



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

Modulo richiesta incarico di ricerca ai sensi dell'art. 22 ter legge 240/2010

TUTOR

Elisabetta Ciani

TITOLO DEL PROGETTO DI RICERCA

LACTOCOCCUS LACTIS COME SISTEMA DI DELIVERY PER TERAPIA PROTEICA NEL DISORDINE DA DEFICIT DI CDKL5

DESCRIZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA

Il Disordine da deficit di CDKL5 (CDKL5 Deficiency Disorder, CDD) è una rara patologia genetica che colpisce lo sviluppo neurologico legata al cromosoma X, causata da mutazioni nel gene CDKL5, che determinano un deficit della proteina omonima. La malattia si manifesta nel periodo neonatale con epilessia farmaco-resistente, grave disabilità intellettiva, alterazioni motorie e disturbi gastrointestinali, con un impatto estremamente significativo sulla qualità di vita dei pazienti e delle loro famiglie. Nonostante i progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari della malattia, ad oggi non esistono terapie efficaci in grado di correggere i deficit neurologici e comportamentali causati dall'assenza della funzione di CDKL5.

Un approccio promettente per il trattamento delle malattie monogeniche è rappresentato dalla terapia proteica sostitutiva, basata sulla somministrazione della proteina mancante. Tuttavia, nel caso della proteina CDKL5, questa strategia presenta importanti limitazioni legate alla difficoltà di produzione della proteina in vitro, alla sua scarsa stabilità, agli elevati costi di produzione e purificazione, oltre alla necessità di effettuare somministrazioni ripetute, spesso di natura invasiva della proteina purificata. Per superare questi ostacoli, il presente progetto propone una strategia innovativa basata sull'utilizzo di batteri probiotici ingegnerizzati come sistemi di rilascio in vivo della proteina terapeutica.

In particolare, il progetto si basa sull'impiego di *Lactococcus lactis*, un batterio sicuro e ampiamente utilizzato nell'industria alimentare, come "fabbrica biologica" per la produzione e secrezione della proteina TATk-CDKL5 direttamente nel tratto gastrointestinale. Grazie alla presenza del dominio TAT, la proteina secreta è in grado di attraversare le membrane cellulari, entrare nel circolo sistemico e raggiungere diversi organi, incluso il cervello, superando la barriera emato-encefalica. Dati preliminari dimostrano infatti che proteine di fusione TAT prodotte da *L. lactis* possono essere assorbite dall'intestino ed essere distribuite a tessuti periferici e centrali, supportando la fattibilità di questo approccio (Medici et al., 2025 DOI: 10.1186/s13036-025-00538-4).

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia
Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

L'obiettivo generale del progetto è quindi sviluppare e validare una nuova piattaforma terapeutica per la CDD basata sulla produzione in vivo della proteina CDKL5. A tal fine, il progetto si articolerà in tre obiettivi specifici: (i) ottimizzare l'espressione e la secrezione della proteina TATk-CDKL5 in *Lactococcus lactis*; (ii) valutare la biodistribuzione della proteina nei diversi tessuti a seguito di una somministrazione orale dei batteri ingegnerizzati per l'espressione di CDKL5 nel modello murino *Cdkl5* knockout; (iii) analizzare l'efficacia terapeutica del trattamento, con particolare attenzione alla funzione gastrointestinale, allo sviluppo cerebrale ed al comportamento.

Dal punto di vista metodologico, verranno utilizzate tecniche di ingegneria genetica per migliorare la produzione della proteina, seguite da studi in vivo per valutarne la distribuzione e gli effetti funzionali. L'efficacia del trattamento sarà analizzata attraverso test comportamentali, studi morfologici cerebrali e valutazioni della motilità intestinale.

Questo progetto presenta un elevato grado di innovazione, in quanto propone un approccio non invasivo basato su microrganismi vivi in grado di produrre direttamente il farmaco all'interno dell'organismo. Tale strategia potrebbe ridurre significativamente i costi di produzione e migliorare l'efficacia terapeutica, rappresentando un'alternativa concreta alle terapie convenzionali.

Se validato, questo approccio non solo potrà aprire nuove prospettive per il trattamento della CDD, ma potrà essere esteso ad altre malattie genetiche rare, contribuendo allo sviluppo di terapie più efficaci, sostenibili e accessibili.

DESCRIZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA (eventuale) in inglese

CDKL5 Deficiency Disorder (CDD) is a rare X-linked neurodevelopmental disorder caused by mutations in the *CDKL5* gene, leading to a deficiency of the corresponding protein. The disease manifests during the neonatal period with drug-resistant epilepsy, severe intellectual disability, motor impairments, and gastrointestinal dysfunction, exerting a profound impact on the quality of life of both patients and their families. Despite advances in understanding the molecular mechanisms underlying the disease, there are currently no effective therapies capable of correcting the neurological and behavioral deficits associated with the loss of *CDKL5* function.

A promising strategy for the treatment of monogenic disorders is protein replacement therapy, based on the administration of the missing protein. However, in the case of *CDKL5*, this approach faces several major limitations, including the difficulty of producing the protein in vitro, its poor stability, the high costs associated with production and purification, and the need for repeated, often invasive, administrations of the purified protein. To overcome these challenges, the present project proposes an innovative strategy based on the use of engineered probiotic bacteria as in vivo delivery systems for the therapeutic protein.

Specifically, the project relies on the use of *Lactococcus lactis*, a safe bacterium widely employed in the food industry, as a "biological factory" for the production and secretion of the TATk-*CDKL5* protein directly within the gastrointestinal tract. Thanks to the presence of the TAT domain, the secreted protein is able to cross cellular membranes, enter systemic circulation, and reach multiple organs, including the brain, by crossing the blood-brain barrier. Preliminary data demonstrate that

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

TAT fusion proteins produced by *L. lactis* can be absorbed through the intestine and distributed to both peripheral and central tissues, supporting the feasibility of this approach (Medici et al., 2025 DOI: 10.1186/s13036-025-00538-4).

The overall objective of the project is therefore to develop and validate a novel therapeutic platform for CDD based on the *in vivo* production of the CDKL5 protein. To achieve this goal, the project will be organized into three specific aims: (i) to optimize the expression and secretion of the TATk-CDKL5 protein in *Lactococcus lactis*; (ii) to evaluate the biodistribution of the protein in different tissues following oral administration of engineered CDKL5-expressing bacteria in the *Cdk15* knockout mouse model; and (iii) to assess the therapeutic efficacy of the treatment, with particular attention to gastrointestinal function, brain development, and behavior.

From a methodological perspective, genetic engineering approaches will be employed to improve protein production, followed by *in vivo* studies aimed at evaluating protein distribution and functional effects. Treatment efficacy will be assessed through behavioral testing, brain morphological analyses, and evaluations of intestinal motility.

This project is highly innovative, as it proposes a non-invasive approach based on live microorganisms capable of producing the therapeutic agent directly within the body. Such a strategy could significantly reduce production costs while improving therapeutic efficacy, representing a concrete alternative to conventional therapeutic approaches.

If validated, this approach could not only open new perspectives for the treatment of CDD, but also be extended to other rare genetic disorders, thereby contributing to the development of more effective, sustainable, and accessible therapies.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



PIANO DELLE ATTIVITÀ DEL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA

L'attività di ricerca prevista per il primo anno sarà focalizzata sull'ottimizzazione della proteina terapeutica CDKL5 e sulla validazione preliminare del sistema di espressione e delivery basato su batteri lattici ingegnerizzati.

Obiettivo generale del primo anno

Sviluppare una versione ottimizzata della proteina TATk-CDKL5 compatibile con l'espressione e la secrezione in *Lactococcus lactis* e validarne la produzione e la funzionalità in vitro.

Attività previste

1. Ottimizzazione della proteina CDKL5

- Progettazione di varianti della proteina CDKL5, incluse forme troncate e versioni stabilizzate
- Ottimizzazione della sequenza nucleotidica per l'espressione in sistemi batterici (codon optimization)
- Analisi delle regioni disordinate e identificazione di domini funzionali essenziali
- Generazione di costrutti di espressione per diverse varianti di TATk-CDKL5

2. Ottimizzazione del sistema di espressione in *Lactococcus lactis*

- Clonaggio dei costrutti in vettori di espressione costitutiva
- Confronto di diversi segnali di secrezione (Usp45 e alternative)
- Trasformazione in ceppi di *L. lactis*, inclusi mutanti proteasi-deficienti (es. HtrA-)
- Valutazione dell'espressione proteica mediante Western blot e analisi biochimiche
- Analisi dei livelli di secrezione nel mezzo di coltura

