DEGs down: 171

Numerose evidenze scientifiche indicano che **il miR-29b è coinvolto nella patogenesi degli aneurismi aortici** in diverse altre connettivopatie a prevalente interessamento vascolare (sindrome di Marfan, forme non sindromiche di aneurismi/dissezioni aortiche)

In modelli murini di sindrome di Marfan, il **miR-29b risulta up-regolato** e **contribuisce alla formazione di aneurismi aortici** interferendo con la corretta organizzazione di **collagene I, III, V ed elastina** compromettendo l'integrità strutturale della ECM e determinando una maggiore fragilità della parete vascolare

- Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development Maegdefessel et al. *J Clin Invest.* 2012
- MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development Maegdefessel et al. *Trends Cardiovasc Med.* 2014
- miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome Merk et al. *Circ Res.* 2012
- Long-term miR-29b suppression reduces aneurysm formation in a Marfan mouse model Okamura et al. *Physiol Rep.* 2017
- MicroRNAs as therapeutic targets in cardiovascular disease Laggerbauer et al. *J Clin Invest* 2022
- ecc.

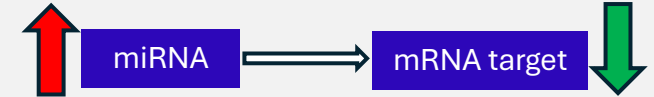
Analisi bioinformatiche  
per identificare tutti i  
potenziali mRNA target

mRWalk

DIANA TOOLS

miRBase

Comparazione mRNA target dei 137 DEmiRNA  
(**66 up** e **71 down**) con la lista dei 3.189 DEGs  
(**571 up** e **2.618 down**) in vEDS vs controlli



Potenziali mRNA target dei DEmiRNA (137): 12.639

mRNA target che sono DEGs (3.189): 2.133

Potenziali target dei **DEmiRNA up (66)**: 10.093

mRNA target che sono **DEGs down (2.618)**: 1.781

Potenziali target del **miR-29b-3p**: 974

mRNA target del **miR-29b-3p** che sono **DEGs down**: 171



**DEGs down-regolati che sono dei target del miR-29b-3p**

Processi biologici potenzialmente alterati  
da questa interazione **miR-29b-3p** ↑ - **DEGs** ↓

*Collageni e glicoproteine (COL5A1, COL15A1, COL7A1, NID2, LAMC1), enzimi che modificano i collageni (ADAM12, ADAM19, P3H1), geni coinvolti nell'autofagia e degradazione lisosomiale - proteasomale (TFEB, ATG9A, LAMP1, ATP6V1A1, WDR26, RMND5A, FEM1B, MDM2), nella regolazione dell'espressione genica e organizzazione della cromatina (BTG2, SETDB2, DNMT3A, DICER1, SIRT1, CNOT1, CNOT6, AGO1, REL, DCP2, POLE3) e nell'apoptosi (CASP2, CASP9, NRAS)*

- Organizzazione e integrità dell'ECM
- Autofagia e processi catabolici nel proteasoma e lisosoma
- Omeostasi del reticolo endoplasmatico
- Regolazione dell'espressione genica
- Proliferazione cellulare e apoptosi



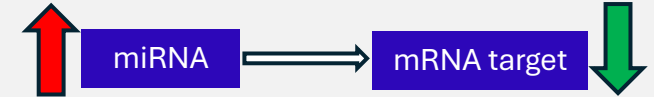
Analisi bioinformatiche  
per identificare tutti i  
potenziali mRNA target

miRWalk

DIANA TOOLS

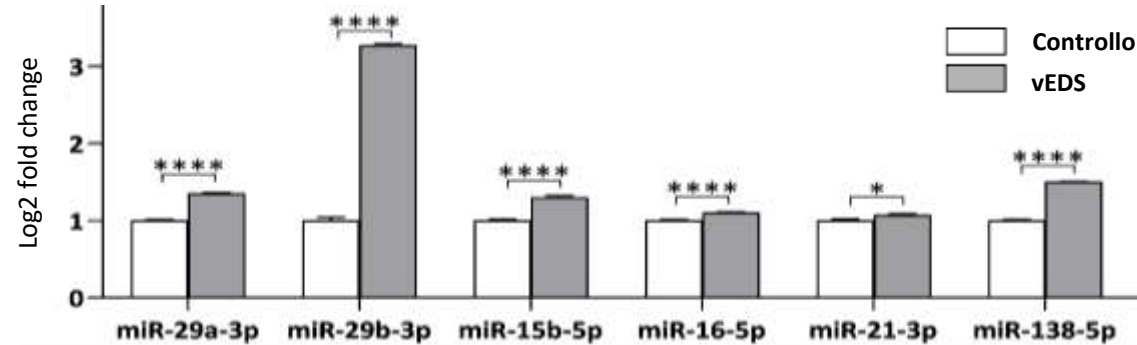
miRBase

Comparazione mRNA target dei 137 DE miRNA  
(66 up e 71 down) con la lista dei 3.189 DEGs  
(571 up e 2.618 down) in vEDS vs controlli



Potenziali target dei DE miRNA up (66): 10.093

mRNA target che sono DEGs down (2.618): 1.781



| miRNAs deregolati                                                        | Processi biologici potenzialmente perturbati da questi miRNAs                                                                                                                                                                                                                                               | Geni target dei miRNAs che sono downregolati in vEDS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>miR-29a-3p</b><br><b>miR-29b-3p</b><br><b>miR-138-5p</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Organizzazione e integrità strutturale dell'ECM</li> <li>Rimodellamento della parete dei vasi sanguigni e potenziale coinvolgimento nella formazione di aneurismi aortici</li> <li>Autofagia, crescita cellulare e morte cellulare</li> </ul>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Collageni <b>COL5A1</b>, <b>COL7A1</b>, <b>COL15A1</b></li> <li>Enzimi che modificano l'ECM <b>ADAM19</b>, <b>ADAM12</b></li> <li>Geni coinvolti nell'autofagia: <b>ATG9A</b>, <b>TFEB</b>, <b>LAMP1</b>, <b>PTEN</b>, e nell'apoptosi: <b>CASP7</b>, <b>NRAS</b>, <b>CASP2</b></li> </ul>                                                                                                                                                                                             |
| <b>miR-15b-5p</b><br><b>miR-16-5p</b><br><b>miR-21-3p</b><br><b>ecc.</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Autofagia, crescita cellulare e morte cellulare</li> <li>Corretta maturazione delle proteine e dei mitocondri</li> <li>Via di segnalazione intracellulare del complesso proteico mTOR che regola l'autofagia, la crescita cellulare e la sintesi proteica</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Geni coinvolti nell'autofagia: <b>ATG9A</b>, <b>NRAS</b>, <b>LAMP1</b>, <b>ATG10</b>, <b>PTEN</b></li> <li>Geni coinvolti nella corretta maturazione delle proteine: <b>SEC24A</b>, <b>DNAJC5</b>, <b>HSPA4L</b></li> <li>Geni coinvolti nel funzionamento dei mitocondri: <b>GABARAPL1</b>, <b>USP15</b>, <b>NRAS</b>, <b>ATG9A</b></li> <li>Geni coinvolti nella via del segnale intracellulare di mTOR: <b>PTEN</b>, <b>NRAS</b>, <b>IRS1</b>, <b>FZD6</b>, <b>GRB10</b></li> </ul> |



Analisi bioinformatiche  
per identificare tutti i  
potenziali mRNA target

mRWalk

DIANA TOOLS

miRBase

Comparazione mRNA target dei 137 DE miRNA  
(**66 up** e **71 down**) con la lista dei 3.189 DEGs  
(**571 up** e **2.618 down**) in vEDS vs controlli

