



La posizione della variante di NOTCH3 influenza il fenotipo a livello delle cellule staminali pluripotenti nella CADASIL

*NOTCH3 Variant Position Affects the Phenotype at the Pluripotent
Stem Cell Level in CADASIL*

Nome candidata:
Sara Orsolini

Sessione estiva luglio 2026
Anno Accademico 2025/2026

Nome relatrice:
Giorgia Gioacchini

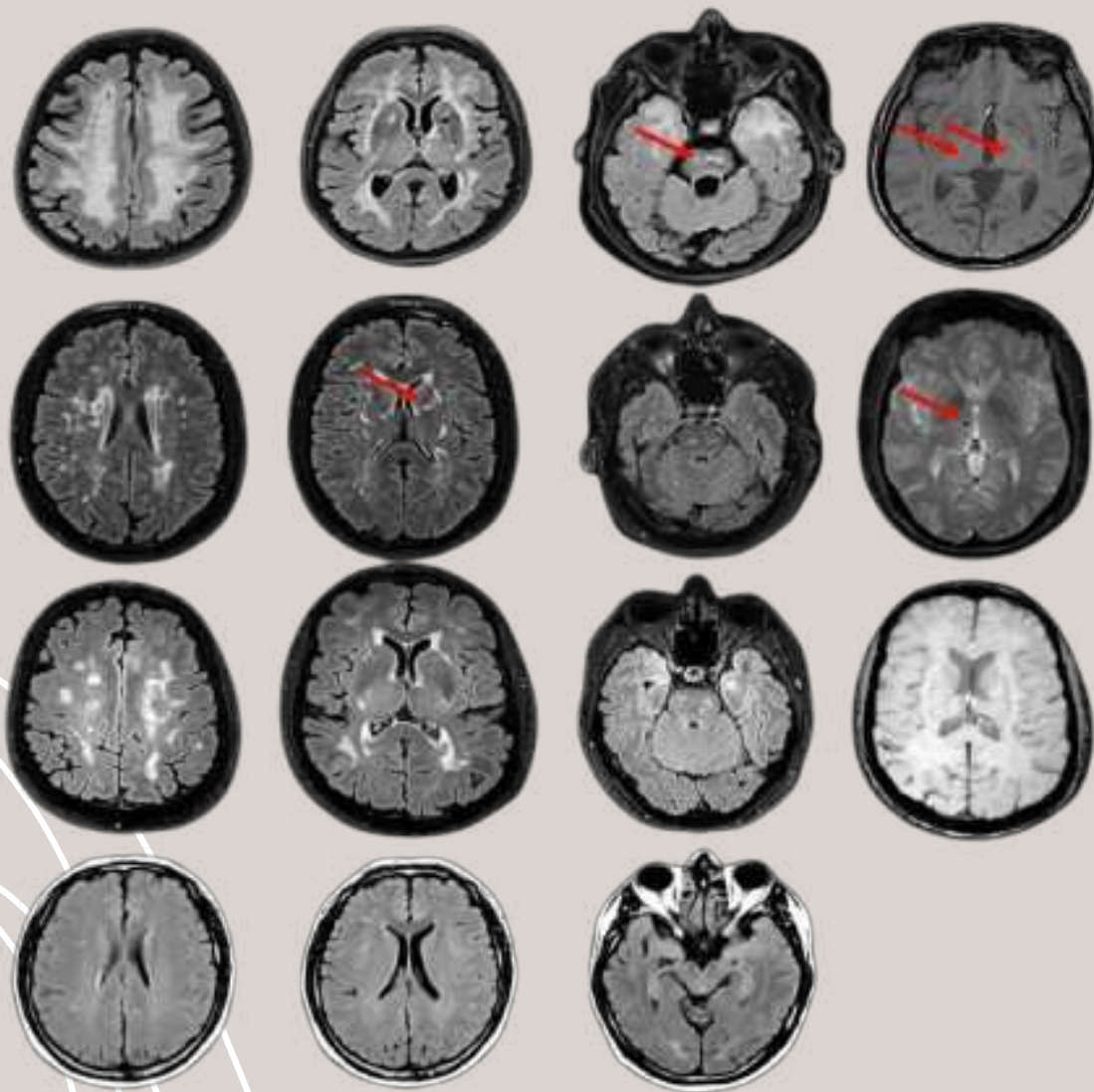
Indice

- 01** Abstract
- 02** Cos'è la CADASIL?
- 03** Concetti chiave
- 04** Materiali e metodi
- 05** Risultati
- 06** Conclusioni

