

Name des Antragstellers:

Francesca Sardina

Zugehörigkeit:

Institut für Molekularbiologie und Pathologie, Nationaler Forschungsrat von Italien, Rom

Titel des Projekts:*Mikrotubuli-Zytoskelett-Organisation als Biomarker zur Entwicklung neuer therapeutischer Perspektiven für Hereditäre Spastische Paraplegie Typ 4 (SPG4-HSP)***Zusammenfassung:**

Die häufigste Form der hereditären spastischen Paraplegie (HSP) ist auf autosomal-dominante Mutationen im SPG4-Gen zurückzuführen, das für Spastin, ein mikrolösliches (MT) Abbauprotein, kodiert. SPG4-Mutationen führen zur Pathogenese hauptsächlich durch einen Haplo-Insuffizienz-Mechanismus. SPG4-HSP weist innerhalb der betroffenen Familien erhebliche Unterschiede auf, und es wird keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation berichtet. Eine Gendosis-Rettung von Neuritendefekten in Neuronen von SPG4-HSP-Patienten wurde berichtet, was zeigt, dass die Wiederherstellung physiologischer Spastinspiegel pathologische Phänotypen aufhalten könnte. Wir fanden heraus, dass die Kinase HIPK2 die Stabilität von Spastin reguliert und dessen neddylierungsabhängigen Abbau verhindert. Die Überexpression/Aktivierung von HIPK2 erhöht den Spastinspiegel in SPG4-HSP-Zellen und heilt Neuritendefekte in einem Spastin-defizienten Zellmodell. Damit ist der Beweis erbracht, dass die Manipulation der HIPK2/Spastin-Achse eine Strategie zur Entwicklung von Spastin-erhöhenden therapeutischen Ansätzen ist. Im Rahmen dieser Studie habe ich in SPG4-HSP-Lymphoblastoidzellen (LCLs) sowie in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) besondere MT-Netzwerkdefekte beobachtet, die durch eine pharmakologische Erhöhung des Spastin-Proteinspiegels behoben werden. In diesem Projekt möchte ich die Architektur des MT-Netzwerks in LCLs und PBMCs von SPG4-HSP-Patientenfamilien analysieren und eingehend charakterisieren, um eine Korrelation zwischen den beobachteten Defekten und dem Schweregrad der Krankheit herzustellen. Dazu verwende ich eine neue, auf zellulärer Bildgebung basierende Methode, die ich kürzlich entwickelt habe. Darüber hinaus werde ich die Architektur des MT-Netzwerks als Reaktion auf Spastin-erhöhende Ansätze im selben experimentellen System charakterisieren. Das endgültige Ziel dieses Vorschlags besteht darin, eine nicht invasive Prognosemethode für SPG4-HSP-Patienten zu entwickeln und ein experimentelles System zur Vorhersage der Wirksamkeit therapeutischer Behandlungen einzurichten.

Hintergrund:

HSP ist eine genetisch bedingte Motoneuronenkrankheit, für die es derzeit keine Heilung gibt. Heterozygote Funktionsverlustmutationen des SPG4-Gens, das für das Enzym Spastin kodiert, sind die häufigste HSP-Ursache. Genetische Analysen haben zu der Auffassung geführt, dass Haploinsuffizienz der wichtigste molekulare Mechanismus der SPG4-HSP ist (1-4). Es häufen sich die Hinweise darauf, dass stöchiometrische Mengen von Spastin für seine biologische Funktion notwendig sind, und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Veränderungen in der Spastinproduktion zur Entwicklung oder zum Fortschreiten der Krankheit beitragen (3). Daher könnten Spastin-erhöhende therapeutische Ansätze bei HSP-Patienten mit SPG4-Haploinsuffizienz wirksam sein. Wichtig ist, dass eine Gendosis-abhängige Rettung von Neuritendefekten in den Neuronen von SPG4-HSP-Patienten berichtet wurde (5). Darüber hinaus gibt es bis heute keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation für SPG4-HSP-Patienten (6). Das Alter bei Krankheitsbeginn, der klinische Schweregrad und der Verlauf der Erkrankung sind bei einer bestimmten Variante sehr variabel und unvorhersehbar, selbst innerhalb derselben Familie (6,7). Daher besteht ein dringender Bedarf an prognostischen und prädiktiven Biomarkern, mit denen festgestellt werden kann, bei welchen Patienten eine Verschlechterung des klinischen Zustands und/oder ein Ansprechen auf eine Therapie zu erwarten ist. Ausgehend von unserer früheren Studie zu Spastin als neuem

Zytokinese-Ziel der Kinase HIPK2 (8), haben wir herausgefunden, dass die HIPK2-vermittelte Phosphorylierung von Spastin an S268 den Spastinabbau hemmt, und wir haben gezeigt, dass es möglich ist, Neuritendefekte durch eine Erhöhung der Spastinspiegel zu beheben, die auf die HIPK2/Spastin-Achse in Zellen wirkt, die SPG4-HSP-Defekte rekapitulieren.

