

APPROCCIO DI TERAPIA GENICA PER IL DISORDINE DA DEFICIT DI CDKL5

PRESENTAZIONE GENERALE

La terapia genica per i disturbi del sistema nervoso centrale, benefici e rischi.

La terapia genica – che consiste nella sostituzione o affiancamento di un gene mutato non funzionante con una copia funzionale del gene – sta diventando una concreta realtà di trattamento per i disturbi che riguardano il sistema nervoso centrale (SNC). Fino ad un decennio fa, le strategie basate sul trasferimento di materiale genetico al cervello consistevano nell'iniezione locale, nel cervello, dei vettori virali. La distribuzione del gene al maggior numero possibile di cellule cerebrali veniva realizzata solo mediante iniezioni multiple di vettori virali capaci di creare delle sacche di espressione del transgene sparse in tutto il cervello. I recenti progressi compiuti riguardo la progettazione di nuovi vettori virali e l'individuazione di vie di somministrazione alternative, hanno reso possibile una distribuzione diffusa del gene a tutto il SNC utilizzando iniezioni sistemiche. Attualmente i vettori virali più promettenti per il trasferimento genico nel SNC sono quelli basati su virus adeno-associati (AAV); questi infatti posseggono caratteristiche tali da renderli veicoli ideali per tale scopo. Nonostante gli AAV infettino l'uomo naturalmente, tale infezione non risulta patogena, tant'è vero che questi sono denominati "dependovirus" essendo dipendenti dalla presenza di helper virus per poter replicare. Oltre alla loro sicurezza, va sottolineata la capacità degli AAV di infettare sia cellule in divisione sia quiescenti conferendo un'espressione genica stabile e a lungo termine, senza l'insorgenza di reazioni infiammatorie o di effetti tossici. Inoltre, la rapida evoluzione dei metodi di produzione e purificazione di questi vettori ha agevolato il loro utilizzo sia per applicazioni di ricerca di base sia per trials clinici che ne richiedono grandi quantità. I rapidi progressi ottenuti nel **trasferimento generalizzato del gene a tutto il SNC** mediante l'utilizzo di AAV hanno reso concreta la possibilità di applicare la terapia genica a patologie dello sviluppo nervoso come: la malattia da accumulo lisosomiale, la Sindrome di Rett, il Disturbo CDKL5, la Sindrome dell'X fragile e l'autismo (Gray, 2013). **Tuttavia, la terapia genica nell'uomo non è priva di rischi. Il principale ostacolo sembra essere rappresentato dalla** bassa efficienza di trasferimento dei vettori virali nel SNC che rende necessario l'utilizzo di grosse quantità di virus. Questo comporta un aumento del rischio di sviluppare reazioni immunitarie come confermato dai trials clinici per l'emofilia B (Manno et al., 2006; Nathwani et al., 2014). Inoltre, il nuovo gene potrebbe inserirsi in siti specifici nel genoma causando mutazioni dannose o addirittura tumori, come già riscontrato in diversi studi sui roditori (Donsante et al., 2007).

Razionale del progetto

Sebbene i risultati sperimentali dimostrino le elevate potenzialità terapeutiche della terapia genica, restano ancora notevoli problemi da risolvere riguardo l'utilizzo di questo approccio per la cura di patologie cerebrali. In teoria, se la proteina prodotta dalle cellule infettate potesse essere secreta e capace successivamente di entrare nelle cellule adiacenti, l'effetto terapeutico sarebbe amplificato: infatti, sebbene il numero di cellule che ha integrato il vettore risulti basso, esse potrebbero comunque divenire una "fabbrica" per la produzione della proteina terapeutica per le cellule attigue. Se venisse infettato un numero sufficientemente alto di cellule, tale da fornire le quantità di proteina necessarie per tutto il SNC, il trattamento risulterebbe estremamente efficace. In uno scenario come questo il trasferimento genico non richiederebbe necessariamente un'elevata efficienza portando di conseguenza ad una diminuzione del rischio di mutagenesi inserzionale e di effetti collaterali nocivi che invece sono associati all'utilizzo di elevate dosi virali (Fig. 1). Inoltre, l'utilizzo di nuovi capsidi per AAV, opportunamente ingegnerizzati al fine di ottenere una cospicua e altamente specifica trasduzione del gene nel SNC, permetterebbe un'ulteriore riduzione delle dosi virali efficaci a scopo terapeutico. Le malattie monogeniche sono disturbi molto gravi,

