

PROGETTO DI RICERCA

ANALISI DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA DELLA PROTEINA TAT-CDKL5 NEL RIPRISTINO DI UN CORRETTO SVILUPPO CEREBRALE E COGNITIVO IN UN MODELLO MURINO DEL DISORDINE DA DEFICIT DI CDKL5

Introduzione

Il disordine da deficit di CDKL5

Mutazioni nel gene CDKL5 sono alla base del disordine da deficit di CDKL5 (CDD), una rara patologia infantile dello sviluppo nervoso caratterizzata da un'epilessia farmaco-resistente ad esordio precoce (prime settimane/mesi di vita), disturbi dello spettro autistico, disabilità intellettiva, deficit visivi e motori, ipotonia, e altre comorbidità quali disturbi gastrointestinali, disturbi del sonno e anomalie respiratorie (Olson et al., 2019). Di conseguenza, la maggior parte dei bambini affetti da tale invalidante patologia conduce una vita non autonoma e dipende dalle cure dei parenti e della società. Benché la patologia sia rara, con l'avvento delle metodiche di diagnosi molecolare, il numero di pazienti diagnosticati sta aumentando rapidamente. Questo anche in virtù di una maggiore conoscenza della patologia che ha ormai assunto un carattere indipendente rispetto alla sindrome di Rett e alla maggiore disponibilità di protocolli diagnostici. Se in precedenza infatti le stime parlavano di alcune centinaia di pazienti nel mondo in pochi anni tale numero ha raggiunto i 10.000 casi ed è purtroppo destinato a crescere. Si parla infatti di un'incidenza di circa 1 su 42.000 nuovi nati (Symonds et al., 2019). Attualmente non esistono trattamenti efficaci che siano in grado di migliorare i sintomi della patologia e di conseguenza la qualità di vita dei pazienti e delle loro famiglie, pertanto lo sviluppo di approcci terapeutici efficaci e potenzialmente utilizzabili nell'uomo risulta di primaria importanza.

Il modello murino del CDD

Negli ultimi anni sono stati creati molteplici modelli murini della CDD - ovvero: topi knockout (KO) per Cdkl5 (Wang et al., 2012; Amendola et al., 2014; Okuda et al., 2017) - 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 (Amendola et al., 2014; Fuchs et al., 2014; Sivilia et al., 2016; Lo Martire et al., 2017; Mazziotti et al. 2017). Lo studio di tali modelli ha permesso perciò di chiarire il ruolo di CDKL5 nello sviluppo neuronale e nelle funzioni cerebrali (Zhou et al., 2017); questi animali presentano infatti gravi difetti neuroanatomici come ad esempio una ridotta arborizzazione dendritica, una ridotta densità di spine dendritiche ed un'alterata connettività sinaptica (Fuchs et al., 2014; Nawaz et al., 2016, Zhu e Xiong, 2019) ed una generalizzata compromissione della sopravvivenza dei neuroni ippocampali (Gennaccaro et al., 2021). Queste evidenze sperimentali suggeriscono che CDKL5 abbia un ruolo chiave nello sviluppo cerebrale e nella corretta funzionalità sinaptica. È stato inoltre dimostrato che i topi Cdkl5 KO presentano una compromissione della coordinazione motoria (Sivilia et al., 2016), un incremento di apnee notturne (Lo Martire et al., 2017) ed alterazioni nella risposta visiva (Mazziotti et al., 2017) a riprova delle analogie tra il fenotipo riscontrato nel modello murino ed i sintomi clinici presenti nella patologia umana.

Lo studio e la caratterizzazione dei modelli murini del CDD hanno inoltre permesso di attuare studi preclinici atti a verificare l'efficacia di potenziali approcci terapeutici nel ripristino dei deficit cognitivi che caratterizzano il modello animale. Lo studio dei meccanismi molecolari alterati nel cervello dei topi Cdkl5 KO ha portato a testare in tali animali gli effetti terapeutici di molteplici sostanze farmacologiche tra cui: inibitori della GSK3 β (Fuchs et al., 2015; Fuchs et al., 2018), Insulin-like Growth Factor 1 (Della sala et al., 2016), inibitori delle istone deacetilasi (Trazzi et al.