(9). Sehr wichtig für die klinischen Auswirkungen sind unsere Ergebnisse, die zeigen, dass eine pharmakologische Hemmung des Spastinabbaus in der Lage ist, paraphysiologische Spastinwerte in heterozygoten SPG4-HSP-Neuronen der Maus und in von Patienten stammenden LCLs wiederherzustellen

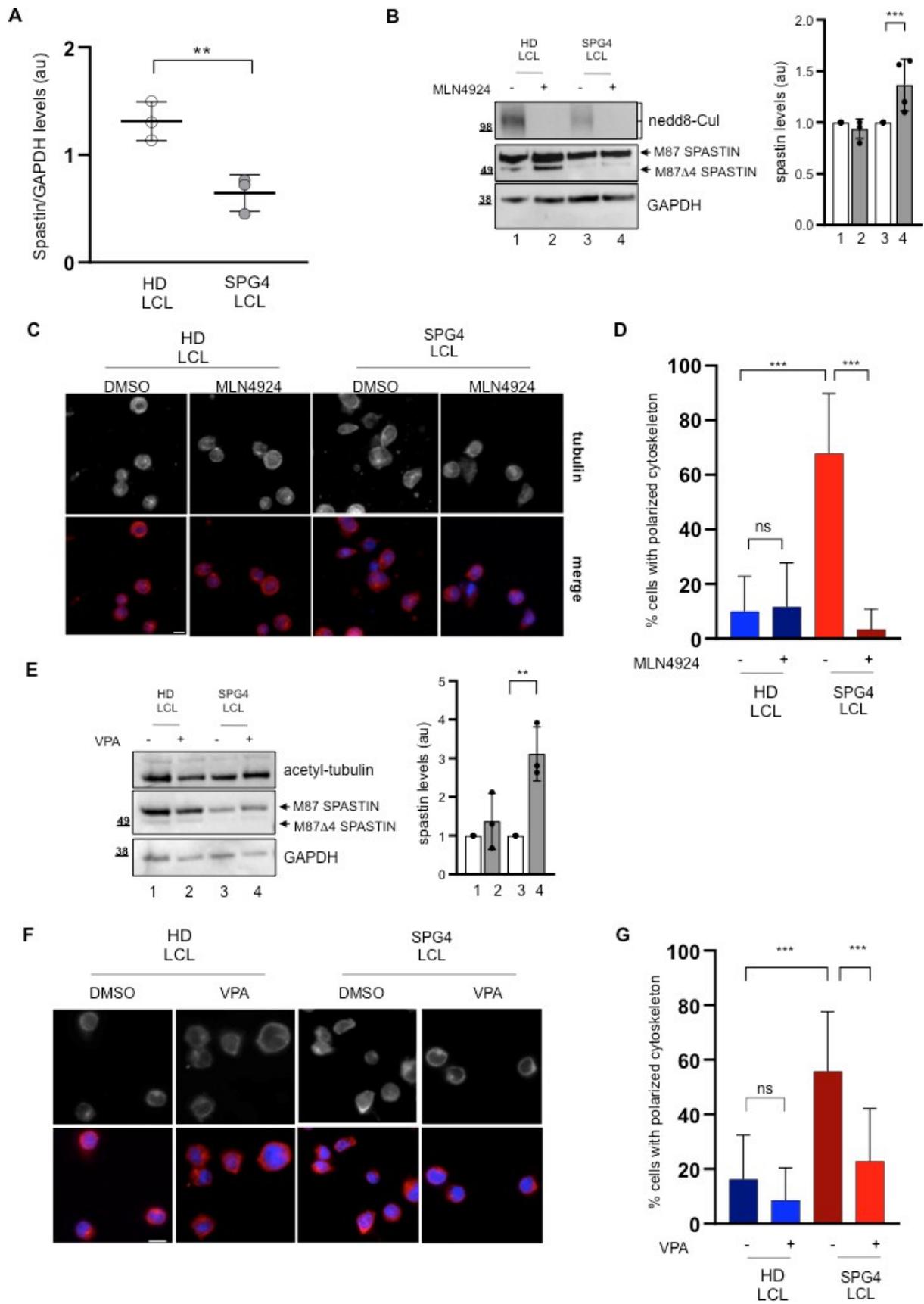
(9). Insbesondere haben wir mindestens einen vielversprechenden pharmakologischen Wirkstoff zur Erhöhung des Spastinspiegels identifiziert, MLN4924, ein Medikament, das in das zentrale Nervensystem (ZNS) eindringt und von dem kürzlich gezeigt wurde, dass es den Phänotyp von Mausmodellen anderer neurodegenerativer Erkrankungen verbessert (10) und das sich derzeit in klinischen Studien der Phase 2-3 für verschiedene maligne Erkrankungen befindet