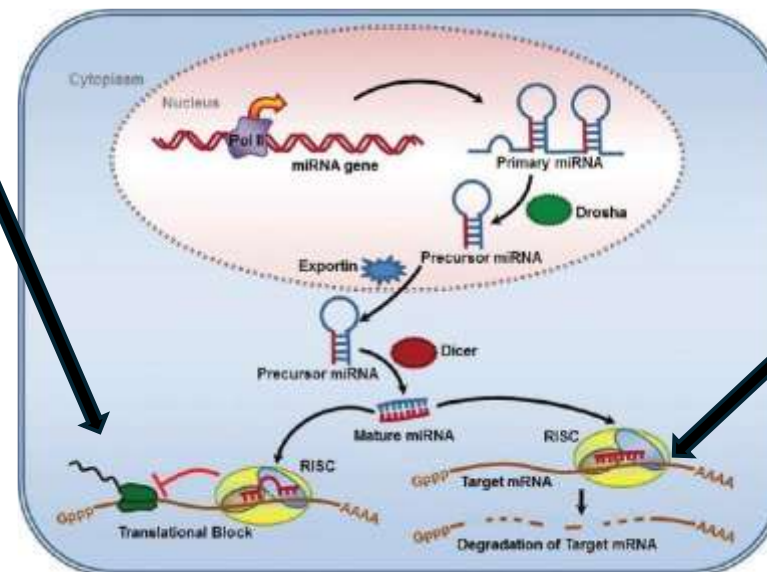


Potenziali target dei **DE miRNA up (66)**: 10.093

mRNA target che sono **DEGs down (2.618)**: 1.781



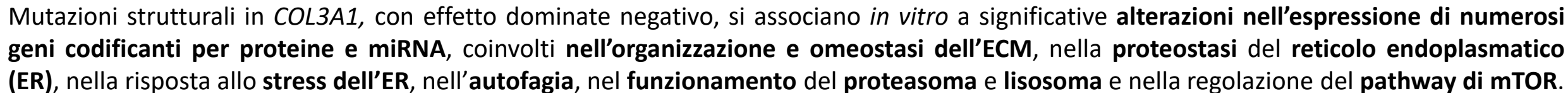
Inibizione della  
traduzione del  
mRNA target



Degradazione  
del mRNA target

## Article Integrative Multi-Omics Approach in Vascular Ehlers–Danlos Syndrome: Further Insights into the Disease Mechanisms by Proteomic Analysis of Patient Dermal Fibroblasts

Nicola Chiarelli <sup>1,\*</sup>, Valeria Cinquina <sup>1</sup>, Nicoletta Zoppi <sup>1</sup>, Valeria Bertini <sup>1</sup>, Marianna Maddaluno <sup>2,3</sup>, Chiara De Leonibus <sup>2,3</sup>, Carmine Settembre <sup>2,3</sup>, Marina Venturini <sup>4</sup>, Marina Colombi <sup>1</sup> and Marco Ritelli <sup>1,\*</sup>

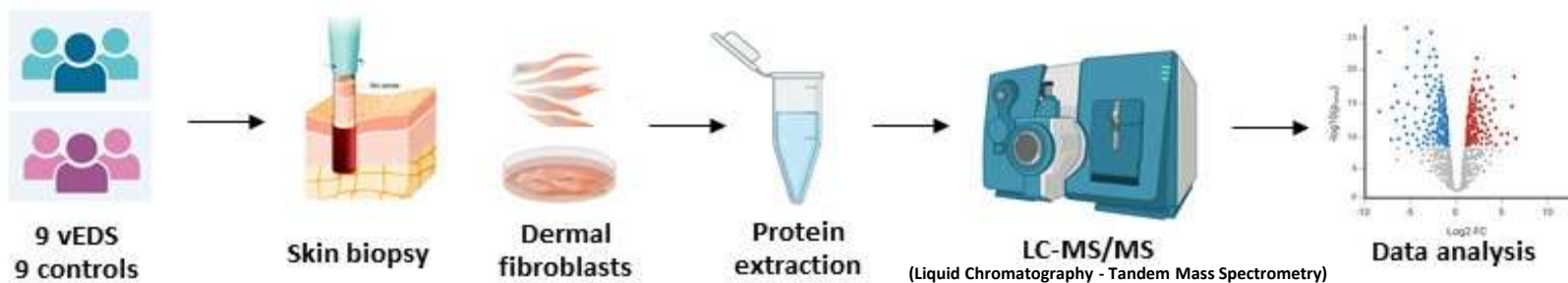


# Analisi del proteoma intracellulare



Dr. Carmine Settembre  
Telethon Institute of Genetics  
and Medicine (TIGEM) Pozzuoli