Abstract

Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) is the most common genetic form of stroke. It is caused by a cysteine-altering variant in one of the 34 epidermal growth factor-like repeat (EGFr) domains of Notch3. *NOTCH3* pathogenic variants in EGFr 1–6 are associated with high disease severity, whereas those in EGFr 7–34 are associated with late stroke onset and increased survival. However, whether and how the position of the *NOTCH3* variant directly affects the disease severity remains unclear. In this study, we aimed to generate human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from patients with CADASIL with EGFr 1–6 and 7–34 pathogenic variants to evaluate whether the *NOTCH3* position affects the cell phenotype and protein profile of the generated hiPSCs lines. Six hiPSCs lines were generated: two from patients with CADASIL with EGFr 1–6 pathogenic variants, two from patients with EGFr 7–34 variants, and two from controls. Notch3 aggregation and protein profiles were tested in the established six hiPSCs lines. Cell analysis revealed that the *NOTCH3* variants did not limit the cell reprogramming efficiency. However, EGFr 1–6 variant position was associated with increased accumulation of Notch3 protein in pluripotent stem cells and proteomic changes related with cytoplasmic reorganization mechanisms. In conclusion, our analysis of hiPSCs derived from patients with CADASIL support the clinical association between the *NOTCH3* variant position and severity of CADASIL.

Cos'è la CADASIL?



- Arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarti subcorticali e leucoencefalopatia associata alla mutazione di NOTCH3.
- Caratterizzata da: estese iperintensità della sostanza bianca (WMH), piccoli infarti cerebrali, declino cognitivo, disabilità motoria e disturbi psichiatrici

Concetti chiave

01. NOTCH3

- Recettore vascolare - espresso su cellule muscolari lisce e periciti; regola la stabilità dei microvasi.
- Meccanismo - mutazioni dei residui di cisteina che alterano i domini EGFr, causando l'accumulo della porzione extracellulare (NECD).

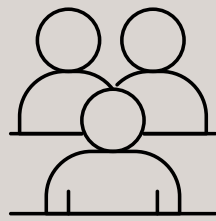
02. La patologia

- Danno (GOM) - formazione di materiale osmiofilo granulare, causa principale della patologia vascolare.
- Effetto Posizione - EGFr 1-6 → fenotipo più grave; EGFr 7-34 → fenotipo più lieve.

03. hiPSC

- hiPSC - cellule pluripotenti indotte derivate direttamente dai pazienti.
- Modello in vitro - riproducono la mutazione specifica per studiare la patogenesi e testare terapie.

Materiali e Metodi



Partecipanti

- Reclutamento prospettico di 4 pazienti affetti da CADASIL e 2 controlli sani.
- Studio approvato dai rispettivi Comitati Etici con consenso informato.



Isolamento PBMC

- Prelievo di 8 mL di sangue periferico in provette EDTA.
- Isolamento delle PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) tramite gradiente di densità.