3. Valutazione funzionale in vitro

- Test di internalizzazione della proteina TATk-CDKL5 in cellule eucariotiche
- Analisi dell'attività chinasi della proteina (es. fosforilazione di target come EB2)
- Studio della stabilità della proteina secreta

4. Analisi preliminare per espansione della piattaforma

- Avvio di un'analisi bioinformatica per identificare proteine terapeutiche compatibili con il sistema
- Valutazione preliminare di APOB come target alternativo
- Definizione di criteri di selezione (dimensione, stabilità, secrezione, complessità strutturale)

Risultati attesi entro il primo anno

- Identificazione di una o più varianti ottimizzate di TATk-CDKL5
- Dimostrazione di espressione e secrezione efficiente in *Lactococcus lactis*
- Evidenza della attività biologica della proteina in vitro



- Definizione di una strategia per la selezione di nuovi target proteici con elevata probabilità di espressione in *L. lactis*

Prospettive

I risultati ottenuti costituiranno la base per la successiva fase di validazione in vivo, che includerà studi di biodistribuzione ed efficacia terapeutica nel modello murino.

PIANO DELLE ATTIVITÀ DEL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA (eventuale) in inglese

The research activities planned for the first year will focus on the optimization of the therapeutic CDKL5 protein and on the preliminary validation of the engineered lactic acid bacteria-based expression and delivery system.

Overall objective of the first year

To develop an optimized version of the TATk-CDKL5 protein compatible with expression and secretion in *Lactococcus lactis* and to validate its production and functionality in vitro.

Planned activities

1. Optimization of the CDKL5 protein

- Design of CDKL5 protein variants, including truncated forms and stabilized versions
- Optimization of the nucleotide sequence for expression in bacterial systems (codon optimization)
- Analysis of intrinsically disordered regions and identification of essential functional domains
- Generation of expression constructs for different TATk-CDKL5 variants

2. Optimization of the expression system in *Lactococcus lactis*

- Cloning of the constructs into constitutive expression vectors
- Comparison of different secretion signals (Usp45 and alternative signals)
- Transformation into *L. lactis* strains, including protease-deficient mutants (e.g., HtrA-)
- Evaluation of protein expression by Western blot and biochemical analyses
- Analysis of secretion levels in the culture medium

3. In vitro functional evaluation

- Assessment of TATk-CDKL5 protein internalization in eukaryotic cells
- Analysis of protein kinase activity (e.g., phosphorylation of targets such as EB2)
- Evaluation of the stability of the secreted protein

4. Preliminary analysis for platform expansion

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

- Initiation of a bioinformatic analysis to identify therapeutic proteins compatible with the system
- Preliminary evaluation of APOB as an alternative target
- Definition of selection criteria (size, stability, secretion efficiency, structural complexity)

Expected results by the end of the first year

- Identification of one or more optimized TATk-CDKL5 variants
- Demonstration of efficient expression and secretion in *Lactococcus lactis*
- Evidence of the biological activity of the protein in vitro
- Definition of a strategy for selecting new protein targets with a high probability of successful expression in *L. lactis*

Future perspectives

The results obtained will provide the basis for the subsequent in vivo validation phase, which will include biodistribution studies and therapeutic efficacy assessments in the mouse model.

SEDE PREVALENTE ATTIVITÀ DI RICERCA

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie sede di Piazza di Porta San Donato 2 40126
Bologna

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE BIOMEDICHE
E NEUROMOTORIE

Commissione proposta 3 Commissari + 1 Supplente	<i>Elisabetta Ciani</i>
	<i>Stefania Trazzi</i>
	<i>Giorgio Medici</i>
	<i>Sandra Guidi</i>

Scheda attività assistenziale (se prevista)

ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DEL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA/N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali) – DESCRIZIONE ATTIVITÀ
AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI IL TITOLARE DI INCARICO DI RICERCA SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ

È richiesto l'impegno formale preventivo del responsabile della struttura sanitaria a far svolgere l'attività assistenziale al titolare dell'incarico.

SETTORE PERSONALE

UFFICIO PERSONALE NON STRUTTURATO

c/o Policlinico di Sant'Orsola, via Massarenti 9 – Pad. 11 | 40138 Bologna | Italia

Responsabile del procedimento: Luisa Romagnoli | sam.nonstrutturati@unibo.it