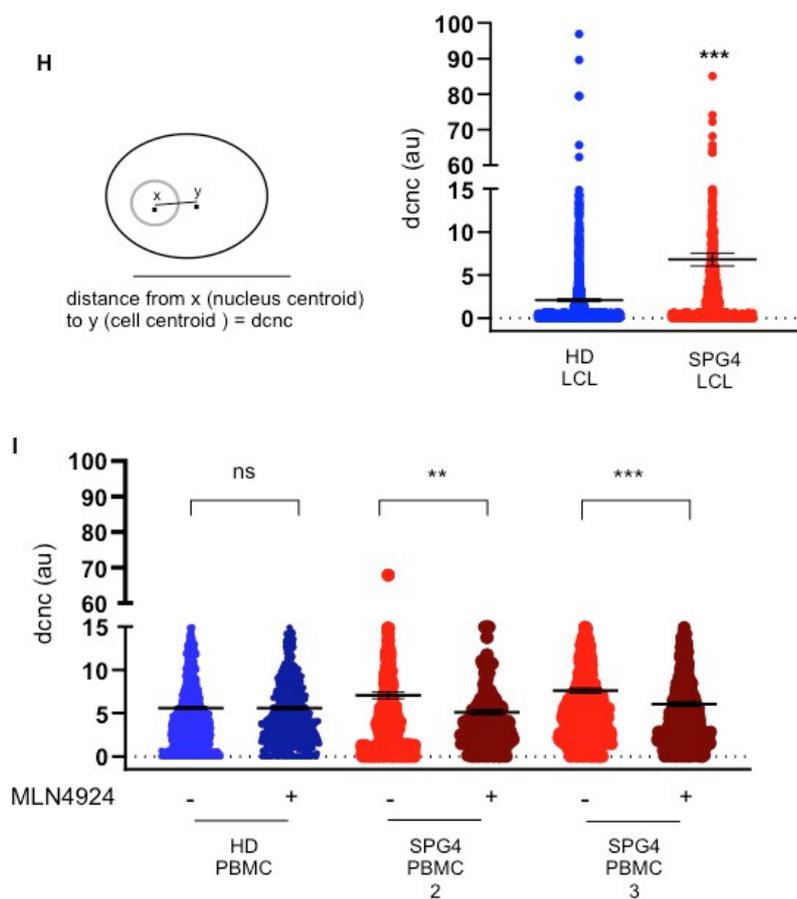
(<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=pevonedistat&cntry=&state=&city=&dist=>). Diese Erkenntnisse haben uns dazu veranlasst, präklinische Studien für MLN4924 zu beginnen, um das Medikament bei SPG4- HSP neu zu positionieren und parallel dazu prognostische und prädiktive Biomarker für therapeutische Strategien zu identifizieren, indem wir eine auf zellulärer Bildgebung basierende Methode verwenden, die wir kürzlich entwickelt haben (11).

:

Im Rahmen unserer Studien zu den Spastin-Regulationswegen haben wir LCLs von SPG4-HSP-Patienten, die verschiedene haploinsuffiziente trunkierende Mutationen tragen, die erwartungsgemäß zu einer reduzierten Expression des Spastin-Proteins führen, hergestellt und charakterisiert (Abb. A). Wir stellten fest, dass SPG4-LCLs ausgeprägte Defekte in der Organisation des MT-Zytoskeletts aufweisen (Abb. C und F). Bemerkenswert ist, dass bei SPG4-LCLs die medikamenteninduzierte Spastin-Restauration mit einer Rettung der MT-Zytoskelett-Organisation einhergeht (Abb. B-G). Um einen reproduzierbaren und standardisierten biologischen bildbasierten Test der für SPG4-HSP charakteristischen MT-Defekte zu erhalten, haben wir eine automatisierte Bildaufnahme und eine Pipeline für die automatisierte Bildanalyse mit Modulen der Open-Source-Software CellProfiler (12) in geeigneter Reihenfolge entwickelt (11). Auf diese Weise können wir auf automatische Weise viele verschiedene Parameter messen, darunter die und die Position des Zellkerns und des Zellschwerpunkts für alle betrachteten Einzelzellen. Mit Hilfe dieser Pipeline haben wir LCLs von drei verschiedenen Patienten analysiert und festgestellt, dass sich das Maß für den Abstand zwischen Zell- und Zellkernschwerpunkt (dcnc) bei SPG4 eindeutig von dem der Kontrollzellen unterscheidet (Abb. H und 11), was eine klare Unterscheidung zwischen pathologischen und gesunden Zellen ermöglicht. Auf die gleiche Weise haben wir die Auswirkungen der MLN4924-induzierten Spastin-Restauration auf das MT-Netzwerk in Kontroll- und Patientenzellen untersucht und ähnliche Ergebnisse in LCLs und in frisch isolierten Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten PBMCs erhalten, was darauf hindeutet, dass unsere Analysen nicht durch Immortalisierung oder Zellmanipulation verändert werden (Abb. I und ref. 11). Darüber hinaus haben wir festgestellt, dass unsere Analysen effizient durchgeführt werden können, wenn aufgetaute PBMCs oder PBMCs verwendet werden, die aus 2 Tage alten Vollblutproben isoliert wurden, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden und EDTA enthielten, um auch an gelagerten PBMCs zu testen.

Insgesamt haben uns diese Ergebnisse dazu veranlasst, diese Analysen auf eine große Patientenkohorte auszudehnen und klinische Korrelationen durchzuführen, um die Möglichkeit zu eröffnen, einfache, schnelle, nicht-invasive, kostengünstige prognostische und/oder prädiktive Tests zu entwickeln.