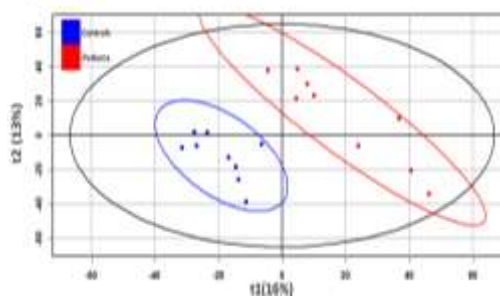
## Proteome analysis



Student's t-test, q-value < 0.05  
log2 fold change  $\geq \pm 1$

**Proteine differenzialmente  
esprese (DEPs)**

## Principal component analysis (PCA)

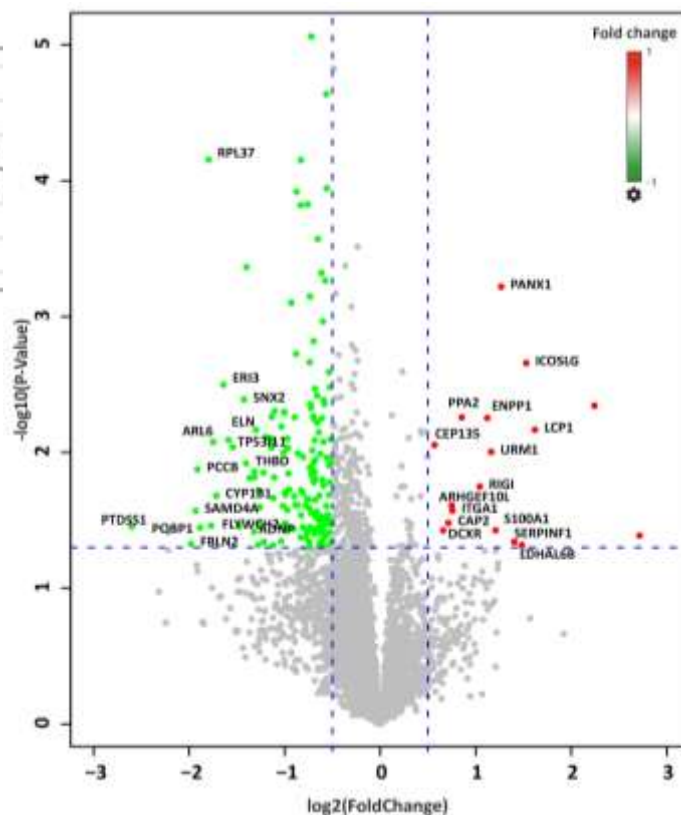


**vEDS vs. controllo:**

**181 DEPs**

➤ **17 up-regolate**

➤ **164 down-regolate**

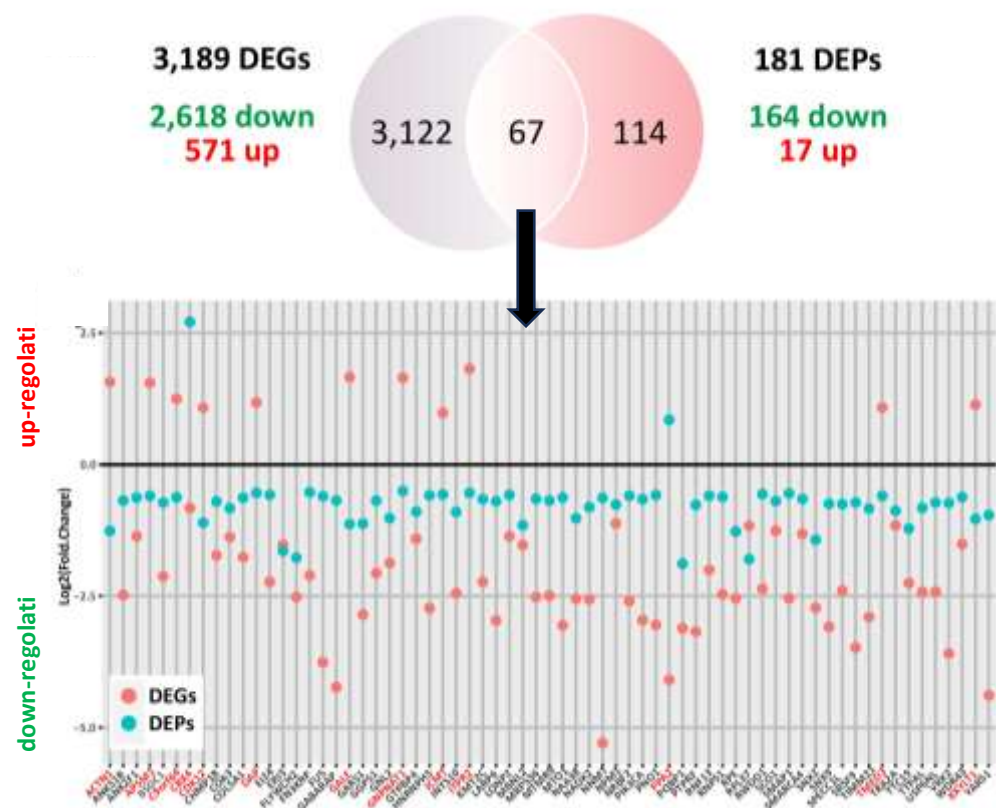


## Analisi di GO delle 181 DEPs



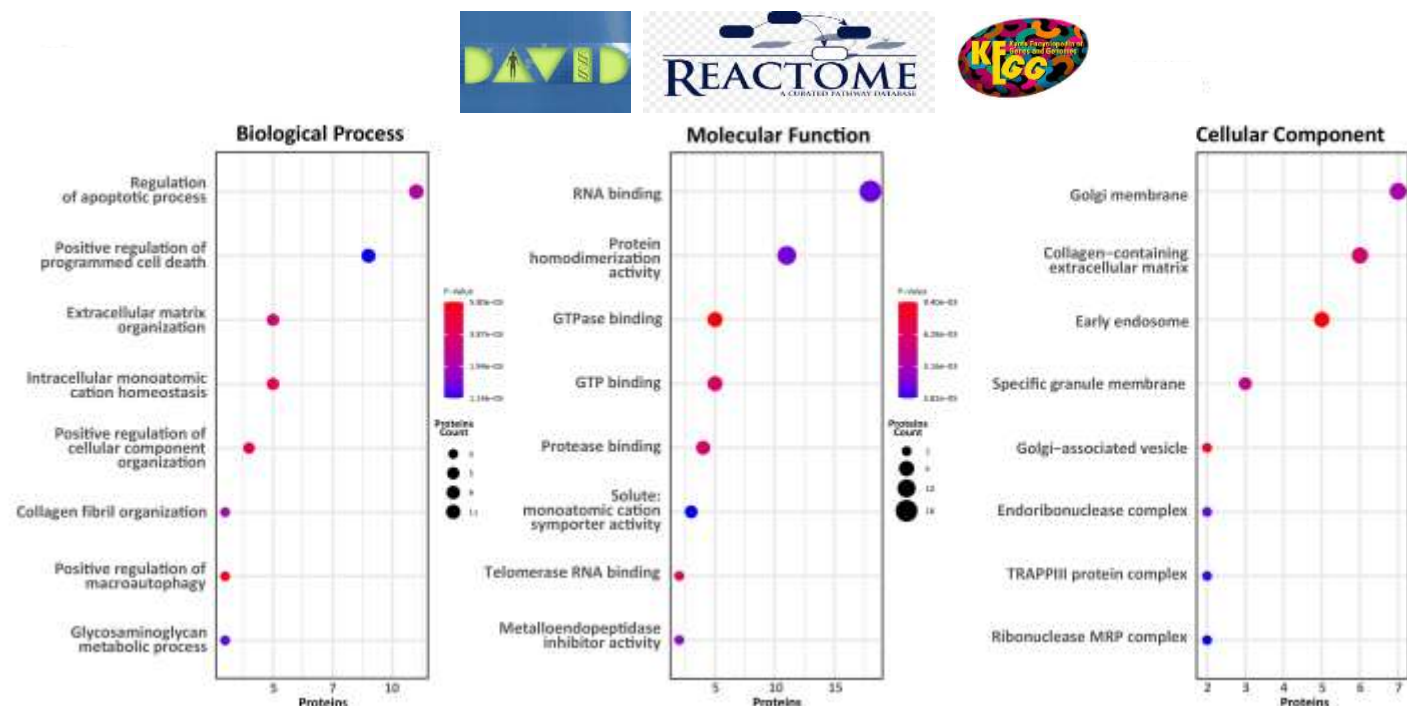
| Proteine differenzialmente esprese<br>in vEDS vs cellule di controllo                                                          | Processi biologici potenzialmente alterati<br>in cui sono coinvolte queste proteine                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| COL1A1, COL1A2, COL5A1, CYP1B1, ELN,<br>FBLN2, ITGB3, SMAD4, SMPD1, ITGB1,<br>PROCR, TIMP1, THBD, CD59, HPS6, GALE,<br>GNPNAT1 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Integrità strutturale dell'ECM nei tessuti connettivi compromessa organizzazione/maturazione delle fibre di collageni (I, III, V) e la funzione della elastina, fondamentali per la stabilità ed elasticità vascolare</li> <li>Rimodellamento della parete dei vasi sanguigni con potenziale coinvolgimento nella formazione di aneurismi</li> </ul> |
| AFDN, RAP2A, CYP1B1, SLIT2, MIF,<br>GTPBP4, SMAD4, EI24, ENPP1, SMARCA4,<br>BNIP3L, BNIP3, AKT3, PIK3CA, SNX9                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Motilità, crescita e sopravvivenza cellulare</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| GABARAP, DAP, CHMP1B, NRBF2, WDR45,<br>BNIP3, BNIP3L                                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Autofagia e processi catabolici nel proteasoma e lisosoma</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| FUS, SMARCA4, TRA2A, TRA2B, SRF9,<br>RNPS1, WDR43, RRP9, PNO1, RPL37                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Alterato processamento dell'RNA e biogenesi dei ribosomi</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                  |





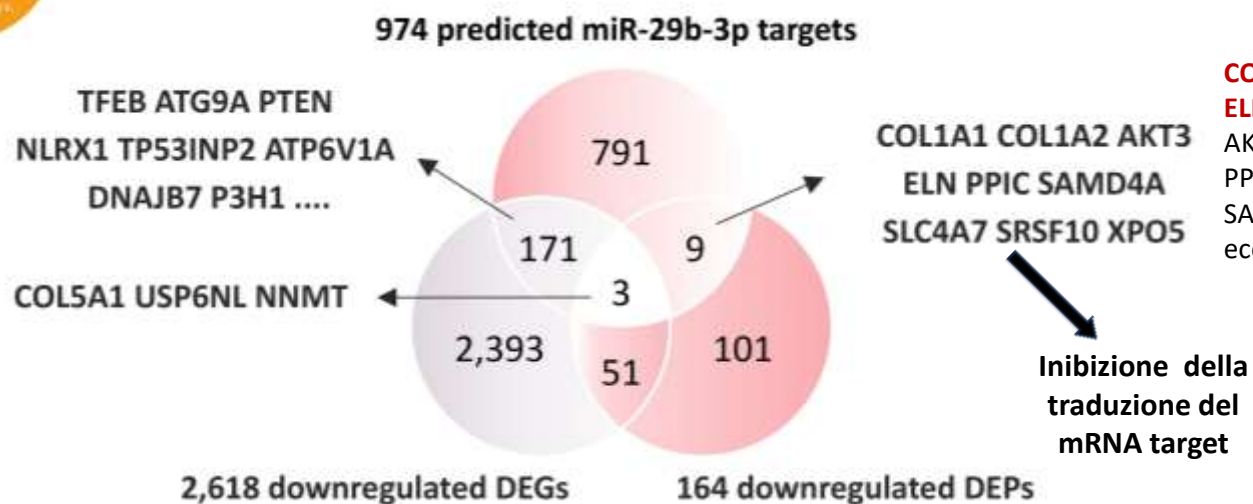
Nonostante le differenze tecniche e biologiche tra le analisi del trascrittoma e del proteoma, l'integrazione dei dati ha mostrato una notevole coerenza nei pattern di espressione, confermando la rilevanza biologica di entrambi gli approcci