2016), agonisti di TrkB (Ren et al. 2019), bloccanti del recettore AMPA (Yennawar et al. 2019), agonisti del recettore della serotonina (Vigli et al. 2019), TGF- β 1 (Fuchs et al., 2019), inibitori del re-uptake della serotonina (Fuchs et al., 2020), doppi inibitori di GSK-3 β /HDAC (Loi et al. 2021), antagonisti del recettore GABA (Gennaccaro et al. 2021), antiinfiammatori (Galvani et al. 2021). Malgrado alcune di queste sostanze abbiano dimostrato una parziale efficacia nel ripristino dello sviluppo e della sopravvivenza neuronale ed in alcuni casi siano riusciti a recuperare in parte i deficit cognitivi, tali approcci terapeutici restano comunque limitati solo ad alcuni aspetti del fenotipo patologico.

Approccio di terapia proteica sostitutiva

Gli approcci terapeutici per malattie causate dalla mutazione in un singolo gene, come nel caso del CDD, possono essere di varia natura, i più radicali si basano sul ripristino dell'attività della proteina assente mediante: l'introduzione nelle cellule di una copia sana del gene (terapia genica) o mediante la somministrazione trans-vascolare di una proteina funzionale prodotta e purificata in laboratorio (terapia proteica sostitutiva). La terapia proteica sostitutiva, basata su di una somministrazione periodica endovenosa di enzimi specifici prodotti con la tecnologia del DNA ricombinante, è attualmente la più appropriata terapia disponibile per diversi tipi di patologie da accumulo lisosomiale nell'uomo quali: la malattia di Gaucher, la Sindrome di Scheie, la Sindrome di Maroteaux-Lamy, la Sindrome di Morquio A e la Sindrome di Sly (Concolino et al. 2018).

L'utilizzo di questo approccio terapeutico per patologie dello sviluppo neurologico o neurodegenerative è stato fino ad oggi ostacolato: i) dalla scarsa permeabilità di tali sostanze all'attraversamento della barriera emato-encefalica, ii) dalla scarsa permeabilità a penetrare nelle singole cellule neuronali, iii) dalla difficoltà delle proteine di essere espresse in vitro e purificate adeguatamente in modo tale da mantenere la loro attività all'interno delle cellule e iv) dalla loro breve emivita. Recentemente è stata creata la proteina di fusione TAT-CDKL5 la quale risulta essere un ottimo candidato per la terapia proteica sostitutiva per la CDD poiché gli studi fino ad ora eseguiti su modelli animali indicano che racchiude in sé tutte le caratteristiche sopraelencate.

Abbiamo infatti dimostrato che somministrata per via sistemica la proteina TAT-CDKL5 è in grado, una volta in circolo, di attraversare la barriera ematoencefalica e di raggiungere e penetrare all'interno dei neuroni in virtù delle proprietà conferitegli dal peptide TAT (HIV-1 trasactivator of transcription).

Obiettivo del progetto di ricerca

L'obiettivo principale di questo progetto di ricerca è quello di determinare l'efficacia della proteina TAT-CDKL5 nel ripristino dei deficit dello sviluppo neurologico e comportamentali che caratterizzano il modello murino della CDD, i topi CDKL5 knockout.

PIANO DI ATTIVITÀ

L'assegnista sarà coinvolto nelle attività di seguito descritte:

Efficienza di trasferimento della proteina TAT-CDKL5 nel cervello e valutazione degli effetti collaterali inseguito alla somministrazione prolungata di due differenti dosi.