(A) Das Diagramm zeigt die mittels quantitativem Western Blot gemessenen Spastin-Proteinwerte von LCLs von SPG4- HSP-Patienten (mit trunkierenden Mutationen) im Vergleich zu denen von gesunden Spenderkontrollen (HD). ** $p < 0,01$, t-Test. Arbiträre Einheiten, au. (B-D) SPG4- und HD-LCLs wurden mit MLN4924 $0,1\mu\text{M}$ oder seinem Lösungsmittel DMSO behandelt und 16 Stunden nach der Behandlung mittels WB oder IF analysiert. In B: repräsentative WB mit den angegebenen Abs; die Deneddylierung von Cullin ist als MNL4924-Positivkontrolle dargestellt. Die Intensität der Spastinbanden wurde quantifiziert, normalisiert und relativ zur Lösungsmittelbehandlung als Mittelwert \pm SD von vier unabhängigen Experimenten im rechten Feld angegeben. In C, repräsentative Bilder der angegebenen Zellen, gefärbt mit Anti-Beta-Tubulin Ab und Gegenfärbung mit Hoechst zur Nukleusmarkierung. In D zeigt das Histogramm den Prozentsatz der Zellen, die durch eine polarisierte Organisation des MT-Zytoskeletts gekennzeichnet sind, als Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten, bei denen >200 Zellen manuell analysiert wurden. *** $p < 0,0001$, t-Test. ns= nicht statistisch signifikant. Maßstabsbalken, $10\mu\text{M}$. (E-G) Der Spastin-Proteinspiegel kann durch Behandlung mit Valproinsäure (VPA) wiederhergestellt werden, wie kürzlich in den kortikalen Neuronen eines Mausmodells der spinocerebellären Ataxie 20 gezeigt wurde, die durch eine Destabilisierung von Spastin gekennzeichnet ist (13). Die angezeigten Zellen wurden mit 1mM VPA oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt und wie in B-D 24 Stunden nach der Behandlung analysiert. In E, repräsentative WB mit den angegebenen Abs; ein Anstieg von Acetyl-Tubulin ist als VPA-positive Kontrolle dargestellt. In F, repräsentative Bilder der angegebenen Zellen, gefärbt wie in C. In G, Histogramm wie in D. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, t-Test Skalenbalken, $10\mu\text{M}$. (H) Dot-Blot zum Vergleich von SPG4- und HD-LCLs wird gezeigt. Links: schematische Darstellung des dncn-Parameters. (I) Dot-Blot von SPG4- und HD-PBMCs als Reaktion auf eine Spastin-erhöhende Behandlung. Ähnliche Daten wurden auch bei LCLs erhalten, die aus diesen Zellen hergestellt wurden. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ t-test; ns= nicht statistisch signifikant.

Ziele:

1. Analyse des MT-Zytoskelett-Netzwerks bei SPG4-HSP und seiner Beziehung zu molekularen und klinischen Patientenmerkmalen.
2. Bewertung der Auswirkungen von Spastin-erhöhenden Ansätzen auf das MT-Zytoskelett-Netzwerk in von SPG4- HSP-Patienten stammenden Zellen.

Arbeitsplan:

Das Projekt ist in zwei Aufgaben unterteilt, deren Aktivitäten in sich teilweise überschneidenden Phasen durchgeführt werden.

AUFGABE 1: Analysieren Sie das MT-Zytoskelett-Netzwerk bei SPG4-HSP und seine Beziehung zu molekularen und klinischen Patientenmerkmalen.

In Zusammenarbeit mit dem Kliniker Dr. Carlo Casali werden wir die Organisation des MT-Zytoskelett-Netzwerks in PBMCs aus einer italienischen SPG4-HSP-Patientendatenbank analysieren (n=90, ausgewählt aus 12 Familien - etwa 7 Mitglieder pro Familie, darunter auch asymptomatische Träger; deren Mutationstyp, Alter des Ausbruchs, Symptome zum Zeitpunkt des Ausbruchs und klinische Merkmale vollständig annotiert sind, Ref. 13). Für alle diese 90 Patienten liegt ein Follow-up von mindestens fünf Jahren vor. Wir werden die Defekte im MT-Netzwerk mit den klinischen Merkmalen korrelieren. Die Analysen werden sowohl in frisch isolierten, PHA-stimulierten PBMCs als auch in LCLs durchgeführt. Um auch einen langfristigen Einblick in die beobachteten Phänotypen zu erhalten, haben wir eine Nachbeobachtung geplant, um festzustellen, ob sie konstant sind oder Veränderungen unterliegen, und um eine Korrelation mit dem Fortschreiten/Stabilität der Krankheit herzustellen. Eine zweijährige Nachbeobachtung wird innerhalb des Zeitrahmens der Förderung für 20 Patienten (die zu drei verschiedenen Familien gehören) durchgeführt, da ich bereits LCLs aus ihren Proben bestimmt habe. Eine einjährige Nachbeobachtung wird innerhalb des Zeitrahmens des Zuschusses für 70 Patienten abgeschlossen und im Falle der Verlängerung des Zuschusses um ein zweites Jahr verlängert.

