

# PROGETTO DI RICERCA

## VALIDAZIONE TERAPEUTICA DI UNA PROTEINA RICOMBINANTE TATK-CDKL5, PRODOTTA IN UNA PIATTAFORMA MICROBICA ALTERNATIVA, PER IL TRATTAMENTO DEI PAZIENTI AFFETTI DA DISTURBO DA DEFICIT DI CDKL5

### Introduzione

#### **Il disordine da deficit di CDKL5**

Il disturbo da deficit di CDKL5 (CDD) è una patologia monogenetica molto grave e cronicamente debilitante. Questo disturbo rappresenta una delle cause genetiche più comuni dell'epilessia nella prima infanzia con un'incidenza stimata tra 1 su 40.000 e 1 su 60.000 nuovi nati (1), ciò significa che ogni anno ci sono oltre 100 nuovi bambini nati con la malattia nella sola Unione Europea e diverse migliaia di casi in tutto il mondo anche se le stime sono destinate a subire un incremento con l'evoluzione dei test diagnostici e della loro più frequente applicazione nella popolazione. La maggior parte dei bambini affetti da questo disturbo soffre di convulsioni che, in molti casi, sono incurabili poiché refrattarie ai classici farmaci antiepilettici. Di conseguenza i pazienti sviluppano disturbi dello spettro autistico ed una grave disabilità intellettiva. Oltre a ciò buona parte di loro non può camminare, parlare o nutrirsi autonomamente e molti sono costretti sulla sedia a rotelle. I bambini affetti da CDD soffrono anche di scoliosi, problemi alla vista, problemi sensoriali ed alterazioni della funzionalità gastrointestinale (2). La gravità di queste condizioni ha un profondo impatto sulla qualità della vita dei pazienti e delle loro famiglie oltre ad avere un notevole impatto economico sul sistema sanitario.

**Attualmente, non esistono cure o trattamenti efficaci per questa grave patologia del neurosviluppo.** Per questi motivi la concreta realizzazione di una terapia sicura ed efficace potrebbe avere un grosso impatto sia per il benessere dei pazienti e delle loro famiglie sia per i costi sostenuti dalla sanità pubblica.

#### **Approccio di terapia proteica sostitutiva**

Di grande interesse per i disturbi monogenici, causati dalla mancanza di funzione di una singola proteina, risulta lo sviluppo di **terapie mirate alla reintroduzione nell'organismo della proteina mancante**, denominato approccio di terapia proteica sostitutiva. Questo ambizioso progetto, però, è complicato dall'incapacità delle proteine di penetrare la membrana cellulare, che ne impedisce l'uso come strumento terapeutico per la maggior parte dei disturbi genetici. Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha sviluppato un innovativo approccio di terapia proteica per il disordine CDD (brevetto UNIBO US20150247134 "TATk-CDKL5 fusion proteins, compositions, formulations, and use thereof"). Questo approccio si basa su una proteina ricombinante TATk-CDKL5 che, grazie alla funzione del peptide di trasduzione TATk, è in grado di passare la barriera emato-encefalica e raggiungere le cellule nervose. **Mediante tale approccio diventa possibile il trasporto vascolare di una proteina esogena nell'encefalo, in seguito ad una semplice iniezione sistemica** (3). Tra i vari approcci terapeutici attualmente sperimentati nel modello animale la terapia proteica sostitutiva risulta allo stato attuale il più promettente approccio per lo sviluppo di una terapia efficace per il CDD.

Nonostante il grande potenziale dell'approccio di terapia proteica per CDD, **la purificazione di una proteina ricombinante TATk-CDKL5 in una quantità sufficiente ad uso umano si è rivelato problematico.** In particolare la sua purificazione in diverse piattaforme come batteri, lieviti e cellule di insetti e mammiferi è risultata molto inefficace a causa della bassa solubilità della proteina CDKL5 al di fuori dell'ambiente fisiologico, culminando in costi di produzione insostenibili.

Al fine di concretizzare la traslazionale di questo approccio terapeutico e permettere il passaggio a studi clinici, si è resa necessaria l'identificazione di una piattaforma microbica alternativa per la produzione di una proteina TATk-CDKL5 ricombinante. Recentemente, in collaborazione con la prof.ssa Maria Luisa Tutino (Università Federico II, Napoli), **siamo riusciti ad identificare in un batterio marino non convenzionale, il batterio antartico Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125 (PhTAC125), l'unico sistema al momento efficace nella produzione di una forma solubile e attiva della proteina TATk-CDKL5** (4, 5). Questa importante scoperta, apre una prospettiva di sviluppo per questo approccio terapeutico per la CDD.

