

PROGETTO DI RICERCA

OTTIMIZZAZIONE DI PROTOCOLLI DI TERAPIA GENICA BASATI SU CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE PER IL TRATTAMENTO DEL DISORDINE DA DEFICIT DI CDKL5

Introduzione

Il Disordine da Deficit di CDKL5 (CDD) è un grave disordine del neurosviluppo dovuto a mutazioni del gene CDKL5 (1, 2). Colpisce principalmente le bambine e causa epilessia farmaco-resistente ad esordio precoce, ritardo mentale ed autismo. Ad oggi non esistono terapie efficaci per questa patologia. I modelli murini di CDD, i topi knockout (KO) per *Cdkl5*, ricapitolano molte delle caratteristiche fenotipiche osservate nei pazienti e sono stati ampiamente utilizzati per valutare l'efficacia di approcci terapeutici, tra questi, l'approccio di terapia genica. In particolare, abbiamo recentemente dimostrato che un approccio di terapia genica basato su un meccanismo di correzione incrociata, mediante un costrutto IgK-TATk-CDKL5 veicolato al cervello tramite virus adeno-associati, permette di migliorare alcuni deficit neuroanatomici e comportamentali che caratterizzano il modello murino di CDD (3). Tuttavia, a causa della scarsa efficienza d'infezione del vettore virale, alcune regioni cerebrali come l'ippocampo, la sede dei processi di memoria e apprendimento, non vengono raggiunte in maniera efficiente dalla proteina terapeutica, limitando l'efficacia di questo approccio.

È stato dimostrato che le cellule staminali ematopoietiche (HSC) possono essere utilizzate come efficiente veicolo di molecole terapeutiche al cervello. Tali cellule, infatti, una volta isolate dal midollo osseo, modificate geneticamente ex-vivo e reintrodotte nell'organismo, possono colonizzare stabilmente il cervello generando una progenie con caratteristiche trascrizionali e fenotipiche che ricapitolano le cellule microgliali (ovvero le cellule non neuronali deputate all'immunità innata nel cervello) (4). Questa progenie di cellule, derivate dalle HSC ingegnerizzate trapiantate, sono pertanto in grado di rilasciare localmente le molecole terapeutiche garantendone un'efficace distribuzione ai neuroni e determinando in questo modo un miglioramento della sintomatologia (e in alcuni casi anche la prevenzione delle manifestazioni cliniche) di patologie molto gravi. Un esempio riguarda la leucodistrofia metacromatica per la quale i promettenti studi preclinici (5) hanno supportato un rapido sviluppo clinico (6) portando all'immissione in commercio della prima terapia genica con cellule staminali ematopoietiche per questa patologia (Libmeldy®). Recentemente, è stato dimostrato che questo innovativo approccio di terapia genica basato su cellule staminali ematopoietiche può essere utilizzato con successo, a livello preclinico, anche nel contesto di una grave patologia genetica neurodegenerativa da accumulo lisosomiale, la ceroidlipofusinosi neuronale di tipo 1, caratterizzata da gravi deficit comportamentali, epilessia e morte prematura (7). In particolare, uno dei vantaggi principali dell'utilizzo dell'approccio basato su cellule staminali ematopoietiche è quello di riuscire ad ottenere un ripopolamento microgliale diffuso a tutte le aree del cervello in funzione della via di somministrazione utilizzata per il trapianto (7), consentendo la distribuzione delle molecole terapeutiche anche in distretti cerebrali attualmente difficilmente raggiungibili dai vettori virali utilizzati per la terapia genica in vivo (come ad esempio i vettori adeno-associati).

Alla luce di questi risultati, lo scopo del presente progetto è quello di coniugare i vantaggi derivanti dalla strategia di correzione incrociata per CDKL5 basata sul costrutto IgK-TATk-CDKL5 (3) con i vantaggi derivanti dall'utilizzo delle cellule staminali ematopoietiche (7). In particolare, ci si propone di individuare l'approccio di trapianto ideale per ottenere un ripopolamento microgliale ottimale del cervello in grado di garantire la più ampia e rapida distribuzione della molecola

terapeutica IgK-TATk-CDKL5 ai distretti cerebrali più fortemente intaccati dalla patologia da deficienza di CDKL5, ovvero l'ippocampo e la corteccia. L'efficacia di tale approccio verrà valutata anche nei confronti del ripristino dei deficit neuroanatomici e comportamentali che caratterizzano il modello murino del disordine da deficit di CDKL5.

I risultati di questo studio permetteranno di porre le basi per una futura applicazione clinica di un approccio di terapia genica con cellule staminali ematopoietiche per i pazienti affetti da CDD.