Affronteremo il problema del trasferimento della proteina *in vivo* nel cervello e degli effetti collaterali derivanti da dosi crescenti della TAT-CDKL5. Esamineremo gli effetti di un trattamento prolungato con due dosi differenti della proteina TAT-CDKL5 (200 e 2000 ng/topo) della proteina in topi adulti che ci permetteranno di eseguire, una volta determinata la dose ottimale, test comportamentali per verificare gli effetti del trattamento sulle capacità cognitive degli stessi.

Protocollo con dosi ripetute Topi di tre mesi di vita verranno iniettati i.p. per 2 settimane con la proteina TAT-CDKL5 o la TAT-GFP alla dosedi 200 e 2000 ng/topo. Lo stato fisico e il peso degli animali verranno verificati giornalmente. Gli animali verranno sacrificati ventiquattro ore dopo la somministrazione dell'ultima dose. Il cervello verrà prelevato e omogeneizzato per estrarre le proteine. Analizzeremo 50 μ g di lisato proteico tramite Western blotting con l'anticorpo anti-TAT per valutare la quantità di proteina TAT-CDKL5 nel cervello. Per paragonare l'efficienza di trasferimento della proteina nel cervello rispetto ai tessuti periferici, analizzeremo tramite Western blotting anche estratti proteici totali ottenuti da fegato, cuore e rene. In esperimenti indipendenti di immunocitochimica su fettine di cervello esamineremo la distribuzione della TAT-CDKL5 in varie regioni cerebrali e verificheremo la presenza della proteina all'interno delle cellule cerebrali. Per valutare se la somministrazione cronica di TAT-CDKL5 alle dosi utilizzate ha effetti tossici nei topi, faremo un profilo di espressione di geni chiave, appartenenti a differenti vie di segnalazione note per essere attivate in risposta a farmaci tossici. Utilizzeremo il kit per real-time PCR "Mouse Molecular Toxicology PathwayFinder PCR Array" per analizzare l'espressione dei 370 geni del kit in omogenati di fegato e di cervello degli animali trattati e di controllo.

Questi esperimenti ci permetteranno di valutare la penetrazione a livello cerebrale della proteina TAT-CDKL5 iniettata, il suo decadimento nel cervello e se la somministrazione cronica ed i dosaggi utilizzati esercitino effetti tossici.

Effetti del trattamento con la proteina TAT-CDKL5 sullo sviluppo cognitivo e sul comportamento dei topi CDKL5-KO

Una volta stabilito quale sia la dose maggiore fra quelle utilizzate che non dà origine ad effetti tossici attueremo un trattamento cronico con tale dose in topi adulti Cdkl5 KO i quali verranno successivamente sottoposti a studi comportamentali per verificare l'efficacia della proteina nel ripristino delle capacità di memoria e di apprendimento che risultano gravemente alterate nel modello animale del CDD.

I test comportamentali verranno utilizzati per valutare la capacità dei trattamenti proposti nel ripristinare: i comportamenti sociali in gabbia domestica (Nesting behavior, Marble Burying), la coordinazione e l'attività motoria (test Open Field, Rotarod e Hind-limb clasping) e le capacità cognitive (test Morris water maze e Passive Avoidance) degli animali.

Gli animali verranno successivamente sacrificati e determineremo l'effetto della proteina di fusione TAT-CDKL5 sulla maturazione dei neuroni nel cervello di topi Cdkl5-KO. Sezioni cerebrali di topi trattati e di controllo verranno marcate con un anticorpo fluorescente per PSD95, una proteina espressa dai terminali postsinaptici che ci permetterà di valutare un eventuale ripristino della connettività sinaptica che risulta alterata nei topi Cdkl5-KO. Utilizzeremo anche il metodo di Golgi per poter eseguire una ricostruzione morfometrica dell'albero dendritico di granuli maturi e la tempistica di crescita delle spine sia dei granuli sia dei neuroni piramidali ippocampali. Valuteremo la morfometria dell'albero dendritico e la densità delle spine mediante un software specifico.