### **Obiettivo del progetto di ricerca**

Fino ad ora la limitata disponibilità della proteina ricombinante TATk-hCDKL5 ha rappresentato un collo di bottiglia limitante, in termini di traducibilità clinica, di questo promettente approccio terapeutico. Questo progetto mira a superare finalmente questo problema.

La sorprendente scoperta che il batterio PhTAC125 è l'unica fabbrica di cellule procariotiche in cui la proteina TATk-CDKL5 può essere prodotta, riapre la strada ad una possibilità di commercializzazione della scoperta coperta dal brevetto UNIBO. **Lo studio dell'effetto della proteina TATk-CDKL5 in modelli in vitro ed in vivo della patologia CDD potrà confermare l'efficacia terapeutica della proteina TATk-CDKL5 prodotta in una piattaforma microbica alternativa, il batterio antartico PhTAC125.**

Obiettivi specifici del progetto saranno quelli di:

- ✓ Valutare la capacità di trasduzione e l'efficacia della proteina purificata TATk-CDKL5 nel ripristinare la maturazione neuronale e la connettività in colture primarie ippocampali derivate da topi Cdk15 KO.
- ✓ Valutare l'efficacia terapeutica in vivo della proteina TATk-CDKL5 nel modello murino di CDD, il topo Cdk15 KO.

La Prof.ssa Maria Luisa Tutino (Università Federico II, Napoli) si prenderà carico della produzione e purificazione della proteina TATk-CDKL5 utilizzata in questo studio, a partire da cellule PhTAC125 ricombinanti.

### **PIANO DI ATTIVITÀ**

L'assegnista sarà coinvolto nelle attività di seguito descritte:

#### **1) Verifica della capacità di trasduzione della proteina TATk-hCDKL5 in colture di neuroni ippocampali derivati da topi Cdk15 KO e dell'efficacia di tale proteina nel promuovere il ripristino di una corretta maturazione neuronale.**

L'assenza di espressione di Cdk15 nei neuroni ippocampali derivati dal cervello dei topi Cdk15 KO porta ad alterazioni della maturazione neuronale caratterizzate da una riduzione della lunghezza dei dendriti, del numero di terminali sinaptici e della densità delle spine dendritiche (6). Pertanto, queste colture ippocampali rappresentano un ottimo modello in vitro per validare l'efficacia terapeutica del ripristino della funzione di CDKL5.

#### **Metodica sperimentale**

Per stabilire se la proteina purificata TATk-CDKL5 è in grado entrare all'interno dei neuroni ippocampali, tratteremo neuroni derivanti da topi maschi KO per Cdk15, e differenziati in coltura

per 10 giorni, con veicolo o con diverse concentrazioni della proteina TATk-CDKL5 purificata (10, 50, 100, 500 e 1000 ng). Dopo 2 ore di incubazione, le cellule verranno raccolte e l'efficienza di trasduzione verrà analizzata mediante Western blot. Siccome è stato dimostrato che nei neuroni CDKL5 ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica e presenta un arricchimento in corrispondenza delle spine dendritiche (7), valuteremo la localizzazione cellulare della proteina trasdotta TATk-CDKL5 mediante saggi di immunistochemica su cellule fissate a tempi diversi dopo il trattamento (2h, 6h, 12h o 24h). Questo esperimento sarà utile per ottenere informazioni preliminari riguardanti la localizzazione e la stabilità della proteina in vitro.

Al fine di studiare l'attività della proteina purificata TATk-CDKL5, colture di neuroni ippocampali saranno trattate per 8 giorni con la proteina TATk-CDKL5 o la forma priva di attività chinasica (KD), come controllo negativo. La dose utilizzata per questo studio sarà scelta in base ai risultati ottenuti con gli esperimenti di trasduzione precedentemente descritti. Alla fine del trattamento valuteremo l'efficacia delle proteine purificate sulla maturazione dei dendriti e della connettività sinaptica. La quantificazione della crescita dei neuriti (numero e lunghezza dei rami) e densità delle spine dendritiche sarà eseguita dopo immunistochemica con anticorpi anti-MAP2. Il numero delle terminazioni sinaptiche sarà determinato contando la densità di puncta immunoreattivi per la sinaptofisina (SYN) lungo i dendriti prossimali. Estratti proteici da queste culture saranno impiegati per controllare l'attività chinasica della proteina TATk-CDKL5, attraverso la valutazione dei livelli di fosforilazione sulla serina 222 della proteina EB2, noto target cellulare di CDKL5 (8).