Analisi di GO dei 114 geni differenzialmente espressi solo a livello proteico (DEPs)



L'analisi di GO delle 114 proteine differenzialmente espresse non rilevate a livello trascrizionale (COL1A1, COL1A2, ELN) ha contribuito a rafforzare in modo significativo la comprensione dei meccanismi patogenetici della vEDS, evidenziando processi biologici altamente coerenti con quelli emersi dall'analisi del trascrittoma

**L'analisi del proteoma ha rafforzato l'ipotesi di un ruolo centrale svolto dal miR-29b-3p nei meccanismi patogenetici della vEDS supportandone il potenziale come target terapeutico**



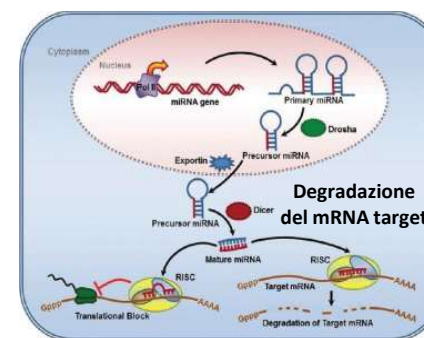
**COL1A1-COL1A2: COLLI**, essenziale per l'integrità della ECM

**ELN: elastina**, componente essenziale della ECM che conferisce elasticità ai vasi sanguigni

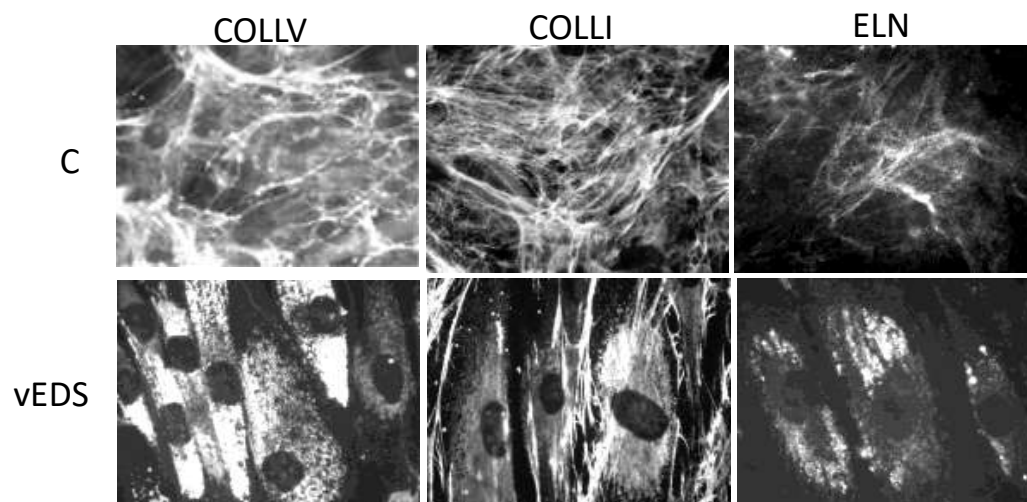
AKT3: serina/threonine protein-kinasi, regola la sopravvivenza cellulare

PPIC: peptidil-prolil-isomerasi, coinvolta in *folding* proteico e risposta all'ER stress

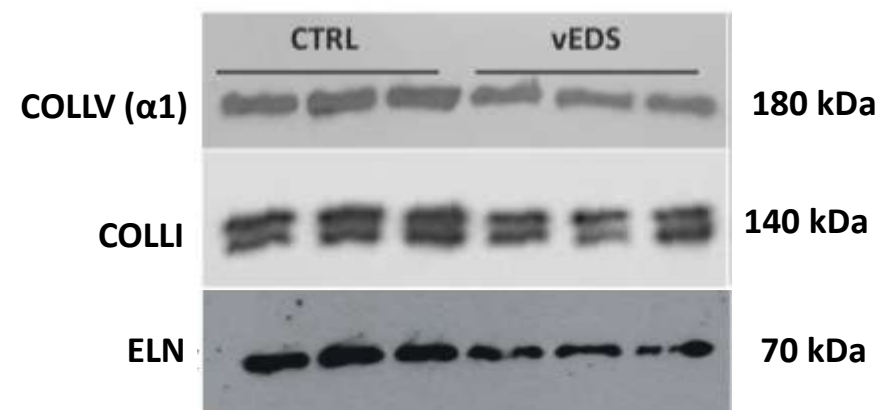
SAMD4: Sterile Alpha Motif Domain Containing 4, regola la sintesi proteica ecc.



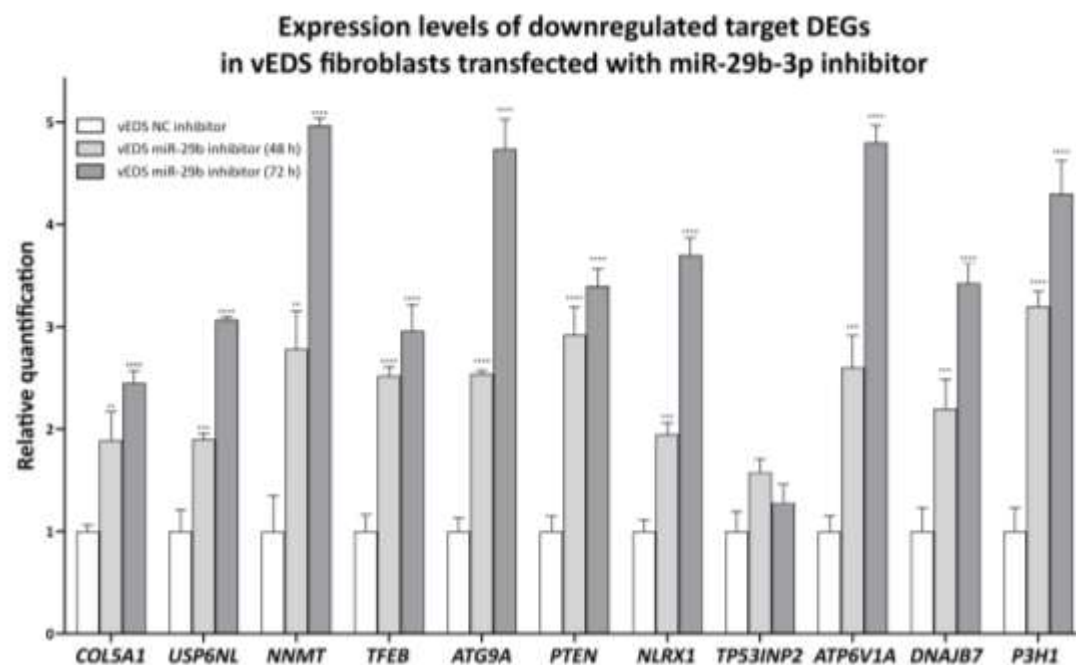
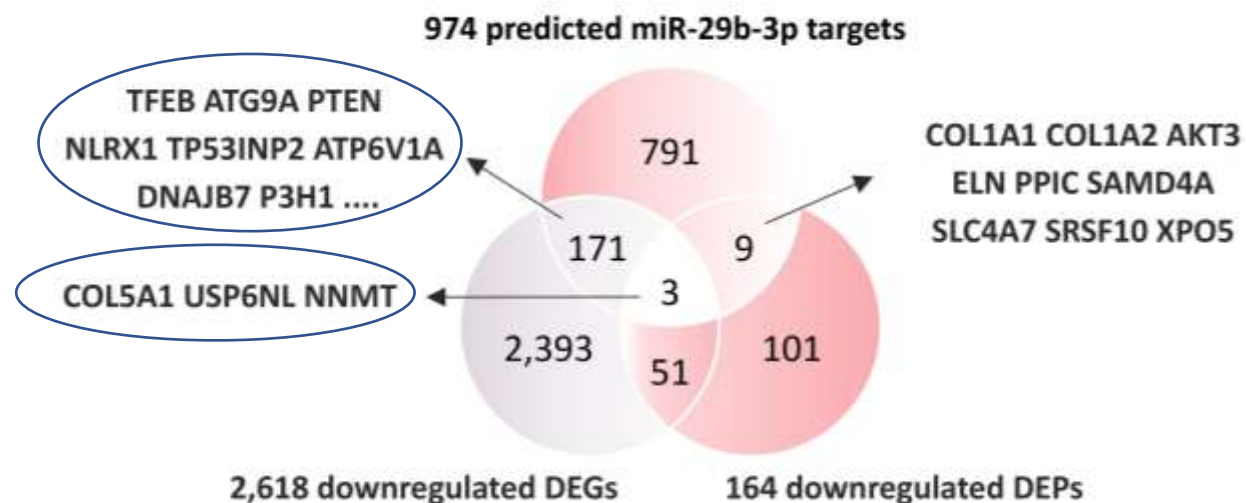
**L'inibizione del miR-29b-3p è in grado di aumentare i livelli degli mRNA e/o proteine down-regolati nei fibroblasti vEDS?**