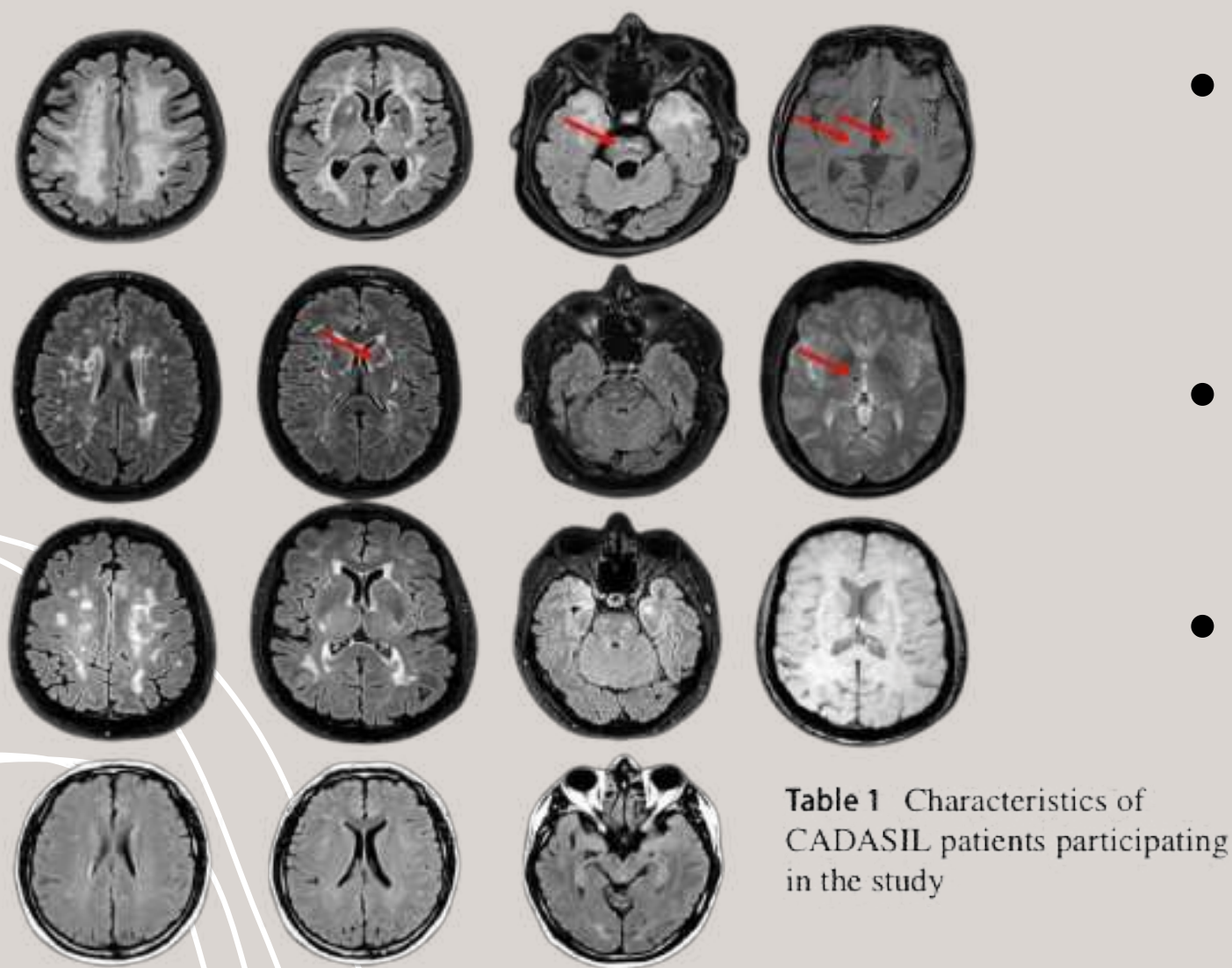


Riprogrammazione e analisi

- Coltura delle PBMC in terreno StemPro-34 SFM con citochine.
- Mantenimento delle colonie per 3-4 settimane su matrice Matrigel in terreno mTeSR Plus.
- Caratterizzazione e confronto di 6 linee cellulari totali per valutare l'accumulo di Notch3 e il profilo proteomico.