## **2) Valutazione dell'efficacia in vivo della proteina TATk-CDKL5 nella reversione dei deficit di maturazione neuronale e comportamentali che caratterizzano il modello murino di CDD.**

Verranno inizialmente eseguiti studi preliminari in vivo con trattamenti acuti per stabilire la dose ottimale da somministrare agli animali affinché la proteina TATk-CDKL5 raggiunga il cervello e per verificarne la stabilità a livello cerebrale. I risultati di questi esperimenti saranno importanti per definire le condizioni più adatte per un trattamento a lungo termine mirato alla valutazione dell'efficacia in vivo della terapia proteica sostitutiva nel recupero dei difetti anatomici e comportamentali che caratterizzano i topi Cdkl5 KO.

### **Metodica sperimentale**

Dosi differenti della proteina TATk-CDKL5 (500 ng o 2000 ng/animale) saranno somministrate mediante una singola iniezione intraperitoneale in topi adulti Cdkl5 <sup>-/-</sup>Y (3 mesi; n=4). A tempi diversi dall'iniezione (1h, 3h, 6h, 12h e 24h) i topi saranno sacrificati, i cervelli saranno rapidamente rimossi e tagliati lungo la linea mediana. Verranno inoltre prelevati campioni di sangue. Uno degli emisferi cerebrali verrà utilizzato per quantificare i livelli cerebrali della proteina TATk-CDKL5 mediante Western blot. I livelli della proteina TATk-CDKL5 presenti a livello cerebrale saranno confrontati a quelli della proteina endogena Cdkl5 presente nei topi wild-type. L'altro emisfero sarà fissato in PFA e utilizzato per determinare la biodistribuzione della proteina iniettata in diverse regioni del cervello mediante immunistochemica. L'attività chinasica in vivo della proteina TATk-hCDKL5 sarà valutata mediante analisi di western blot in base ai livelli di fosforilazione della proteina target EB2.

Per verificare l'efficacia e gli effetti terapeutici della proteina TATk-CDKL5 in vivo, topi Cdkl5 <sup>-/-</sup>Y adulti di 3 mesi saranno iniettati ogni giorno per 20 giorni con una dose ottimale (stabilita in base agli esperimenti sopra descritti) di TATk-CDKL5 (n=10) o con la forma KD (n=10) come controllo negativo. Come ulteriori controlli tratteremo un gruppo di topi Cdkl5 KO ed uno di topi Cdkl5 wild-type con veicolo. Gli animali saranno sottoposti a test comportamentali a partire dal 13° giorno di trattamento fino al 20° giorno per poi essere sacrificati per analisi istologiche. In particolare, gli animali trattati saranno sottoposti a test volti a esaminare il comportamento sociale, l'apprendimento e la memoria ippocampo dipendenti, l'attività/coordinazione locomotoria e lo stato

di ansia (test: Nesting, Marble Burying, Hind-limb clasping, Rotarod, Open field, Morris Water Maze e Passive avoidance).

L'efficacia del trattamento sulla maturazione neuronale verrà valutata in base ad analisi morfologiche condotte sulle sezioni cerebrali. Verrà eseguita una ricostruzione morfometrica del pattern dendritico dei neuroni piramidali maturi dell'ippocampo e della corteccia a partire da sezioni cerebrali colorate con il metodo di Golgi. Valuteremo la lunghezza dendritica totale, il numero totale di rami dendritici, e la lunghezza media e il numero di rami dei singoli ordini dendritici, utilizzando un software dedicato. Poiché CDKL5 è necessario per la corretta morfogenesi delle spine dendritiche, nei cervelli colorati con il metodo di Golgi esamineremo l'effetto dei trattamenti sulla densità delle spine e sul loro grado di maturazione nelle stesse popolazioni di neuroni utilizzate per analizzare il pattern dendritico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Symonds JD, *et al.* (2019) Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain* 142(8):2303-2318.
2. Olson HE, *et al.* (2019) Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatr Neurol* 97:18-25.
3. Trazzi S, *et al.* (2018) CDKL5 protein substitution therapy rescues neurological phenotypes of a mouse model of CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet* 27(9):1572-1592.
4. Colarusso A, Lauro C, Calvanese M, Parrilli E, & Tutino ML (2022) Active human full-length CDKL5 produced in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Microb Cell Fact* 21(1):211.
5. Calvanese M, Colarusso A, Lauro C, Parrilli E, & Tutino ML (2022) Soluble Recombinant Protein Production in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: The Case Study of the Full-Length Human CDKL5 Protein. *Methods Mol Biol* 2406:219-232.
6. Trazzi S, *et al.* (2016) HDAC4: a key factor underlying brain developmental alterations in CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet* 25(18):3887-3907.
7. Ricciardi S, *et al.* (2012) CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nat Cell Biol* 14(9):911-923.
8. Baltussen L, *et al.* (2018) Chemical genetic identification of CDKL5 substrates reveals its role in neuronal microtubule dynamics. *EMBO J.* 37(24):e99763.

## **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 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 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.