

# PROGETTO DI RICERCA

## VALIDAZIONE PRECLINICA DI NUOVI STRUMENTI TERAPEUTICI PER PATOLOGIE DEL NEUROSVILUPPO

### STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO DELLO STUDIO

#### **Il Disordine da Deficit di CDKL5**

Il Disordine da Deficit di CDKL5 (CDD, OMIM 300203, 300672), è una grave e cronicamente debilitante patologia dello sviluppo neurologico causata da mutazioni del gene CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5). Tale gene è localizzato sul braccio corto del cromosoma X (1) e codifica per una serina/treonina chinasi che è altamente espressa a livello cerebrale (2). L'incidenza del CDD è attualmente stimata in 1:42.000 neonati (3) e la maggior parte dei pazienti sono bambine eterozigoti. I bambini affetti da CDD mostrano una sintomatologia che include epilessia farmaco resistente con esordio nei primi mesi di vita, ritardo mentale ed autismo, oltre a ridotte capacità visive, motorie e problemi respiratori e a livello gastrointestinale (4). La maggior parte di questi bambini non può camminare, parlare o nutrirsi autonomamente. **Allo stato attuale non esistono terapie efficaci per migliorare i sintomi della CDD** e gli approcci terapeutici fino ad ora utilizzati per contrastare uno dei sintomi più devastanti di tale patologia, l'epilessia, si sono dimostrati di scarsa efficacia. Di conseguenza, la maggior parte dei pazienti affetti da CDD conduce una vita non autonoma e dipende dalle cure dei parenti e della società. Gli studi effettuati a riguardo indicano che allevare un bambino affetto da una tale disabilità ha un effetto notevole sul benessere di tutta la famiglia (5).

#### ***Modelli murini del Disordine da Deficit di CDKL5***

Negli ultimi anni sono stati creati molteplici modelli murini della CDD - ovvero: topi knockout (KO) per Cdkl5 (6-8) - che ricapitolano molte delle caratteristiche osservate nei pazienti. I topi Cdkl5 KO presentano, in analogia con la patologia umana, comportamenti simil autistici, deficit cognitivi caratterizzati da una grave compromissione dei processi di memoria e apprendimento ippocampo-dipendenti, deficit visivi e respiratori e stereotipie motorie. Lo studio di tali modelli ha permesso perciò di chiarire il ruolo di CDKL5 nello sviluppo neuronale e nelle funzioni cerebrali (9).

### ***Modelli cellulari del Disordine da Deficit di CDKL5***

Recentemente, mediante una metodica di CRISPR/Cas9 (10), è stata creata una linea pseudo neuronale (da neuroblastoma) umana knockout per CDKL5 (SH-CDKL5-KO) che ricapitola i) le alterazioni nelle vie di segnalazione (GSK3 $\beta$ ) e ii) i deficit di sopravvivenza e maturazione neuronale precedentemente descritti nel modello murino di CDD. Inoltre, come descritto in vivo (10, 11), le cellule SH-CDKL5-KO sono più sensibili agli stress ossidativi/eccitotossici. Pertanto questa linea rappresenta un valido modello cellulare di CDD che può essere utilizzato per valutare l'efficacia di una farmacoterapia nel ripristinare il fenotipo dato dall'assenza di CDKL5.

### **Meccanismi patogenetici nelle malattie neurologiche: la glicogeno sintasi chinasi 3**

Studi svolti negli ultimi decenni hanno evidenziato la presenza di meccanismi patogenetici comuni a molte malattie neurologiche, dovuti all'alterazione della funzionalità di proteine essenziali per una corretta funzione cerebrale. Fra queste, la glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3) presenta una grossa attrattiva come target terapeutico per il suo ruolo chiave nella fisiopatologia dei disordini neurologici. Questa chinasi controlla vari aspetti della funzione cellulare attraverso molteplici vie di segnalazione e con oltre 100 substrati ad oggi identificati. Al di là del suo classico ruolo nel metabolismo del glucosio, la GSK3 ha una funzione centrale nei processi alla base dello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) come neurogenesi, plasticità sinaptica, sopravvivenza dei neuroni (12). Alterazioni della funzionalità della GSK3 sono state riscontrate in molti disturbi neurologici (patologie neurodegenerative, psichiatriche e dello spettro autistico (12, 13) e data la sua importanza come target terapeutico, negli ultimi anni sono stati fatti enormi investimenti nella ricerca e nello sviluppo di inibitori capaci di influenzarne l'azione. Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia, in vitro e in vivo, di questi inibitori in vari tipi di patologie neurologiche che spaziano dai disturbi dell'umore e del comportamento, all'autismo, alle patologie neurodegenerative; e per alcuni di questi inibitori sono attualmente in corso trial clinici (13-16).