Risultati attesi

Questo progetto ci permetterà di stabilire se sia possibile migliorare i deficit dello sviluppo cerebrale in un modello di topo del CDD. Poiché l'approccio qui proposto è potenzialmente utilizzabile nell'uomo, il nostro studio potrebbe aprire la strada a futuri trials clinici.

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 intraperitoneale
- Perfusione transcadiaca 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 e performance motorie tramite i seguenti test: Nesting behavior, Marble Burying, Hind-limb clasping, Rotarod, Open field, Morris Water Maze e Passive Avoidance.
- 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. Olson HE, Demarest ST, Pestana-Knight EM, Swanson LC, Iqbal S, Lal D, Leonard H, Cross JH, Devinsky O, Benke TA. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatr Neurol.* 2019 97:18-25.
2. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, McLellan A, O'Regan M et al. Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain.* 2019. 142(8):2303-2318.
3. Wang IT, Allen M, Goffin D, Zhu X, Fairless AH, Brodtkin ES, Siegel SJ, Marsh ED, Blendy JA, Zhou Z. 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.
4. Amendola E, Zhan Y, Mattucci C, Castroflorio E, Calcagno E, Fuchs C, Lonetti G, Silingardi D, Vyssotski AL, Farley D, Ciani E, Pizzorusso T, Giustetto M, Gross CT. Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. *PLOS ONE.* 2014. 9: 1-12

5. Okuda K, Kobayashi S, Fukaya M, Watanabe A, Murakami T, Hagiwara M, Sato T, Ueno H, Ogonuki N, Komano-Inoue S, Manabe H, Yamaguchi M, Ogura A, Asahara H, Sakagami H, Mizuguchi M, Manabe T, Tanaka T. CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility. *Neurobiol Dis.* 2017. 106:158-170.
6. Fuchs C, Trazzi S, Torricella R, Viggiano R, De Franceschi M, Amendola E, Gross C, Calza L, Bartesaghi R, Ciani E. Loss of CDKL5 impairs survival and dendritic growth of newborn neurons by altering AKT/GSK-3 β signaling. *Neurobiology of disease.* 2014.70: 53-68
7. Sivilia S, Mangano C, Beggiato S, Giuliani A, Torricella R, Baldassarro VA, Fernandez M, Lorenzini L, Giardino L, Borelli AC, Ferraro L, Calzà L. CDKL5 knockout leads to altered inhibitory transmission in the cerebellum of adult mice. *Genes Brain Behav.* 2016.15(5):491-502.
8. Lo Martire V, Alvente S, Bastianini S, Berteotti C, Silvani A, Valli A, Viggiano R, Ciani E, Zoccoli G. CDKL5 deficiency entails sleep apneas in mice. *J Sleep Res.* 2017. (4):495-497.
9. Mazziotti R, Lupori L, Sagona G, Gennaro M, Della Sala G, Putignano E, Pizzorusso T. Searching for biomarkers of CDKL5 disorder: early-onset visual impairment in CDKL5 mutant mice. *Hum Mol Genet.* 2017. 26(12):2290-2298.
10. 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.
11. Nawaz MS, Giarda E, Bedogni F, La Montanara P, Ricciardi S, Ciceri D, Alberio T, Landsberger N, Rusconi L, Kilstrup-Nielsen C. CDKL5 and Shootin1 Interact and Concur in Regulating Neuronal Polarization. *PLoS One* 2016.11(2):e0148634.
12. Zhu YC e Xiong ZQ. Molecular and Synaptic Bases of CDKL5 Disorder. *Dev Neurobiol.* 2019. 79(1):8-19.
13. Gennaccaro L, Fuchs C, Loi M, Pizzo R, Alvente S, Berteotti C, Lupori L, Sagona G, Galvani G, Gurgone A, Raspanti A, Medici G, Tassinari M, Trazzi S, Ren E, Rimondini R, Pizzorusso T, Zoccoli G, Giustetto M and Ciani E. Age-Related Cognitive and Motor Decline in a Mouse Model of CDKL5 Deficiency Disorder is Associated with Increased Neuronal Senescence and Death. *Anging and Disease.* 2021. 12:2
14. Fuchs, C, Rimondini, R, Viggiano, R, Trazzi, S, De Franceschi, M, Bartesaghi, R, Ciani, E. Inhibition of GSK3 rescues hippocampal development and learning in a mouse model of CDKL5 disorder. *Neurobiology of disease.* 2015. 82: 298-310.
- 15 Fuchs C, Fustini N, Trazzi S, Gennaccaro L, Rimondini R, Ciani E. Treatment with the GSK3-beta inhibitor Tideglusib improves hippocampal development and memory performance in juvenile, but not adult, Cdkl5 knockout mice". *European journal of neuroscience.* 2018. 47: 1054-1066.
16. Della Sala G, Putignano E, Chelini G, Melani R, Calcagno E, Michele Ratto G, Amendola E, Gross CT, Giustetto M, Pizzorusso T. Accurate discrimination of the wake-sleep states of mice using non-invasive whole-body plethysmography. *Biol Psychiatry.* 2016. 80(4):302-11. 25.
17. Trazzi S, Fuchs C, Viggiano R, De Franceschi M, Valli E, Jedynak P, Hansen FK, Perini G, Rimondini R, Kurz T, Bartesaghi R, Ciani E. HDAC4: a key factor underlying brain developmental alterations in CDKL5 disorder. *Human molecular genetics.* 2016. 25(18): 3887-3907.