Risultati

1. Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da CADASIL



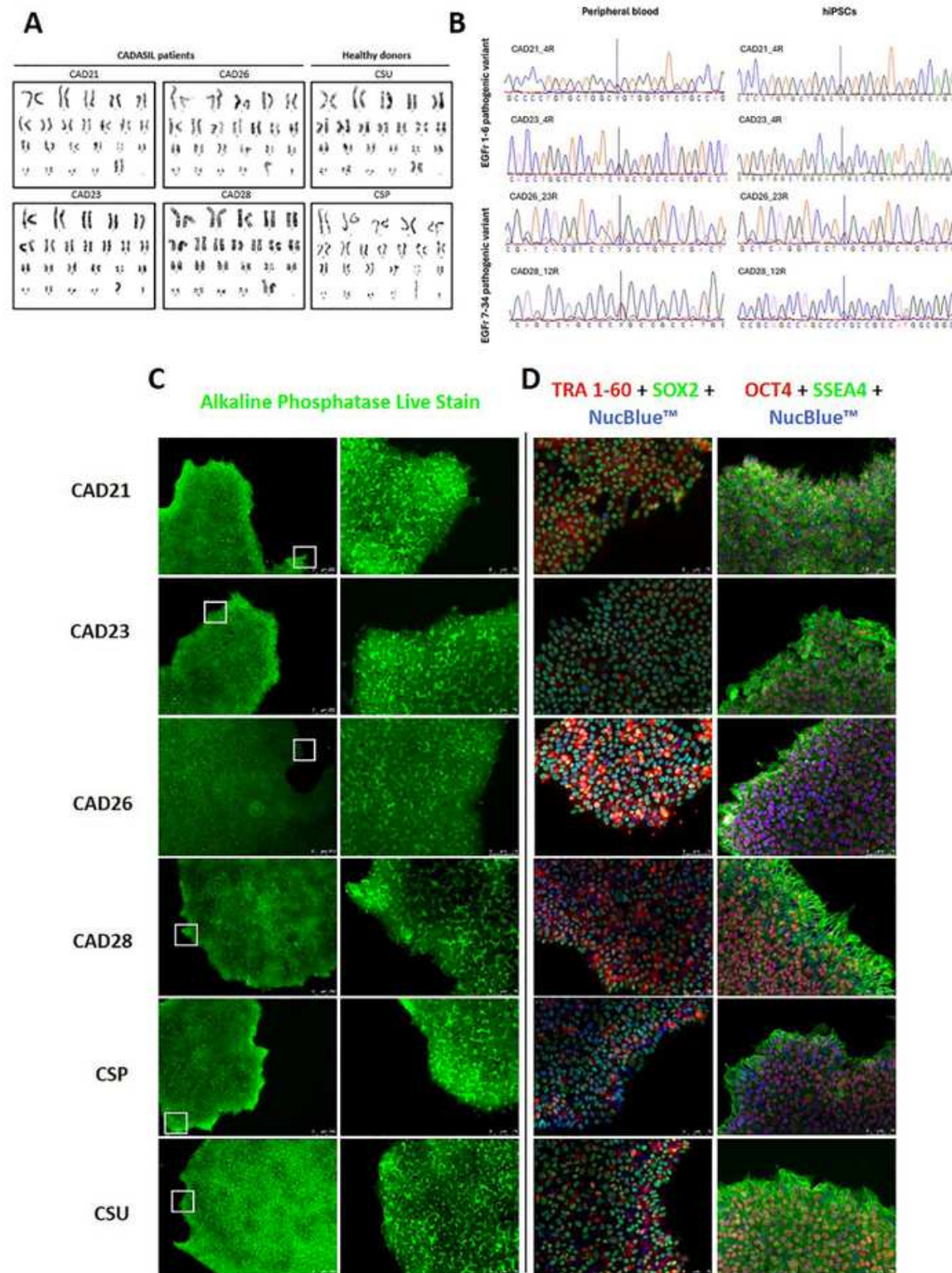
- Quattro pazienti affetti da CADASIL, un maschio e una femmina con EGFr 1–6 e due, un maschio e una femmina con varianti EGFr 7–34 NOTCH3.
- Varianti EGFr 1–6: Risonanza con estese WMH, lacune multiple, microemorragie e ictus ischemico.
- Varianti EGFr 7–34: Quadro più lieve; nessun ictus o lacune alla risonanza.

hiPSCs identity	Gender	Ethnicity	Age	Genotype of locus	Exon	Disease
CAD21	F	Caucasian	59	R90C	3	CADASIL
CAD23	M	Caucasian	44	R182C	4	CADASIL
CAD26	M	Caucasian	32	R1242C	23	CADASIL
CAD28	F	Caucasian	64	C591R	1	CADASIL