Methodik: Periphere Blutproben werden in zwei Teile geteilt, um PBMCs zu isolieren und LCLs zu etablieren. Die Organisation des MT-Zytoskeletts wird mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Anti-Beta-Tubulin-Antikörpers und Hoechst-33342 zur Markierung von MT bzw. Zellkernen untersucht. Wie in unseren vorläufigen Ergebnissen beschrieben, werden automatisierte Bilderfassungen und -analysen mit hohem Informationsgehalt durchgeführt. Insbesondere werden wir uns auf die Messungen des Abstands zwischen dem Zellschwerpunkt und dem Kernschwerpunkt konzentrieren, die bei SPG4-HSP-Zellen im Vergleich zu HD-Zellen in der Untergruppe der bereits analysierten Zellen statistisch signifikante Unterschiede zeigten (siehe Vorläufige Ergebnisse). MT-Defekte werden mit molekularen (z. B. Art der Mutation, Größe des Proteinprodukts) und klinischen Merkmalen wie funktionellen Gangtests, Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS; 14) und Krankheitsprogressionsrate (berechnet als $SPRS2 - SPRS1 / \text{Anzahl der Jahre zwischen } SPRS2 \text{ und } SPRS1$; wobei $SPRS1$ und $SPRS2$ die Werte bei der ersten bzw. letzten klinischen Bewertung sind) korreliert. Für die Folgestudien gilt: Wenn sich die Festlegung von LCLs als entbehrlich erweist, vermeiden wir eine mühsame und zeitaufwändige Stabilisierung der LCLs. Bei der jährlichen Visite der Patienten entnehme ich eine Blutprobe, führe die MT-Analysen an den PHA-stimulierten PBMCs durch und korreliere die Daten, wie zuvor beschrieben.

AUFGABE 2: Bewertung der Auswirkungen von Spastin-erhöhenden Ansätzen auf das MT-Zytoskelett-Netzwerk in von SPG4-HSP-Patienten stammenden Zellen.

Wir werden die Auswirkungen von zwei verschiedenen Spastin-erhöhenden Ansätzen auf die MT-Organisation untersuchen. Wir werden die pharmakologische Behandlung MNL4924 zur Hemmung des Spastinabbaus oder HIPK2

Überexpression, um die Spastinphosphorylierung zu erhöhen und seine Stabilisierung zu induzieren, wie wir gezeigt haben (9).

Methodik: Das MT-Zytoskelett-Netzwerk wird zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit MLN4924 oder seinem Lösungsmittel DMSO analysiert, wie in Aufgabe 1 beschrieben. Die Überexpression von HIPK2 mit Hilfe eines Lentivirus erreicht, der GFP-HIPK2 exprimiert (bereits im Labor vorhanden). GFP-exprimierende Lentiviren werden als Kontrolle verwendet. Die Wirksamkeit der Behandlungen wird auch durch biochemische Tests bestätigt (z. B. durch Messung der Proteingehalte von HIPK2 und Spastin mittels Western Blot mit spezifischen Abs).

Alle für die Durchführung erforderlichen Methoden und Instrumente sind in der von Dr. Rinaldo geleiteten Gruppe am IBPM-CNR vorhanden. Ich werde auch von einer bereits bestehenden wichtigen Zusammenarbeit mit der von dem Kliniker Dr. Carlo Casali geleiteten Einheit - UOC Neuroriabilitazione - Dip. SBMC - Universität Sapienza Rom. Er wird sein Fachwissen und Proben aus einer Reihe von SPG4-HSP-Patienten zur Verfügung stellen, die vollständig charakterisiert sind (90 Patienten aus 12 Familien; bioethische Genehmigung Ethikkommission von Asl Roma 2, Rom, Italien N. 0074975/2020). Ein von Dr. Casali vorbereitetes Schreiben, in dem er seine Bereitschaft zur Zusammenarbeit mit mir während des Projekts erklärt, ist auf Anfrage erhältlich. Das IBPM-Labor für Genetik verfügt über eine fortschrittliche Mikroskopie-Plattform, das Nikon-Referenzzentrum für Mittel- und Süditalien (<http://bbcd.bio.uniroma1.it/bbcd/archivionotizie/cnr-microscopy-platform-nikon-reference-center-ibpm>), die kürzlich als Teil von PON-IMPARGA implementiert wurde. Projekt Euro-Bioimaging-INFRASTRUCTURE) und ist Teil von NeuroNet Consortium (https://www.ibpm.cnr.it/index.php?option=com_k2&view=item&id=450:resources9uk&Itemid=21&lang=de), das komplementäre Aspekte der Neurobiologie in verschiedenen Modellsystemen untersucht und einen fruchtbaren wissenschaftlichen Austausch ermöglicht. Darüber hinaus bietet die Ansiedlung der IBPM-Laboratorien an Universität Sapienza den zusätzlichen Vorteil des Zugangs zu gemeinsamen Einrichtungen und Infrastrukturen sowie zu den wissenschaftlichen Fachkenntnissen, Studenten und dem Seminarprogramm des MSc-Kurses in Neurobiologie. Im Hinblick auf die künftigen Auswirkungen des vorgeschlagenen Projekts haben sich mehrere Gruppen innerhalb Instituts in letzter Zeit darauf konzentriert, die aus grundlagenwissenschaftlichen Projekten gewonnenen Erkenntnisse für innovative therapeutische Strategien zu nutzen (z. B. Entwicklung und Analyse neuartiger Wirkstoffe, innovative Strategien für die Verabreichung von Wirkstoffen, Einsatz von therapeutischen künstlichen Genen).