Obiettivi del progetto

Nello specifico, il progetto perseguirà i seguenti obiettivi:

Obiettivo 1: Identificazione della via di somministrazione migliore per veicolare le cellule ematopoietiche ingegnerizzate nei topi Cdk15 KO (Cdk15 $-Y$ o Cdk15 $-/-$), favorendo il migliore attecchimento possibile a livello cerebrale e conseguentemente un ottimale profilo di biodistribuzione della proteina terapeutica.

Obiettivo 2: Validazione dell'efficacia e della sicurezza dell'approccio di terapia genica basata su cellule staminali nel modello murino Cdk15 KO (Cdk15 $-Y$ o Cdk15 $-/-$).

PIANO DI ATTIVITÀ

L'assegnista sarà coinvolto nelle attività di seguito descritte:

1. Identificazione dell'approccio migliore per ottenere un'ampia distribuzione della proteina terapeutica nel cervello di topi Cdk15 KO, dopo il trapianto di HSC ingegnerizzate per esprimere TATk-CDKL5.

Investigheremo come la via di somministrazione delle HSC che esprimono TATk-CDKL5 influenza, nel contesto del deficit di Cdk15, l'entità della ricostituzione della microglia in diverse regioni del cervello nonché l'espressione complessiva e la biodistribuzione della proteina TATk-CDKL5 secreta. In particolare, il confronto riguarderà l'iniezione delle cellule esprimenti TATk-CDKL5 esclusivamente intracerebroventricolare (ICV), esclusivamente endovenoso (e.v.), oppure sia ICV sia e.v. (somministrazione combinata), come eseguito in precedenza nel contesto del modello CLN1 (7).

I topi saranno prodotti incrociando femmine Cdk15 KO $-/-$ con maschi Cdk15 KO $-Y$.

2. Validazione dell'efficacia dell'approccio di terapia genica basata su cellule staminali nel modello murino Cdk15 KO.

I bambini con CDD presentano iperattività, controllo motorio ridotto, disturbi relazionali-autistici e problemi cognitivi e molti di questi difetti sono stati documentati anche nei topi Cdk15 KO (8). Per verificare l'efficacia del ripristino dell'espressione di CDKL5 mediante somministrazione di HSC-TATk-CDKL5 su questi fenotipi, gli animali trapiantati verranno sottoposti a test disegnati per esaminare l'attività e coordinazione locomotoria, i comportamenti sociali e le capacità cognitive ippocampo-dipendenti al time-point di 180 giorni post-trapianto. Dopo l'analisi comportamentale gli animali verranno sottoposti a eutanasia per consentire il prelievo di alcuni organi, ed in particolare degli emisferi cerebrali per analisi istologiche, morfometriche e di western blot volte a valutare l'efficacia della terapia sul ripristino della maturazione cerebrale, sulla reversione del fenotipo neuroinfiammatorio e sul ripristino dell'attività chinasica di Cdk15 nei confronti dei suoi target cellulari. Inoltre, per verificare l'efficacia del ripristino dell'espressione di CDKL5 mediante somministrazione di HSC-TATk-CDKL5 sui fenotipi neuronali e molecolari mostrati dai topi Cdk15 KO (8), successivamente all'eutanasia al time-point 45 e 90, verranno prelevati gli encefali

per analisi di immunoistochimica, di western blot e di elettrofisiologia con il fine di valutare il ripristino dell'attività e della connettività cerebrale.

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 colture di cellule staminali ematopoietiche
- Mantenimento di colonie di topi transgenici e genotipizzazione con varie metodiche
- Manipolazione di animali e tecniche di iniezione ICV e 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 immunoistochimica 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 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. Demarest S, *et al.* (2019) Severity Assessment in CDKL5 Deficiency Disorder. *Pediatr Neurol* 97:38-42.
2. Olson HE, *et al.* (2019) Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatr Neurol* 97:18-25.
3. Medici G, *et al.* (2022) Expression of a Secretable, Cell-Penetrating CDKL5 Protein Enhances the Efficacy of Gene Therapy for CDKL5 Deficiency Disorder. *Neurotherapeutics* 19(6):1886-1904.
4. Poletti V & Biffi A (2019) Gene-Based Approaches to Inherited Neurometabolic Diseases. *Hum Gene Ther* 30(10):1222-1235.
5. Biffi A (2016) Gene therapy for lysosomal storage disorders: a good start. *Hum Mol Genet* 25(R1):R65-75.
6. Biffi A, *et al.* (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341(6148):1233-1238.
7. Peviani M, *et al.* (2023) An innovative hematopoietic stem cell gene therapy approach benefits CLN1 disease in the mouse model. *EMBO Mol Med* 15(4):e15968.
8. Amendola E, *et al.* (2014) Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. *PLoS One* 9(5):e91613.