potenzialmente mortali, per i quali le uniche opzioni terapeutiche consistono in trattamenti palliativi che si protraggono per tutta la vita del paziente. Teoricamente, per questo tipo di patologie, l'approccio terapeutico per eccellenza consisterebbe nella reintroduzione di una copia sana del gene mutato nelle cellule maggiormente compromesse della mancanza di funzione di tale gene.

Il disordine da deficit di CDKL5 (CDD) è un perfetto esempio di malattia monogenica dovuta a mutazioni in un gene, che codifica per una chinasi, CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5), principalmente espressa nelle cellule neuronali (Bertani et al., 2006; Fehr et al., 2013; Guerrini and Parrini, 2012; Mari et al., 2005). Mutazioni in tale gene portano ad un'assenza di espressione e/o di funzionalità di CDKL5 dando origine ad un fenotipo molto severo caratterizzato da disabilità intellettiva, deficit visivi e motori e dall'insorgenza di crisi epilettiche nei primi mesi di vita. Allo stato attuale non esistono terapie efficaci per questa grave patologia.

Obiettivi

Recentemente abbiamo creato un costrutto IgK-TATk-CDKL5 che, grazie alla presenza del peptide leader per le IgK, permette la secrezione costitutiva della proteina TAT-CDKL5 dalle cellule che esprimono tale costrutto. Una volta secreta la proteina è in grado di essere internalizzata dalle cellule adiacenti proprio in virtù della presenza del peptide TAT che conferisce alla proteina di fusione la capacità di attraversare la membrana cellulare. Abbiamo dimostrato che una volta internalizzata la proteina TAT-CDKL5 mantiene la sua normale attività biologica, essa infatti è risultata capace di ripristinare una corretta maturazione neuronale in neuroni che non esprimono CDKL5 (brevetto n° WO/2015/128746).

L'idea innovativa di questo progetto consiste nello sfruttare le proprietà uniche del gene di fusione Igk-TATk-CDKL5 per aumentare l'efficienza e la sicurezza della terapia genica per il CDD. L'approccio basato su tale gene di fusione ha la potenzialità di migliorare notevolmente la biodistribuzione della proteina terapeutica che passerebbe dalle cellule che sono state infettate con il costrutto, e quindi corrette geneticamente, alle cellule adiacenti mediante un meccanismo di cross-correzione in cui, cellule che non hanno ricevuto il costrutto recuperano comunque la funzionalità di CDKL5 mediante l'internalizzazione della proteina TAT-CDKL5 prodotta e secreta dalla cellule circostanti. Di conseguenza ci aspettiamo che questo innovativo approccio di terapia genica sia in grado di incrementare drasticamente l'efficienza di distribuzione della proteina terapeutica nel cervello, consentendo una notevole riduzione dei rischi di tossicità associati alla classica terapia genica. Come vettore per il trasferimento genico ad alta efficienza intendiamo utilizzare un vettore virale adeno-associato (AAV) di ultima generazione capace di trasferire il suo carico terapeutico nei neuroni cerebrali con elevata efficienza e con il minimo rischio di effetti aspecifici, tramite una somministrazione intravenosa (IV) non invasiva del virus. L'utilizzo di un capsido per AVV che non presenta tossicità epatica, dovrebbe inoltre aumentare la sicurezza inerente all'applicazione della terapia genica per i disordini nel SNC. Siamo confidenti del fatto che il vettore terapeutico AVV che svilupperemo sia in grado di infettare le cellule cerebrali ad alta efficienza in seguito ad una somministrazione IV e di promuovere la secrezione della proteina TATk-CDKL5 nel cervello, proteina capace poi di diffondere localmente e rientrare nei neuroni adiacenti compensando in questo modo la mancanza di funzione di CDKL5. Il confronto degli effetti della terapia genica con il solo gene CDKL5 con quella con il gene di fusione IgK-TATk-CDKL5, in un modello murino del disordine CDKL5, ci permetterà di verificare la nostra ipotesi. A questo scopo utilizzeremo un modello murino *Cdkl5* KO già ampiamente caratterizzato che ci permetterà di stabilire l'efficacia di questa innovativa terapia genica nel recupero di un corretto sviluppo cerebrale.