Finanzieller Rahmen:

1 Jahr Kosten		
Material und Verbrauchsmaterial	WB- und IF-Reagenzien, Antikörper, Zellkulturmedien, Arzneimittel, Glaswaren und Einwegartikel	7,000€
Mikroskopie	Verbrauchsmaterial, Fluoreszenz- und Montagefarbstoffe, Software	3,000€
Insgesamt		10,000€

Ausblick:

Die Verwirklichung der Ziele dieses Projekts wird neue prognostische und prädiktive Instrumente hervorbringen. Konkret werden wir:

- das MT-Netzwerk bei SPG4-HSP-Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad der Erkrankung zu analysieren.
- den MT-Phänotyp zu charakterisieren, der für die Ex-vivo-Messung der Wirkungen verschiedener Medikamente und für die In-vivo-Messung von Patientenbehandlungen nützlich sein kann.

Zitierte Literatur:

1- Bürger J, Fonknechten N, Hoeltzenbein M, Neumann L, Bratanoff E, Hazan J, Reis A. (2000) Hereditäre spastische Paraplegie verursacht durch Mutationen im SPG4-Gen. Eur J Hum Genet. 10:771-6.

- 2- Shoukier M, Neesen J, Sauter SM et al. (2009) Erweiterung des Mutationsspektrums, Bestimmung von Mutationsclusterregionen und prädiktive strukturelle Klassifizierung von SPAST-Mutationen bei ereditärer spastischer Paraplegie. *Eur J Hum Genet.* 17:187-94.
- 3- Riano E, Martignoni M, Mancuso G et al. (2009) Pleiotrope Effekte von Spastin auf das Neuritenwachstum in Abhängigkeit vom Expressionsniveau. *J Neurochem.* 5:1277-88.
- 4- Solowska JM, Garbern JY, Baas PW. (2010) Evaluierung des Funktionsverlustes als Erklärung für SPG4-basierte hereditäre spastische Paraplegie. *Hum Mol Genet.* 14:2767-79.
- 5- Havlicek S, Kohl Z, Mishra HK, et al., (2014) Gene dosage-dependent rescue of HSP neurite defects in SPG4 patients' neurons. *Hum Mol Genet.* 10:2527-41.
- 6- Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Bönsch D, et al. (2000) Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet.* 637-44.
- 7- Santorelli FM, Patrono C, Fortini D, Tessa A, Comanducci G, Bertini E, Pierallini A, Amabile GA, Casali C. (2000) Intrafamiliäre Variabilität bei hereditärer spastischer Paraplegie in Verbindung mit einer SPG4-Genmutation. *Neurology.* 55,702-537.
- 8- Pisciotani A, Biancolillo L, Ferrara M, Valente D, Sardina F, Monteonofrio L, Camerini S, Crescenzi M, Soddu S, Rinaldo C. HIPK2 Phosphorylates the Microtubule-Severing Enzyme Spastin at S268 for Abscission. *Cells.* 2019 Jul 5;8(7).
- 9- Sardina F, Pisciotani A, Ferrara M, Valente D, Casella M, Crescenzi M, Peschiaroli A, Casali C, Soddu S, Grierson AJ, Rinaldo C. Erholung von Spastin bei hereditärer spastischer Paraplegie durch Verhinderung des neddylierungsabhängigen Abbaus. *Life Sci Alliance.* (2020) Oct 26;3(12) :e202000799.
- 10-Rodriguez-Muela N, Litterman NK, Norabuena EM, Mull JL, Galazo MJ, Sun C, Ng SY, Makhortova NR, White A, Lynes MM, Chung WK, Davidow LS, Macklis JD, Rubin LL. Single-Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease. *Cell Rep.* (2017) 18:1484- 1498.
- 11- Sardina F, Valente D, Fattorini G, Cioffi E, Zanna GD, Tessa A, Trisciuglio D, Soddu S, Santorelli FM, Casali C, Rinaldo C. New cellular imaging-based method to distinguish the SPG4 subtype of hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol.* 2023 Jun;30(6):1734-1744. doi: 10.1111/ene.15756.
- 12- Carpenter A, Jones T, Lamprecht M, Clarke C, Kang I, Friman O, Guertin D, Han Chang J, Lindquist R, Moffat J, Golland P, D. CellProfiler: Bildanalyse-Software zur Identifizierung und Quantifizierung von Zellphänotypen. *Genome Biol* 2006;7(10).
- 13-Rossi S, Rubegni A, Riso V, Barghigiani M, Bassi MT, Battini R, Bertini E, Cereda C, Cioffi E, Criscuolo C, Dal Fabbro B, Dato C, D'Angelo MG, Di Muzio A, Diamanti L, Dotti MT, Filla A, Gioiosa V, Liguori R, Martinuzzi A, Massa R, Mignarri A, Moroni R, Musumeci O, Nicita F, Orologio I, Orsi L, Pegoraro E, Petrucci A, Plumari M, Ricca I, Rizzo G, Romano S, Rumore R, Sampaolo S, Scarlato M, Seri M, Stefan C, Straccia G, Tessa A, Travaglini L, Trovato R, Ulgheri L, Vazza G, Orlacchio A, Silvestri G, Santorelli FM, Melone MAB, Casali C. Klinisch-genetische Merkmale, die die Behinderung bei spastischer Paraplegie Typ 4 beeinflussen: Eine Querschnittsstudie des italienischen DAISY-Netzwerks. *Neurol Genet.* 2022 Mar 30;8(2):e664.
- 14- Schüle R, Holland-Letz T, Klimpe S, Kassubek J, Klopstock T, Mall V, Otto S, Winner B, Schöls L. Die Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS) Ein zuverlässiges und gültiges Maß für die Schwere der Erkrankung. *Neurology,* 2006 67(3).