Risultati

2. Caratterizzazione delle hiPSC

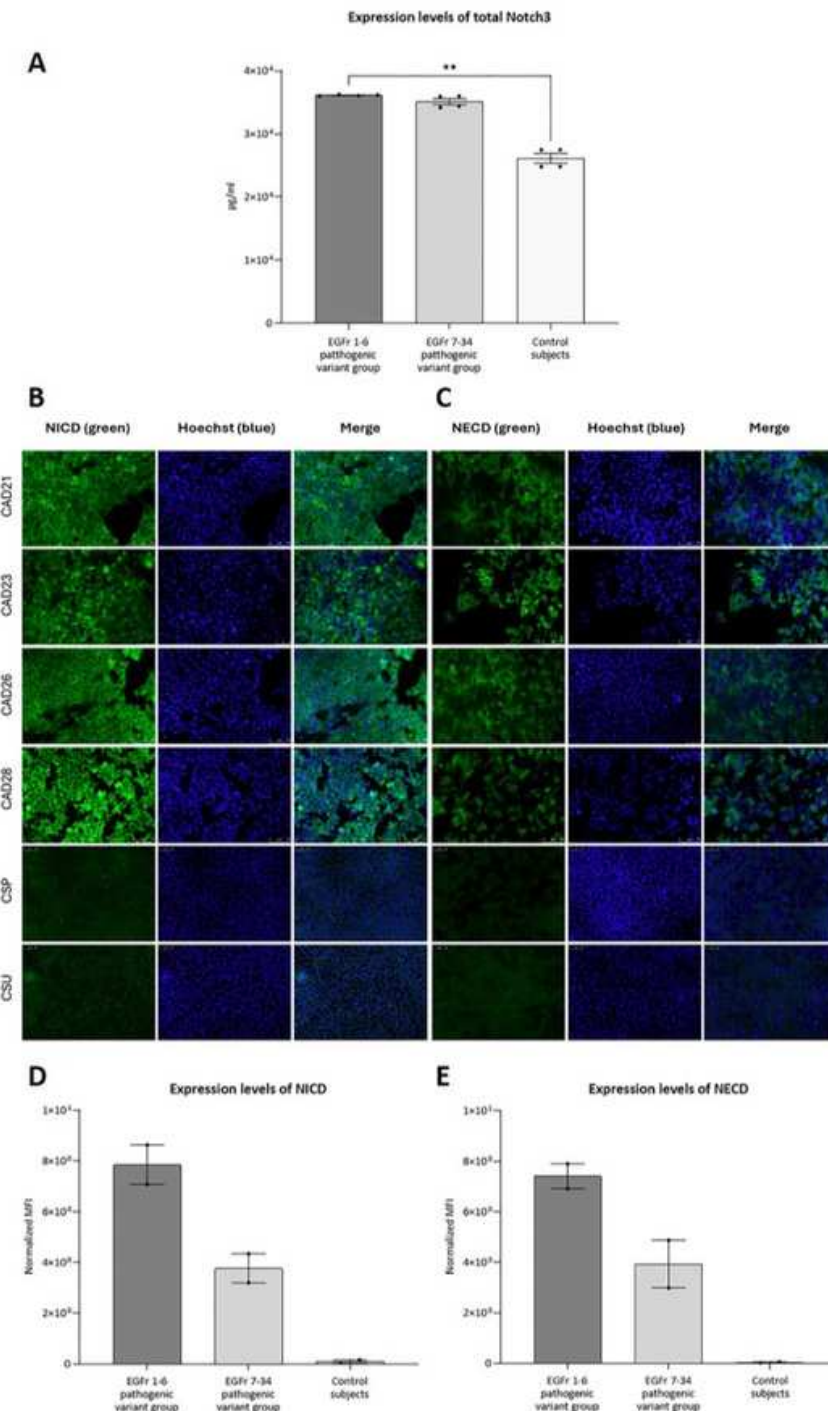
- Cariotipo: normale - nessuna alterazione cromosomica dovuta alla riprogrammazione (fig. A).
- Sequenziamento Sanger: confermata la presenza della mutazione NOTCH3 originale (fig. B).
- Pluripotenza: espressione corretta dei marcatori (OCT4, SOX2, SSEA4, TRA1-60) e differenziazione riuscita nei 3 foglietti embrionali (fig. C).