COLL: collagene; ELN: elastina



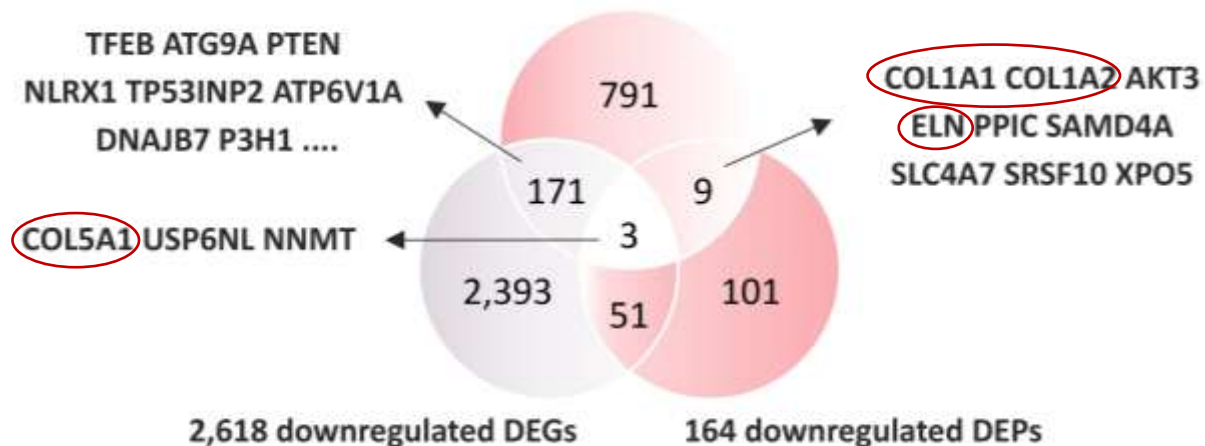
L'inibizione del miR-29b-3p è in grado di aumentare i livelli degli mRNA e/o proteine down-regolati nei fibroblasti vEDS?



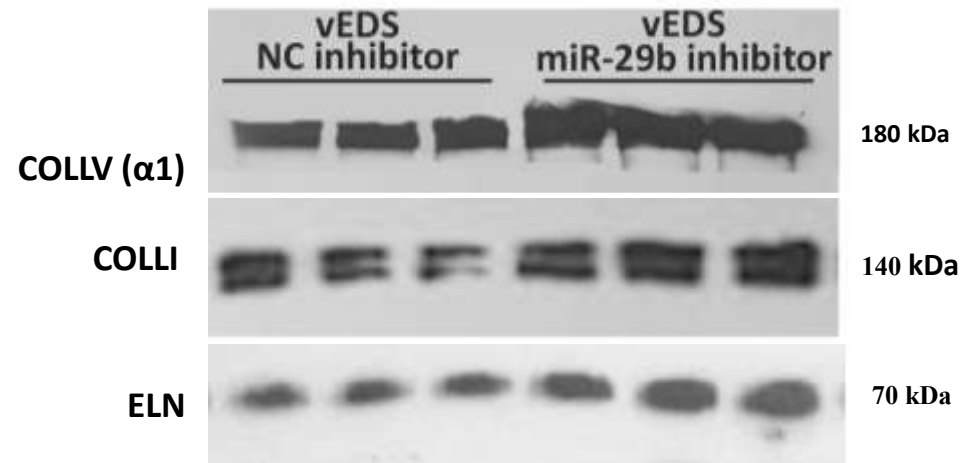


L'inibizione del miR-29b-3p è in grado di aumentare i livelli degli mRNA e/o proteine down-regolati nei fibroblasti vEDS?

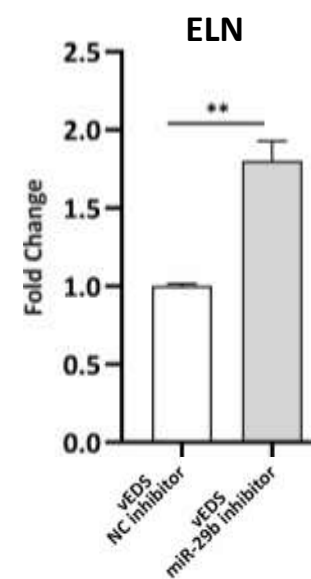
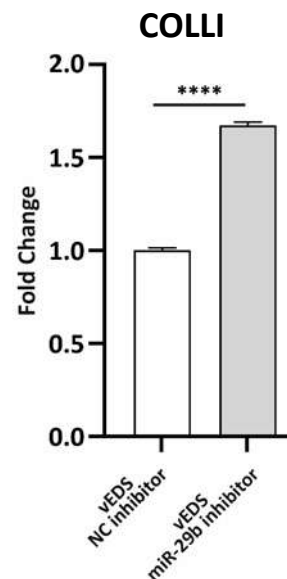
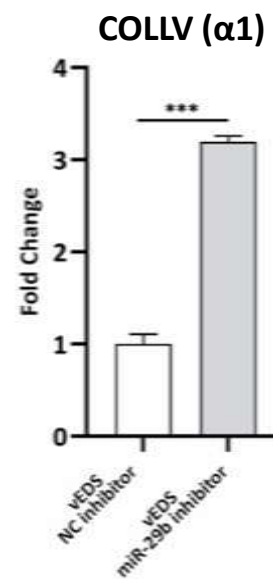
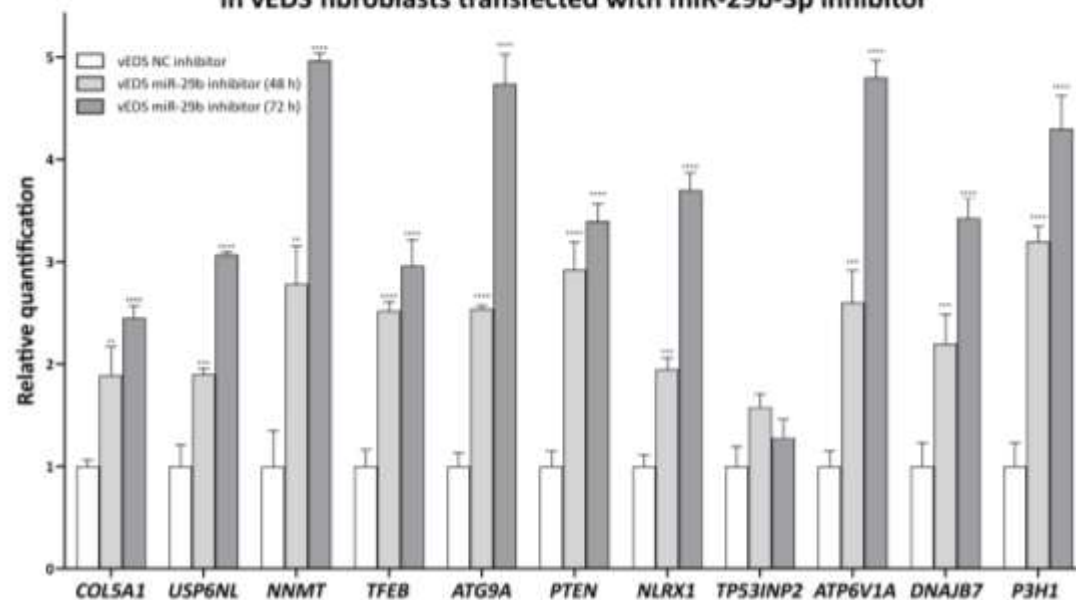
974 predicted miR-29b-3p targets