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Geburt: 03/10/1984, Palermo, Italien

Staatsangehörigkeit: Italienisch

E-Mail Adresse: francesca.sardina3@gmail.com

Gegenwärtige Zugehörigkeit: Institut für Molekularbiologie und Pathologie, Nationaler Forschungsrat von Italien, Rom

Forschungsposition und Hauptaktivitäten

Januar 2017 - heute: Postdoktorandin am Institut für Molekularbiologie und Pathologie CNR, Labor C. Rinaldo, Rom, Italien.

- Untersuchungen zur Regulierung von Spastin bei der Zytokinese (Pisciottani et al., Cells 2019; Sardina et al., Front Cell Dev Biol. 2020) und bei hereditärer spastischer Paraplegie (Sardina et al., LSA, 2020; Sardina et al., eingereichtes Manuskript).
- Erhielt ein Kurzzeit-Forschungsstipendium mit dem Titel "The HIPK2 kinase/spastin axis in Hereditary Spastic Paraplegia (HSP): functional roles and potential therapeutic applications" (Die HIPK2-Kinase/Spastin-Achse bei hereditärer spastischer Paraplegie: funktionelle Rollen und potenzielle therapeutische Anwendungen), finanziert von Embo am Sheffield Institute for Translational Neuroscience, University of Sheffield, Sheffield, UK (90 Tage).
- Einrichtung neuer Hochdurchsatz-Analysepipelines unter Verwendung von Tools wie Cell Profiler und Prism zur Analyse des Zytoskelett-Netzwerks und zur Bewertung der Auswirkungen spezifischer Behandlungen auf die Organisation des Zytoskeletts in Zellen von SPG4-HSP-Patienten (Sardina et al., EJoN, 2023).
- Ausbildung und Unterricht
- Verfassen wissenschaftlicher Artikel und Vorträge auf internationalen Konferenzen

November 2014-Dezember 2016: Postdoktorandin in der Abteilung für Molekulare Medizin, Universität La Sapienza, Labor G. Giannini, Rom, Italien.

- Untersuchung der Rolle des MRN-Komplexes in einem MYCN-abhängigen Kontext (z. B. in einem MYCN-überexprimierenden Modell und in Vorläuferzellen des Granulums, Petroni et al., CDD 2016).
- Identifizierung einer DNA-schädigenden Kombinationsbehandlung als therapeutische Strategie für Hochrisiko-Neuroblastome (Colicchia et al., Oncogene 2017; Petroni, Sardina et al., CDDis2018).
- Charakterisierte Hedgehog-MYCN-abhängige Proliferation von Kleinhirnstammzellen und Körnervorläuferzellen (Petroni et al, Scient Rep 2019).
- Ausbildung und Unterricht
- Verfassen wissenschaftlicher Artikel und Vorträge auf internationalen Konferenzen
- Aufsicht über die Laborausstattung

Akademische Qualifikationen

Eignungsprüfung zum **Berufsbiologen** (Dezember 2017)

Promotion in medizinischer Biotechnologie, Universität Siena, Italien (Verteidigung am 25-März 2015).

MSc-Abschluss in Biotechnologie für Industrie und wissenschaftliche Forschung ("Laurea Specialistica"), Universität Palermo, Italien (Abschluss 19-November 2009, Abschlussnote 110/110 cum Laude).

BSc-Abschluss in Biologie, Universität Palermo, Italien (Abschlussnote 11-Okttober 2007, 110/110 cum Laude).

Sprachen

Italienisch (Muttersprache), Englisch (fließend).

Auszeichnungen

September 2021: Adolf-Struempell-Preis für das Manuskript Sardina et al., LSA 2020; doi: 10.26508/lisa.202000799.

https://www.hspinfo.de/en/news/news.html?tx_news_pi1%5Bnews%5D=605&tx_news_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx_news_pi1%5Baction%5D=detail&cHash=10789b3cdd942adb327338b68800a96e.

Juli 2021: AFM-Telethon-Postdoktorandenstipendium (zwei Jahre) "Phänotypische Bewertung des Mikrotubuli-Netzwerks als prognostischer und prädiktiver Marker für die Reaktion auf Spastin-erhöhende Maßnahmen bei hereditärer spastischer Paraplegie Typ 4" (rif N°23786).

<http://www.afm-telethon.com/research/calls-for-proposals/current-calls-for-proposals.html>

April 2021: A.I.Vi.P.S ETS-Forschungspreis "Mikrotubuli-Zytoskelett-Organisation als Biomarker zur Entwicklung neuer therapeutischer Perspektiven für hereditäre spastische Paraplegie Typ 4 (HSP-SPG4)" <https://www.aivips.it/news/news/197-progetto-di-ricerca-condiviso-italia-francia-su-spg4>.