Risultati

3. Espressione ed Accumulo di NOTCH3

Fig. 3 Analysis of full-length Notch3 receptor and Notch intracellular domain (NICD) and Notch extracellular domain (NECD) in the six generated human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines from CADASIL patients and controls. **a** Comparative analysis of full-length Notch3 expression levels (pg/ml) in hiPSCs from patients with CADASIL EGFr 1–6 pathogenic group (patients coded as CAD21 and CAD23), 7–34 pathogenic group (patients coded as CAD26 and CAD28) and control subjects. **b** Immunocytochemical staining analysis of NICD (green, left panels), Hoechst (blue, middle panels) and merge images (right panels) and **c** immunocytochemical staining analysis of NECD (green, left panels), Hoechst (blue, middle panels) and merge images (right panels) of the six generated hiPSCs lines from the four CADASIL patients (coded as CAD21, CAD23, CAD26 and CAD28) and two control subjects (coded as CSU and CSP). Scale bar: 75 μ m (20 $\times$). **d** Quantitative fluorescence analysis of NICD and **e** NECD immune staining in EGFr 1–6 and 7–34 pathogenic variants and controls. In both analyses, data are expressed as mean fluorescence of intensity (MFI) normalized to Hoechst expression. Data are expressed as normalized MFI, with each group containing n=2 per group (two replicates/hiPSCs lines). Data are compared with the control group



Saggio ELISA (Quantitativo):

- Livelli di Notch3 più elevati nei pazienti rispetto ai controlli.
- Significatività massima nelle varianti EGFr 1–6.

Immunocitochimica (Localizzazione):

- Accumulo maggiore nei domini EGFr 1–6 rispetto a EGFr 7–34.
- NECD (extracellulare): aggregati sulla membrana plasmatica.
- NICD (intracellulare): pattern diffuso nel citoplasma.

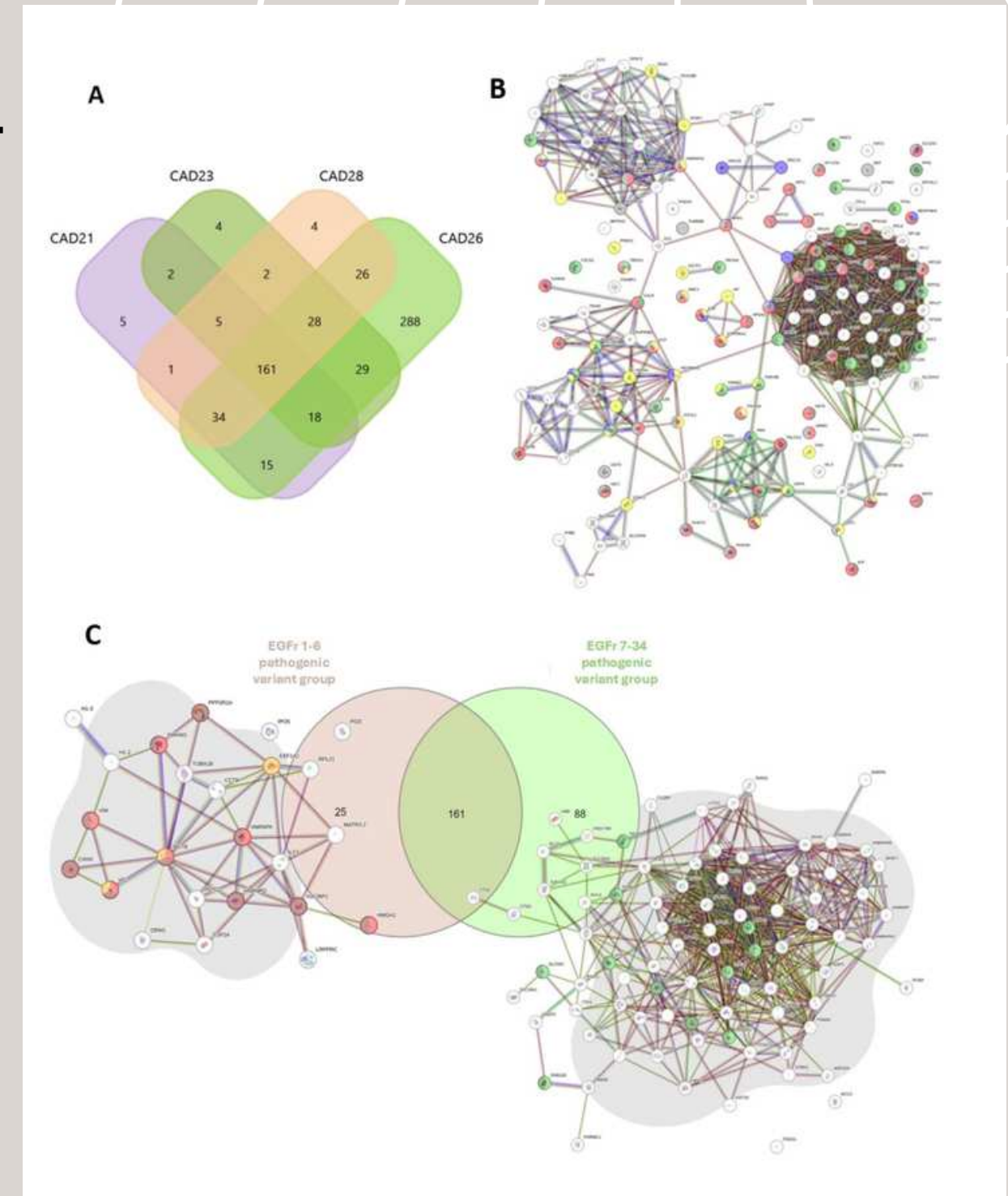
4. Profilo Proteico: Cosa cambia nella CADASIL?