72 h dopo trasfezione



Expression levels of downregulated target DEGs in vEDS fibroblasts transfected with miR-29b-3p inhibitor

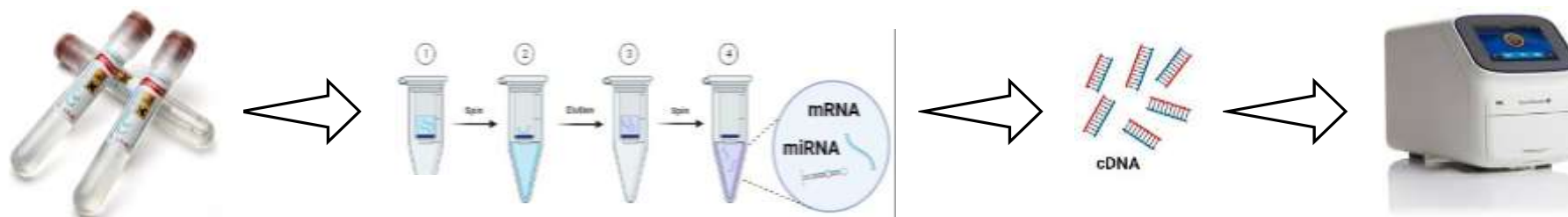


## **Proof of concept del potenziale terapeutico del miR-29b-3p**

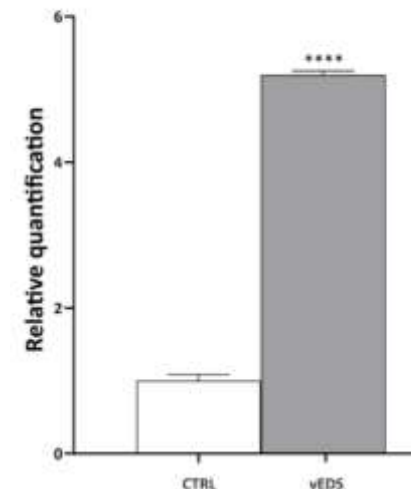
L'inibizione del miR-29b-3p è in grado di aumentare i livelli degli mRNA e/o proteine down-regolati nei fibroblasti vEDS!

miR-29b-3p può essere un target in vivo?

Q-PCR per quantificare i livelli del miR-29b-3p nel sangue di 12 pazienti vEDS vs. 24 individui di controllo



Expression levels of miR-29b-3p in blood samples of vEDS patients



- In conclusione, i nostri studi multi-omici suggeriscono un ruolo cruciale di miR-29b-3p (e potenzialmente anche di altri miRNA up-regolati come miR-29a-3p, miR-138-5p e altri) nei meccanismi patogenetici della vEDS
- miR-29b-3p sembra contribuire in modo significativo alla deregolazione dell'integrità della ECM, compromettendo la composizione e la funzionalità dei collagene e di altri componenti strutturali, oltre a influenzare negativamente processi chiave per la sopravvivenza cellulare, come l'autofagia, la risposta allo stress del ER e la regolazione della proliferazione e morte cellulare
- In un'ottica traslazionale, i nostri risultati forniscono una solida prova di concetto a supporto di future indagini funzionali volte a valutare se inibire miR-29b-3p nei pazienti con vEDS possa rappresentare una strategia terapeutica efficace per migliorare l'omeostasi dell'ECM e il funzionamento di vie intracellulari critiche, entrambi essenziali per il mantenimento della integrità del tessuto connettivo, in particolare a livello vascolare