**Tuttavia, per la maggior parte di questi inibitori restano ancora molti dubbi riguardo la selettività, la tossicità a lungo termine e l'efficacia.**

La ridotta efficacia di questi inibitori può essere dovuta alla complessa eziologia delle patologie del SNC su cui sono stati testati, per tale motivo le nuove strategie terapeutiche sono indirizzate contemporaneamente a bersagli multipli. Per esempio è stato dimostrato che

la somministrazione combinata di inibitori di GSK3 $\beta$  e delle deacetilasi istoniche (HDAC) promuove un incremento del potenziale terapeutico rispetto al singolo trattamento (17). Data la loro importanza nello sviluppo cerebrale le HDAC sono infatti considerate target terapeutici in molte patologie neurologiche fra cui il **disordine da deficit di CDKL5 (CDD)** (18-21). Recentemente il trattamento in vivo, in un modello murino di CDD, con una prima generazione di inibitori duali di GSK3/HDAC, si è dimostrato molto promettente nella reversione di alcuni dei fenotipi neurologici che caratterizzano tali animali (22). Inoltre, poiché l'utilizzo di farmaci inibitori potrebbe causare problematiche inerenti all'accumulo dei target e l'insorgenza di fenomeni di resistenza al farmaco; per ovviare a ciò le più recenti strategie di drug discovery sono indirizzate allo sviluppo di molecole capaci di promuovere la degradazione dei target.

Dato l'urgente bisogno di sviluppare nuove terapie per le complesse patologie del sistema nervoso centrale, l'identificazione di composti innovativi ed efficaci è un passo fondamentale per questo processo.

#### **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

**L'obbiettivo di questo progetto è quello di validare l'efficacia terapeutica di molecole di nuova generazione** recentemente sintetizzati dal Prof. Andrea Milelli (QUVI, UNIBO) in un **modello in vitro del disordine da deficit di CDKL5 (CDD)**. Per i composti che risulteranno più efficaci nel ripristinare il fenotipo patologico in un modello in vitro di questa patologia, prevediamo di effettuare uno studio pilota allo scopo di valutare l'efficienza dei nuovi composti nell'attraversare la barriera ematoencefalica, prerequisito essenziale per studi futuri di efficacia in vivo, nel modello murino della CDD.

#### **PIANO DI ATTIVITÀ**

L'assegnista sarà coinvolto nelle attività di seguito descritte riassunte in figura 1

**TASK: 1.1\_ Validazione dell'efficacia dei composti di nuova sintesi in un modello cellulare del Disordine da Deficit di CDKL5.**

Per verificare l'efficacia dei composti nel promuovere: l'inibizione di GSK3  $\beta$  /HDAC (multitarget) o la degradazione della GSK3 $\beta$  (PROTAC), e cellule SH-CDKL5-KO verranno trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti dei composti in esame (0.1; 10; 25; 50 e 100  $\mu$ M). Come controllo di attività verranno utilizzati gli inibitori di GSK3  $\beta$  e HDAC da cui i singoli composti sono stati derivati. Mediante Western blot verranno analizzati: i) i livelli totali di GSK3  $\beta$  i livelli di fosforilazione della GSK3  $\beta$  e di target a valle della GSK3  $\beta$  (come CRMP2 e Beta catenina) e ii) i livelli di acetilazione della tubulina e dell'istone H3.

Per verificare l'efficacia dei composti nel ripristinare i deficit proliferativi e la capacità di sopravvivenza della linea SH-CDKL5-KO, mediante marcatura con Hoechst, verrà analizzata la percentuale di nuclei mitotici e picnotici dopo un trattamento effettuato con le stesse modalità sopra descritte.