1. I difetti comuni:

- danno ai vasi, con ridotta espressione dei geni VSMC.
- alterazione cellulare: difetti del citoscheletro.

2. Differenze in base alla variante:

- Mutazioni Gravi (EGFr 1–6):
 - 64 proteine alterate, legate a processi neurodegenerativi.
 - forte alterazione della Vimentina.
- Mutazioni Lievi (EGFr 7–34):
 - 85 proteine alterate, legate principalmente all'adesione tra cellule.



Conclusioni e prospettive

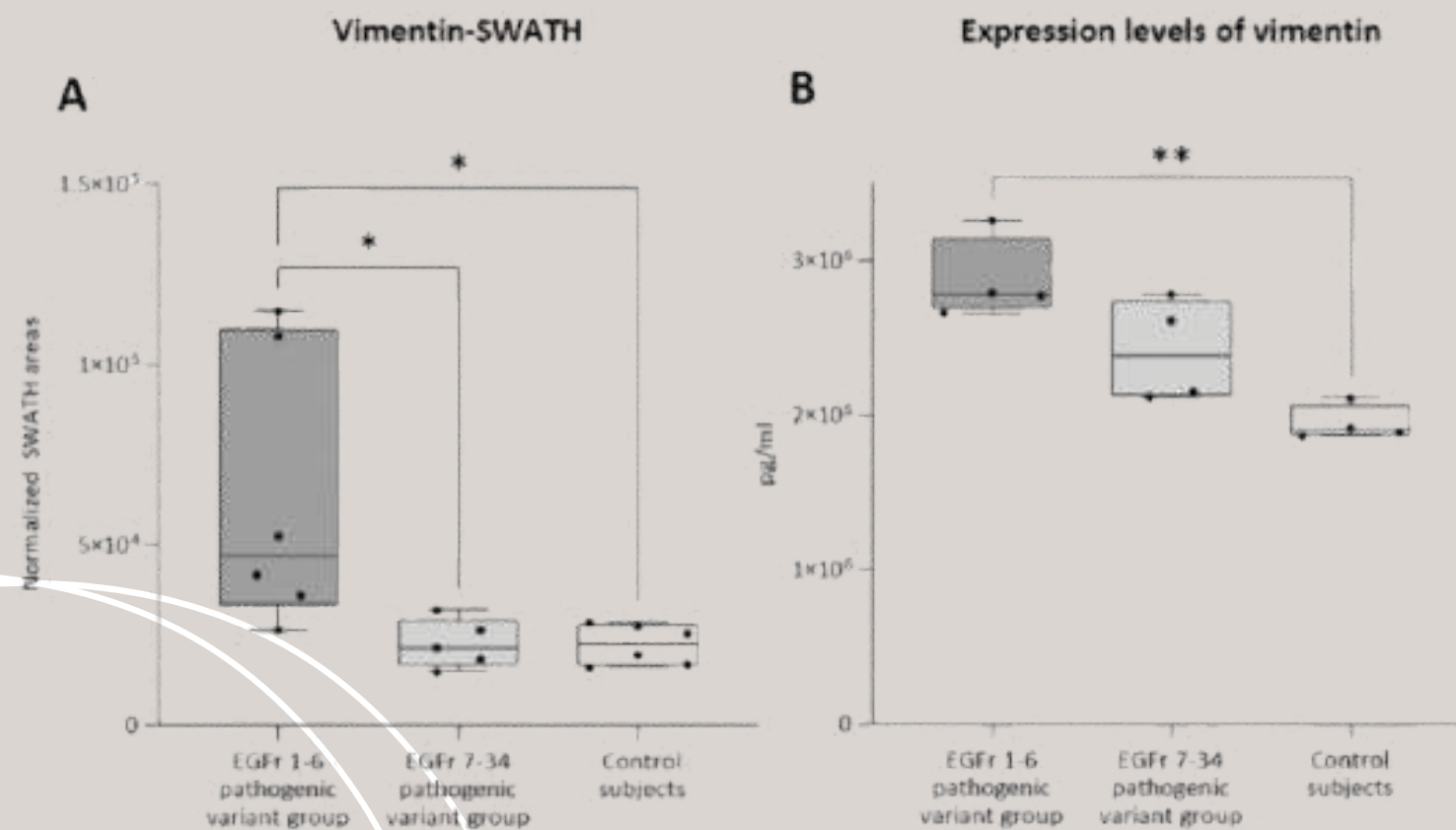


Fig. 7 Validation of vimentin data. **a** Quantitative sequential window acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH-MS) analysis of vimentin in patients with CADASIL. EGFr 1-6 pathogenic group (patients coded as CAD21 and CAD23), 7-34 pathogenic group (patients coded as CAD26 and CAD28) and control subjects (coded as CSU and CSP). **b** Comparative analysis of vimentin levels

(pg/ml) in human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines from patients with CADASIL. EGFr 1-6 pathogenic group (patients coded as CAD21 and CAD23), 7-34 pathogenic group (patients coded as CAD26 and CAD28) and control subjects (coded as CSU and CSP). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to control group; $n = 6$ per group (sex replicates/hiPSCs lines)