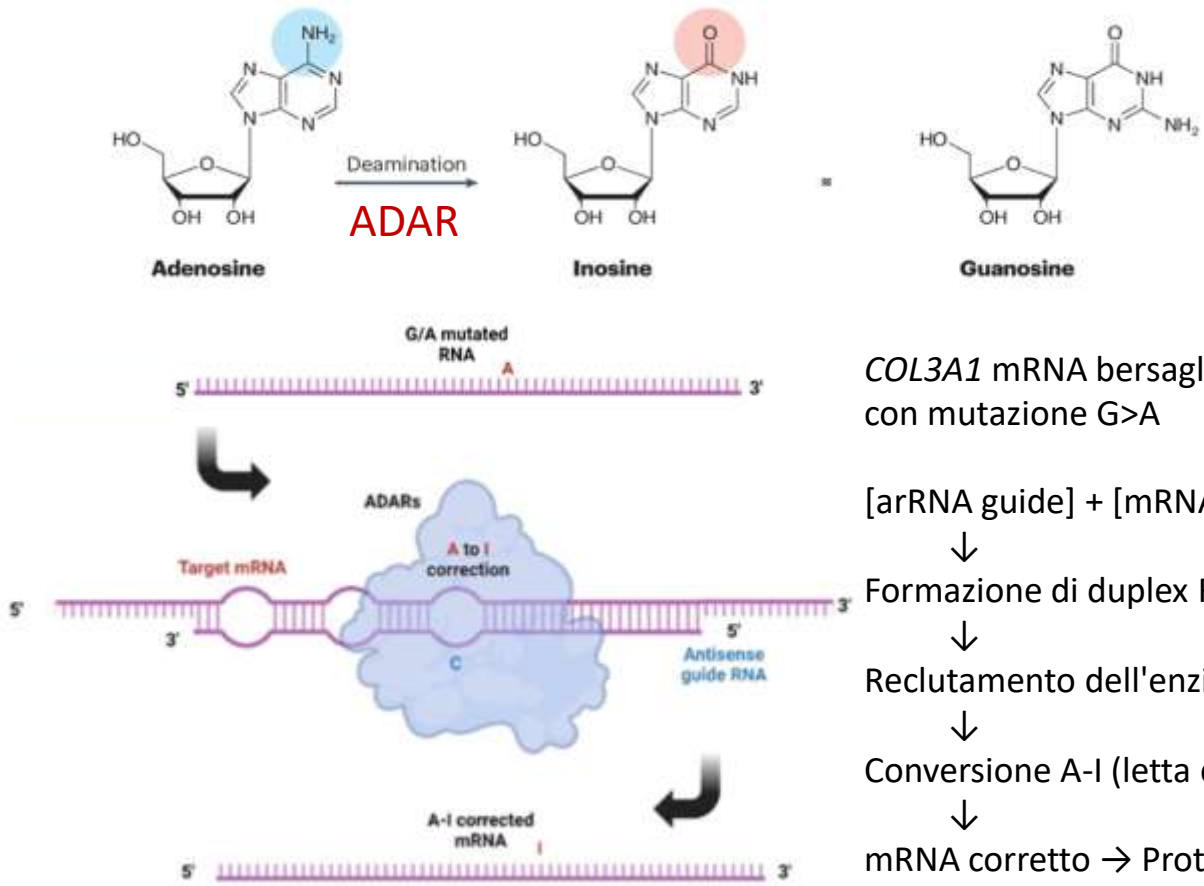


# Exploring ADAR-mediated RNA therapeutics in vEDS



Adenosine Deaminase Acting on RNA

| Pazienti | Mutazione          | Effetto           | Posizione |
|----------|--------------------|-------------------|-----------|
| P.1      | c.3417+1G>A        | Skipping esone 47 | Int47     |
| P.2      | c.1761+1G>A        | Skipping esone 25 | Int25     |
| P.3      | c.2897G>T          | p.Gly966Val       | Ex41      |
| P.4      | c.2797G>A          | p.Gly933Arg       | Ex40      |
| P.5      | c.1835G>A          | p.Gly612Asp       | Ex27      |
| P.6      | c.2986G>A          | p.Gly996Arg       | Ex42      |
| P.7      | c.951+6T>C         | Skipping esone 47 | Int14     |
| P.8      | c.3508G>A          | p.Gly1170Ser      | Ex48      |
| P.9      | c.674G>A           | p.Gly225Asp       | Ex9       |
| P.10     | c.709G>A           | p.Gly237Arg       | Ex10      |
| P.11     | c.1655G>A          | p.Gly552Glu       | Ex24      |
| P.12     | c.2077G>A          | p.Gly693Arg       | Ex31      |
| P.13     | c.3509G>A          | p.Gly1170Asp      | Ex48      |
| P.14     | c.836G>A           | p.Gly279Asp       | Ex12      |
| P.15     | c.3563G>T          | p.Gly1188Val      | Ex49      |
| P.16     | c.1808G>A          | p.Gly603Asp       | Ex26      |
| P.17     | c.2607+4_2607+7del | Skipping esone 38 | Int38     |
| P.18     | c.3509G>A          | p.Gly1170Asp      | Ex48      |



COL3A1 mRNA bersaglio con mutazione G>A

[arRNA guide] + [mRNA bersaglio]  
↓  
Formazione di duplex RNA  
↓  
Reclutamento dell'enzima ADAR  
↓  
Conversione A-I (letta come G)  
↓  
mRNA corretto → Proteina funzionale

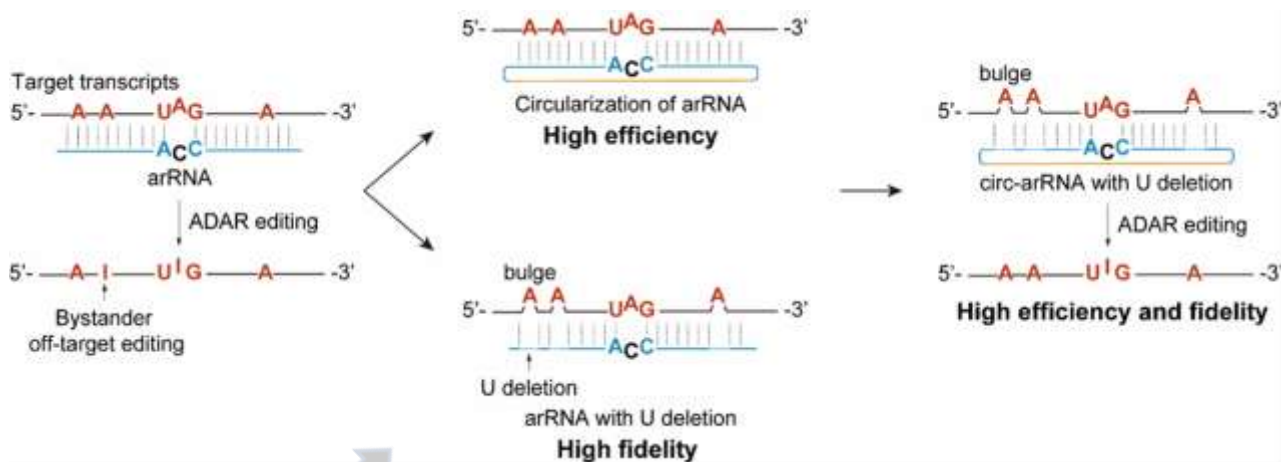
LEAPER (Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing of RNA)

14/18 (78%) varianti nella nostra coorte di fibroblasti vEDS sono transizioni G>A  
Oltre il 70% delle mutazioni a oggi descritte in vEDS sono G>A





# Exploring ADAR-mediated RNA therapeutics in vEDS



## LEAPER 2.0

- **Struttura circolare della guida RNA:** aumenta la stabilità della guida e la durata dell'editing
- **Miglioramento della specificità:** l'introduzione di loop intercalati nella regione antisenso riduce l'editing indesiderato su adenosine vicine
- **Efficienza elevata:** è stata osservata un'efficienza di editing fino all'80% in modelli preclinici
- **Consegna tramite AAV:** l'utilizzo di vettori virali adeno-associati (AAV) dovrebbe consentire una somministrazione efficace e sicura in vivo

## Timeline

To be done

Progettazione di  
guide arRNA  
mutazione specifica

Clonaggio in  
vettori virali

Trasduzione di  
fibroblasti vEDS

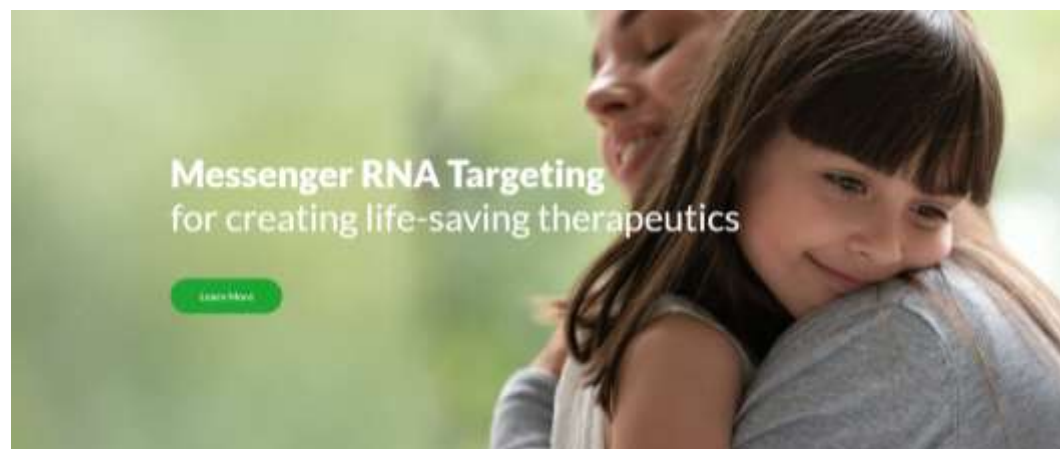
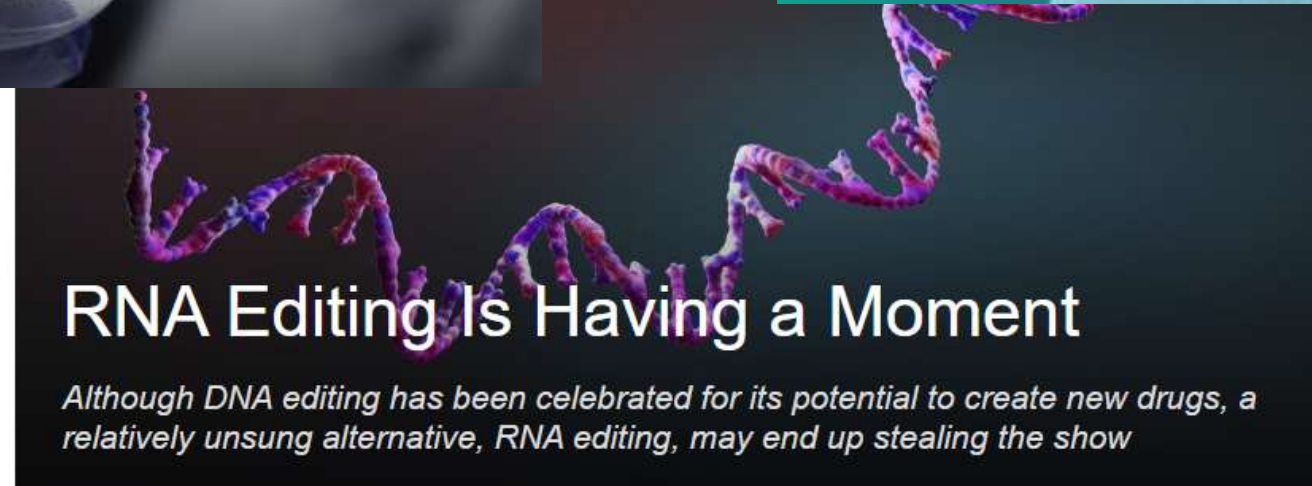
Selezione con  
puromicina