18. Ren E, Roncace V, Trazzi S, Fuchs C, Medici G, Gennaccaro L, Loi M, Galvani G, Ye K, Rimondini R, Aicardi G, Ciani E. Functional and structural impairments in the perirhinal cortex of a mouse model of CDKL5 deficiency disorder are rescued by a TrkB agonist. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019. 13: 1-15.
19. Yennawar M, White RS and Jensen FE. AMPA Receptor Dysregulation and Therapeutic Interventions in a Mouse Model of CDKL5 Deficiency Disorder. *The Journal of Neuroscience*. 2019. 39(24):4814 – 4828.
20. Vigli D, Rusconi L, Valenti D, La Montanara P, Cosentino L, Lacivita E, Leopoldo M, Amendola E, Gross C, Landsberger N, Laviola G, Kilstrup-Nielsen C, Vacca RA, De Filippis B. Rescue of prepulse inhibition deficit and brain mitochondrial dysfunction by pharmacological stimulation of the central serotonin receptor 7 in a mouse model of CDKL5 Deficiency Disorder. *Neuropharmacology*. 2019. 144 104-114.
21. Fuchs C, Medici G, Trazzi S, Gennaccaro L, Galvani G, Berteotti C, Ren E, Loi M, Ciani E. CDKL5 deficiency predisposes neurons to cell death through the deregulation of SMAD3 signaling. *brain pathology*. 2019. 29: 658-674.
22. Fuchs C, Gennaccaro L, Ren E, Galvani G, Trazzi S, Medici G, Loi M, Conway E, Devinsky O, Rimondini R, Ciani E. Pharmacotherapy with sertraline rescues brain development and behavior in a mouse model of CDKL5 deficiency disorder. *Neuropharmacology*. 2020. 167: 107746-107764.
23. Loi M, Gennaccaro L, Fuchs C, Trazzi S, Medici G, Galvani G, Mottolese N, Tassinari M, Rimondini R, Milelli A and Ciani E. Treatment with a GSK-3 β /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, 5950.
24. Galvani G, Mottolese N, Gennaccaro L, Loi M, Medici G, Tassinari M, Fuchs C, Ciani E, Trazzi S. Inhibition of Microglia Over-activation Restores Neuronal Survival in a Mouse Model of CDKL5 Deficient Disorder. *Journal of Neuroinflammation*. 2021. 18:155.
25. Concolino D, Deodato F and Parini R. Enzyme replacement therapy: efficacy and limitations. *Italian Journal of Pediatrics*. 2018. 44(Suppl 2):120.