L'effetto dei composti sul ripristino di una corretta maturazione neuronale verrà analizzato mediante esperimenti di differenziamento in cui le cellule verranno trattate per cinque giorni consecutivi, con acido retinoico (10  $\mu$ M) e con i composti in analisi. A fine trattamento verrà valutata la lunghezza media dei neuriti a partire da immagini a contrasto di fase delle colture cellulari.

In fine, per verificare se i composti sono in grado di esercitare un'azione neuroprotettiva sulle cellule SH-CDKL5-KO soggette a stress ossidativo (acqua ossigenata, 100 $\mu$ M), verrà valutata la vitalità cellulare (mediante analisi della percentuale di cellule apoptotiche) e l'induzione di danno al DNA (analisi dei livelli di espressione e del numero di foci nucleari dell'istone  $\gamma$ H2AX, biomarcatore associato al danno al DNA).

### Task 1.1

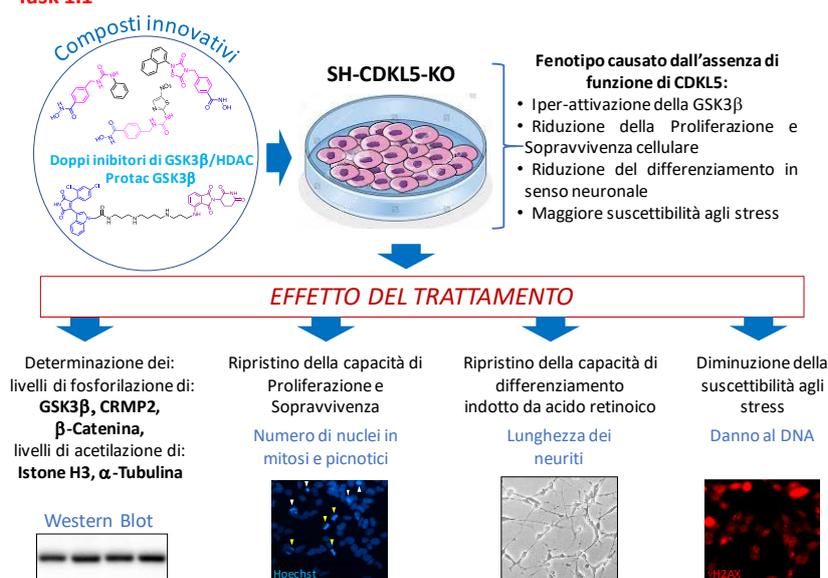
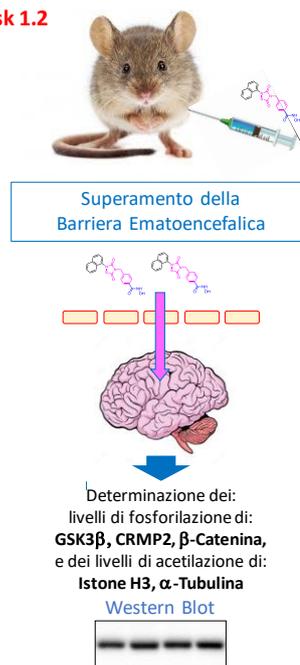


Figura 1: Schema del piano sperimentale

### Task 1.2



## TASK: 1.2\_ Valutazione in vivo dell'efficacia dei composti nell'attraversare la barriera ematoencefalica.

I composti che presenteranno la maggiore efficacia nel ripristino del fenotipo nel modello cellulare di CDD verranno analizzati in uno studio pilota, in vivo, atto a determinare la loro capacità di superare la barriera ematoencefalica. Topi wild-type saranno trattati per via intraperitoneale con differenti dosi di tali composti (10, 50 e 100 mg per Kg di animale; n=3 per gruppo). A 24 ore dalla somministrazione gli animali verranno sacrificati e ne verrà prelevato il cervello. Mediante analisi di Western blot su estratti cerebrali, verranno analizzati i livelli di inibizione o degradazione della GSK3  $\beta$  ed i livelli di acetilazione della tubulina e dell'istone H3, come indice dell'efficacia dei composti nell'attraversare la barriera ematoencefalica.