- Modello hiPSC valido: la posizione della mutazione non influisce sulla generazione delle cellule staminali.
- Correlazione biologica: le varianti EGFr 1-6 (più gravi) mostrano maggiore accumulo di Notch3 e alterazioni del citoscheletro già a livello staminale.
- Biomarker: la Vimentina emerge come potenziale indicatore di gravità clinica.
- Prospettive: necessario validare i dati differenziando le hiPSC in cellule muscolari lisce (VSMC) su una coorte più ampia.

Bibliografia

***NOTCH3* Variant Position Affects the Phenotype at the Pluripotent Stem Cell Level in CADASIL**

Ana Bugallo-Casal^{1,2} · Elena Muiño^{3,4} · Susana B. Bravo⁵ · Pablo Hervella⁶ · Susana Arias-Rivas⁷ · Manuel Rodríguez-Yáñez⁷ · Enrique Vara-León¹² · Rita Quintas-Rey⁸ · Lara Pérez-Gayol¹ · Olga Maisterra-Santos⁹ · Jesús Pizarro-González⁹ · María Rosa Martorell-Riera¹⁰ · Cristòfol Vives-Bauzá¹¹ · Israel Fernández-Cadenas³ · José Castillo⁶ · Francisco Campos¹

Received: 26 November 2024 / Accepted: 15 February 2025

© The Author(s) 2025

Grazie per l'attenzione!

«Non smetteremo di esplorare. E la fine di tutta la nostra esplorazione sarà arrivare dove siamo partiti e conoscere il posto per la prima volta.» — T.S. Eliot"