Sequenziamento mRNA  
per valutare l'efficacia  
dell'editing

COLLIII

Studi funzionali







# Ringraziamenti



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

**Centro Connettivopatie Ereditarie  
e Sindromi di Ehlers-Danlos C.E.S.E.D.**



**Sezione Biologia e Genetica  
Dipartimento di Medicina Molecolare e  
Traslazionale (DMMT)**

*Università degli Studi di Brescia*

**Prof. Marina Colombi**

**Dott. Nicola Chiarelli**

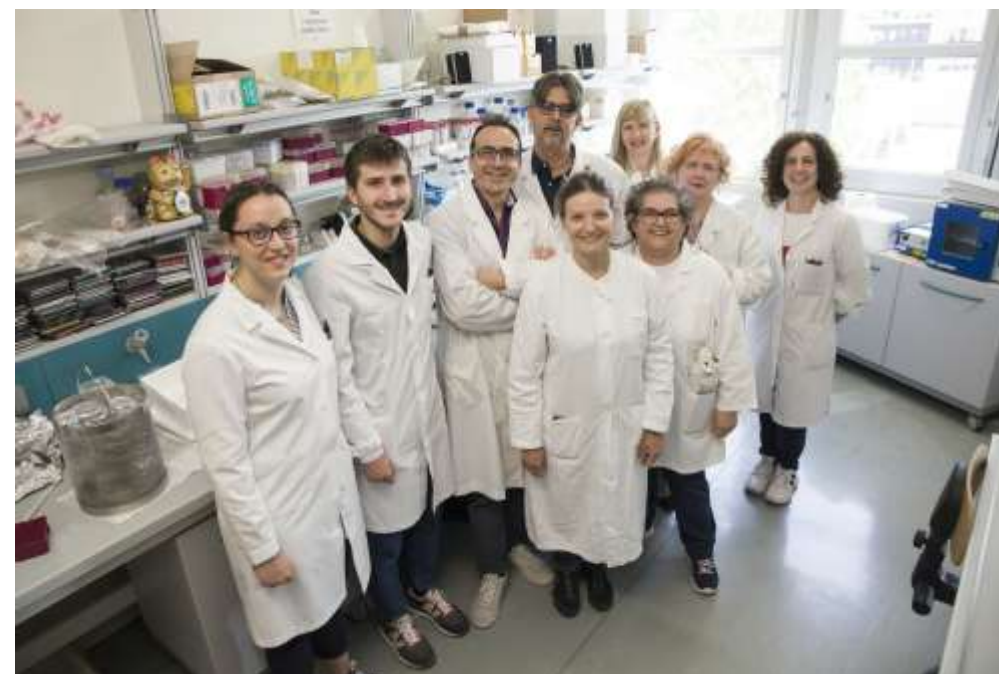
**Prof.ssa Nicoletta Zoppi**

**Dott.ssa Valeria Cinquina**

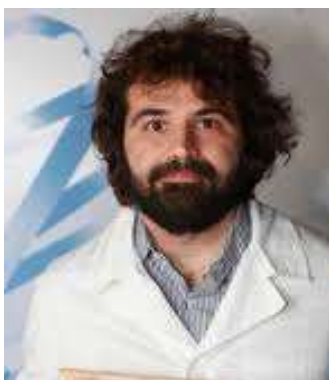
**Dott.ssa Valeria Bertini**

**Sig.ra Jelena Skripac**

**Clinica Dermatologica**  
*ASST Spedali Civili di Brescia*  
*Università degli Studi di Brescia*  
**Prof.ssa Marina Venturini**



**Il gruppo di ricerca del  
Dr. Carmine Settembre**





# Ringraziamenti



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

**Centro Connettivopatie Ereditarie  
e Sindromi di Ehlers-Danlos C.E.S.E.D.**



**Sezione Biologia e Genetica  
Dipartimento di Medicina Molecolare e  
Traslazionale (DMMT)**

*Università degli Studi di Brescia*

**Prof. Marina Colombi**

**Dott. Nicola Chiarelli**

**Prof.ssa Nicoletta Zoppi**

**Dott.ssa Valeria Cinquina**

**Dott.ssa Valeria Bertini**

**Sig.ra Jelena Skripac**



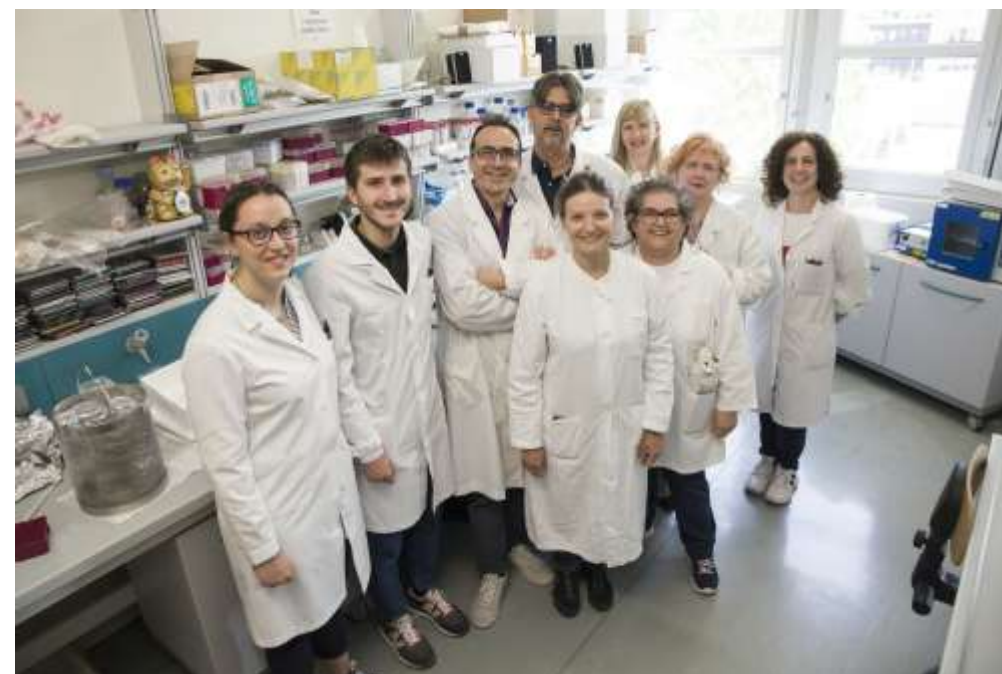
**Il gruppo di ricerca del  
Prof. Alessandro Barbon  
Sezione Biologia e Genetica  
DMMT UNIBS  
*RNA Lab***

**Clinica Dermatologica**

*ASST Spedali Civili di Brescia*

*Università degli Studi di Brescia*

**Prof.ssa Marina Venturini**



# Ringraziamenti



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI BRESCIA

**Centro Connettivopatie Ereditarie  
e Sindromi di Ehlers-Danlos C.E.S.E.D.**



**I pazienti e i donatori sani che hanno partecipato agli studi  
donando una biopsia cutanea e/o un campione di sangue**

**I pazienti che finanziano la ricerca con donazioni**

**Famiglia Gaudenzi Tealdo  
Famiglia Fazzo Cusan**

**L'associazione CEDI che ha indirizzato i pazienti a Brescia  
e che ha contribuito a finanziare la ricerca**

**La Società Internazionale delle Sindromi di Ehlers-Danlos**



The **Ehlers-Danlos** Society

# Ringraziamenti