PIANO SPERIMENTALE

L'obiettivo principale del progetto di ricerca proposto è quello di poter confrontare gli effetti di una terapia genica con i vettori AAVLDmt-PHP.B-hSynI-Igk-TATk-CDKL5 e AAVLDmt-PHP.B-hSynI-CDKL5 sul ripristino dello sviluppo cerebrale e delle capacità cognitive dei topi *Cdkl5* KO.

Considerazioni generali: Recentemente sono stati creati modelli animali per CDD, topi knockout per *Cdkl5* (KO) (Amendola et al., 2014) che hanno permesso di chiarire il ruolo di CDKL5 nello sviluppo cerebrale e nell'eziopatogenesi di tale encefalopatia. Il modello murino presenta molti dei sintomi che caratterizzano il disordine CDKL5, i topi *Cdkl5* KO presentano infatti una grave compromissione della memoria e dell'apprendimento ippocampo-dipendenti, deficit visivi e respiratori e stereotipie motorie (Amendola et al., 2014; Fuchs et al., 2018; Fuchs et al., 2015; Fuchs et al., 2014b; Lo Martire et al., 2017; Mazziotti et al., 2017). Questi difetti sono associati ad alterazioni neuroanatomiche che comprendono una ridotta arborizzazione dendritica dei neuroni ippocampali e corticali, una ridotta densità di spine dendritiche ed un'alterata connettività sinaptica (Amendola et al., 2014; Della Sala et al., 2016; Fuchs et al., 2015; Fuchs et al., 2014a; Pizzo et al., 2016; Trazzi et al., 2016).

Dal momento che il disordine CDKL5 è una patologia che si manifesta nel periodo postnatale, ci aspettiamo che un trattamento effettuato durante la prime fasi di vita, che rappresentano il periodo più critico per la maturazione dendritica, sia in grado di migliorare/recuperare lo sviluppo cerebrale e di conseguenza le capacità cognitive e comportamentali nel modello murino della patologia, il topo *Cdkl5* KO. Topi *Cdkl5* KO (-/Y) neonati (1-2 giorni di vita) verranno iniettati per via endovenosa, nella vena temporale (o facciale) (Gombash Lampe et al., 2014), con i vettori AAV9LDmt-PHP.B-hSynI-CDKL5 e AAVLDmt-PHP.B-hSynI-Igk-TATk-CDKL5, e con i vettori di controllo AAV9LDmt-PHP.B-hSynI-GFP e AAVLDmt-PHP.B-hSynI-Igk-TATk-GFP. In questa fase precoce dello sviluppo, il cervello è pressoché immaturo ed estremamente plastico. In questo studio, paragoneremo l'effetto di due diverse dosi di vettori virali (3×10^9 e 3×10^{11} vg per topo). L'effetto del trattamento verrà valutato nei topi trattati divenuti giovani/adulti, a partire cioè dai 40 giorni successivi all'iniezione fino ai 70. Al settantesimo giorno i topi verranno sacrificati e ne analizzeremo lo sviluppo cerebrale e la distribuzione della proteina CDKL5 nelle varie regioni del cervello mediante tecniche di immunoistochimica. Il piano sperimentale per lo studio *in vivo* ci consentirà di ridurre al minimo il numero di animali utilizzati e di raggiungere il nostro obiettivo entro la durata del progetto.