Liste der Veröffentlichungen

1. **Sardina F (korrespondierender Autor)**, Valente D, Fattorini G, Cioffi E, Zanna GD, Tessa A, Trisciuglio D, Soddu S, Santorelli FM, Casali C, Rinaldo C. New cellular imaging-based method to distinguish the SPG4 subtype of hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol.* 2023 Jun;30(6):1734- 1744. doi: 10.1111/ene.15756.

2. **Sardina F**, Conte A, Paladino S, Pierantoni GM, Rinaldo C. HIPK2 in the physiology of nervous system and its implications in neurological disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2023 Jun;1870(5):119465. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119465. Epub 2023 Mar 20. PMID: 36935052; PMCID: PMC10236203.

3. **Sardina F ()**, Pisciotanni A, Ferrara M, Valente D, Casella M, Crescenzi M, Peschiaroli A, Casali C, Soddu S, Grierson AJ, Rinaldo C. Spastin erholt sich bei hereditärer spastischer Paraplegie durch Verhinderung des Neddylierungs-abhängigen Abbaus. *Life Sci Alliance.* 2020; 26;3(12):e202000799. doi: 10.26508/lisa.202000799.

4. **Sardina F**, Monteonofrio L, Ferrara M, Magi F, Soddu S, Rinaldo C. HIPK2 Is Required for Midbody Remnant Removal Through Autophagy-Mediated Degradation. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8:572094. doi: 10.3389/fcell.2020.572094.

5. Petroni M, Sahùn Roncero M, Ramponi V, Fabretti F, Nicolis Di Robilant V, Moretti M, Alfano V, Corsi A, De Panfilis S, Giubettini M, Di Giulio S, Capalbo C, Belardinilli F, Coppa A, **Sardina F**, Colicchia V, Pedretti F, Infante P, Cardinali B, Tessitore A, Canettieri G, De Smaele E, Giannini G. SMO-M2-Mutation unterstützt nicht die zellautonome Hedgehog-Aktivität in Kleinhirn-Körnerzellen-Vorläufern. *Sci Rep.* 2019;9(1):19623. doi: 10.1038/s41598-019-56057-y.

6. Pisciotanni A, Biancolillo L, Ferrara M, Valente D, **Sardina F**, Monteonofrio L, Camerini S, Crescenzi M, Soddu S, Rinaldo C. HIPK2 Phosphorylates the Microtubule-Severing Enzyme Spastin at S268 for Abscission. *Cells.* 2019;8(7):684. doi: 10.3390/cells8070684.

7. **Sardina F**, Valente D, Ferrara M, Pisciotanni A, Crescenzi M, Soddu S, Rinaldo C. Die Kinase HIPK2 reguliert das Spastin-Protein: Implications in hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosci* 2018; doi: 10.21767/2171-6625-C2-012.

- 8.** Petroni M, **Sardina F (Co-Erstautor)**, Infante P, Bartolazzi A, Locatelli E, Fabretti F, Di Giulio S, Capalbo C, Cardinali B, Coppa A, Tessitore A, Colicchia V, Sahùn Roncero M, Belardinilli F, Di Marcotullio L, Soddu S, Comes Franchini M, Petricci E, Gulino A, Giannini G. Die Hemmung von MRE11 zeigt eine vom Replikationsstress abhängige Anfälligkeit von MYCN-gesteuerten Tumoren auf. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):895. doi: 10.1038/s41419-018-0924-z.
- 9.** Colicchia V, Petroni M, Guarguaglini G, **Sardina F**, Sahùn-Roncero M, Carbonari M, Ricci B, Heil C, Capalbo C, Belardinilli F, Coppa A, Peruzzi G, Screpanti I, Lavia P, Gulino A, Giannini G. PARP-Inhibitoren verstärken den Replikationsstress und verursachen eine mitotische Katastrophe im MYCN-abhängigen Neuroblastom. *Oncogene.* 2017;36(33):4682-4691. doi: 10.1038/onc.2017.40.
- 10.** Petroni M, **Sardina F**, Sahùn-Roncero M, Heil C, Infante P, Ricci B, Petricci E, Locatelli E, Comes-Franchini M, Giannini G. The MRN complex: A potential target for MYCN amplified neuroblastoma. *European Journal of Cancer* 2016; 61(1):S135-S136. doi:10.1016/S0959-8049(16)61479-X.
- 11.** Petroni M, **Sardina F**, Heil C, Sahùn-Roncero M, Colicchia V, Veschi V, Albini S, Fruci D, Ricci B, Soriani A, Di Marcotullio L, Screpanti I, Gulino A, Giannini G. Der MRN-Komplex wird während der neuronalen Zellproliferation durch MYCN transkriptionell reguliert, um Replikationsstress zu kontrollieren. *Cell Death Differ.* 2016 Feb;23(2):197-206. doi: 10.1038/cdd.2015.81.
- 12.** Cervello M, Bachvarov D, Cusimano A, **Sardina F**, Azzolina A, Lampiasi N, Giannitrapani L, McCubrey JA, Montalto G. COX-2-abhängige und COX-2-unabhängige Wirkungsweise von Celecoxib in menschlichen Leberkrebszellen. *OMICS.* 2011;15(6):383-92. doi: 10.1089/omi.2010.0092.