Queste analisi saranno preliminari per uno studio successivo volto a verificare l'efficacia di questi composti nel ripristino dei deficit neuroanatomici e comportamentali che caratterizzano il modello murino di CDD, il topo *Cdkl5* KO.

## 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:

- Mantenimento di linee cellulari in vitro
- Saggi di vitalità su linee cellulari
- Estrazione di proteine da campioni di cellule o di tessuto cerebrale e quantificazione per analisi tramite western blot.
- Analisi di differenziamento in senso neuronale di linee cellulari
- Analisi di espressione proteica tramite Western Blot
- Tecniche di immunocitochimica
- Acquisizione computerizzata di immagini di preparati citologici al microscopio ottico e a fluorescenza
- 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.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, et al. Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics*. 1998;51(3):427-33.
2. Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, et al. CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem*. 2008;283(44):30101-11.
3. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, McLellan A, O'Regan M, MacLeod S, et al. Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain*. 2019;142(8):2303-18.

4. Olson HE, Demarest ST, Pestana-Knight EM, Swanson LC, Iqbal S, Lal D, et al. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatr Neurol*. 2019;97:18-25.
5. Mori Y, Downs J, Wong K, Anderson B, Epstein A, Leonard H. Impacts of caring for a child with the CDKL5 disorder on parental wellbeing and family quality of life. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):16.
6. Wang IT, Allen M, Goffin D, Zhu X, Fairless AH, Brodtkin ES, et al. Loss of CDKL5 disrupts kinome profile and event-related potentials leading to autistic-like phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(52):21516-21.
7. Amendola E, Zhan Y, Mattucci C, Castroflorio E, Calcagno E, Fuchs C, et al. Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. *PLoS One*. 2014;9(5):e91613.
8. Okuda K, Kobayashi S, Fukaya M, Watanabe A, Murakami T, Hagiwara M, et al. CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility. *Neurobiol Dis*. 2017;106:158-70.
9. Zhou A, Han S, Zhou ZJ. Molecular and genetic insights into an infantile epileptic encephalopathy - CDKL5 disorder. *Front Biol (Beijing)*. 2017;12(1):1-6.
10. Loi M, Trazzi S, Fuchs C, Galvani G, Medici G, Gennaccaro L, et al. Increased DNA Damage and Apoptosis in CDKL5-Deficient Neurons. *Mol Neurobiol*. 2020;57(5):2244-62.
11. Fuchs C, Medici G, Trazzi S, Gennaccaro L, Galvani G, Berteotti C, et al. CDKL5 deficiency predisposes neurons to cell death through the deregulation of SMAD3 signaling. *Brain Pathol*. 2019;29(5):658-74.
12. Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(8):539-51.
13. Rizk M, Saker Z, Harati H, Fares Y, Bahmad HF, Nabha S. Deciphering the roles of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the treatment of autism spectrum disorder and related syndromes. *Mol Biol Rep*. 2021;48(3):2669-86.
14. Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:32.
15. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015;148:114-31.
16. Duda P, Wisniewski J, Wojtowicz T, Wojcicka O, Jaskiewicz M, Drulis-Fajdasz D, et al. Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(10):833-48.

17. Sharma S, Taliyan R. Synergistic effects of GSK-3beta and HDAC inhibitors in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2015;388(3):337-49.
18. Landgrave-Gomez J, Mercado-Gomez O, Guevara-Guzman R. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:58.
19. Shukla S, Tekwani BL. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Front Pharmacol.* 2020;11:537.
20. Citraro R, Leo A, De Caro C, Nesci V, Gallo Cantafio ME, Amodio N, et al. Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on the Development of Epilepsy and Psychiatric Comorbidity in WAG/Rij Rats. *Mol Neurobiol.* 2020;57(1):408-21.
21. Trazzi S, Fuchs C, Viggiano R, De Franceschi M, Valli E, Jedynek P, et al. HDAC4: a key factor underlying brain developmental alterations in CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet.* 2016;25(18):3887-907.
22. Loi M, Gennaccaro L, Fuchs C, Trazzi S, Medici G, Galvani G, et al. Treatment with a GSK-3beta/HDAC Dual Inhibitor Restores Neuronal Survival and Maturation in an In Vitro and In Vivo Model of CDKL5 Deficiency Disorder. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).