Valutazione dell'efficienza di infezione e della espressione proteica nel cervello

Per valutare l'efficienza di trasduzione del vettore AAV, eseguiremo delle analisi di Real time (PCR quantitativa) su campioni di tessuto cerebrale al fine di determinare il numero di copie di genoma virale (vg) per genoma equivalente diploide (vg/cellula), usando dei primer specifici per il genoma virale e dei primer per il gene murino *agouti*, che verrà utilizzato come controllo endogeno per la normalizzazione dei dati. Lo studio riguardante la biodistribuzione del virus verrà effettuato anche su campioni di fegato per poter paragonare l'efficienza d'infezione del vettore AAVLDmt-PHP.B tra fegato e cervello. L'espressione delle proteine CDKL5 o GFP nel tessuto cerebrale verrà analizzata tramite tecniche di immunoistochimica e quantificata contando il numero di cellule immunoreattive. Ci attendiamo che, a parità di efficienza d'infezione, il vettore AAV-hSynI-Igk-TATk-CDKL5 dia origine ad un maggior numero di cellule CDKL5 positive rispetto al vettore AAV-hSynI-CDKL5, a causa della secrezione della proteina TATk-CDKL5 dalle cellule infettate e della sua internalizzazione nelle cellule adiacenti.

Valutazione degli effetti della terapia genica su memoria e apprendimento, attività motoria, comportamento spontaneo e pattern respiratorio

Tra i sintomi clinici che si riscontrano nei pazienti con CDD troviamo: iperattività, compromissione del controllo motorio, diminuzione dell'ansietà, mancanza di interazioni sociali, disturbi respiratori e compromissione delle capacità cognitive (Fehr et al., 2013; Hagebeuk et al., 2013). Molti di questi sono stati documentati anche nei topi *Cdkl5* KO adulti (Amendola et al., 2014; Lo Martire et al., 2017; Trazzi et al., 2016; Wang et al., 2012). Per studiare l'efficacia del trattamento sul comportamento, gli animali verranno sottoposti a dei test disegnati appositamente per valutare i pattern respiratori, la memoria ippocampo dipendente, la motilità/coordinazione motoria ed i comportamenti innati nella gabbia. Per ridurre il numero degli animali utilizzati, lo stesso animale verrà analizzato mediante diversi test comportamentali in successione, dal meno stressante e invasivo al più invasivo. Abbiamo in programma di utilizzare 8-10 topi per ciascun gruppo sperimentale. Tutti gli studi comportamentali verranno effettuati in cieco. I topi verranno lasciati nella stanza dove effettueremo i test per 1 ora, in modo che si abituino all'ambiente, ed i test verranno effettuati ogni giorno alla stessa ora.

BIBIOGRAFIA

- Amendola, E., et al., 2014. Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. *PLoS One*. 9, e91613.
- Bertani, I., et al., 2006. Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. *J Biol Chem*. 281, 32048-56.
- Della Sala, G., et al., 2016. Dendritic Spine Instability in a Mouse Model of CDKL5 Disorder Is Rescued by Insulin-like Growth Factor 1. *Biol Psychiatry*. 80, 302-311.
- Donsante, A., et al., 2007. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*. 317, 477.
- Fehr, S., et al., 2013. The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet*. 21, 266-73.
- Fuchs, C., et al., 2018. Heterozygous CDKL5 Knockout Female Mice Are a Valuable Animal Model for CDKL5 Disorder. *Neural Plast*. 2018, 9726950.
- Fuchs, C., et al., 2015. Inhibition of GSK3beta rescues hippocampal development and learning in a mouse model of CDKL5 disorder. *Neurobiol Dis*. 82, 298-310.
- Fuchs, C., et al., 2014a. Loss of *Cdkl5* impairs survival and dendritic growth of newborn neurons by altering AKT/GSK-3beta signaling. *Neurobiology of Disease*. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.006.
- Fuchs, C., et al., 2014b. Loss of CDKL5 impairs survival and dendritic growth of newborn neurons by altering AKT/GSK-3beta signaling. *Neurobiol Dis*. 70, 53-68.
- Gombash Lampe, S. E., et al., 2014. Intravenous injections in neonatal mice. *J Vis Exp*. e52037.
- Gray, S. J., 2013. Gene therapy and neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*. 68, 136-42.
- Guerrini, R., Parrini, E., 2012. Epilepsy in Rett syndrome, and CDKL5- and FOXP1-gene-related encephalopathies. *Epilepsia*. 53, 2067-78.
- Hagebeuk, E. E., et al., 2013. Respiratory and sleep disorders in female children with atypical Rett syndrome caused by mutations in the CDKL5 gene. *Dev Med Child Neurol*. 55, 480-4.
- Lo Martire, V., et al., 2017. CDKL5 deficiency entails sleep apneas in mice. *J Sleep Res*. 26, 495-497.
- Manno, C. S., et al., 2006. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 12, 342-7.
- Mari, F., et al., 2005. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*. 14, 1935-46.
- Mazziotti, R., et al., 2017. Searching for biomarkers of CDKL5 disorder: early-onset visual impairment in CDKL5 mutant mice. *Hum Mol Genet*. 26, 2290-2298.

- Nathwani, A. C., et al., 2014. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med.* 371, 1994-2004.
- Pizzo, R., et al., 2016. Lack of Cdkl5 Disrupts the Organization of Excitatory and Inhibitory Synapses and Parvalbumin Interneurons in the Primary Visual Cortex. *Front Cell Neurosci.* 10, 261.
- Trazzi, S., et al., 2016. HDAC4: a key factor underlying brain developmental alterations in CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet.* 25, 3887-3907.
- Wang, I. T., et al., 2012. Loss of CDKL5 disrupts kinome profile and event-related potentials leading to autistic-like phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 21516-21.

PIANO DI FORMAZIONE SCIENTIFICA

Il progetto prevede un piano di formazione scientifica mirato a fornire gli strumenti di carattere teorico e pratico, necessari per il raggiungimento degli obiettivi del progetto.

Dal punto di vista pratico, nel progetto verranno acquisite le seguenti metodologie sperimentali:

- Tecniche di immunocitochimica
- Mantenimento di colonie di topi transgenici e genotipizzazione con varie metodiche
- Manipolazione di animali e tecniche di iniezione sistemica e intracerebrale
- Perfusioni transcardiaca e prelievo di tessuto cerebrale
- Sezione di tessuto cerebrale tramite microtomo e montaggio delle fettine su vetrino
- Tecniche di colorazione istologica di base (Nissl, Golgi)
- Tecniche di immunistochemica semplice e doppia su fettine montate e fluttuanti
- Acquisizione computerizzata di immagini di preparati istologici al microscopio ottico, a fluorescenza e confocale
- Impiego di vari software per l'analisi stereologica di diverse regioni cerebrali (stima del volume e del numero di neuroni), per la ricostruzione dell'albero dendritico, per la quantificazione delle spine dendritiche e per la quantificazione dei terminali sinaptici (densità ottica e quantificazione di "puncta" sinaptici individuali).
- Estrazione di proteine da campioni di tessuto cerebrale per analisi tramite i western blot.
- Tecniche per studi comportamentali mirati a saggiare funzioni di memoria e apprendimento tramite i seguenti test: Morris Water Maze; Y maze; Passive Avoidance) e performance motorie.
- Impiego di test statistici di base per confronti multipli fra gruppi sperimentali.

Dal punto di vista strettamente teorico il progetto di formazione prevede:

- ◆ Frequenza a seminari tenuti nel Dipartimento presso il quale verrà svolto il piano di formazione. I seminari saranno tenuti sia da docenti del dipartimento sia da studiosi nazionali ed internazionali.
- ◆ Partecipazione a Congressi scientifici nazionali ed internazionali.