

Progetti innovativi per le malattie rare

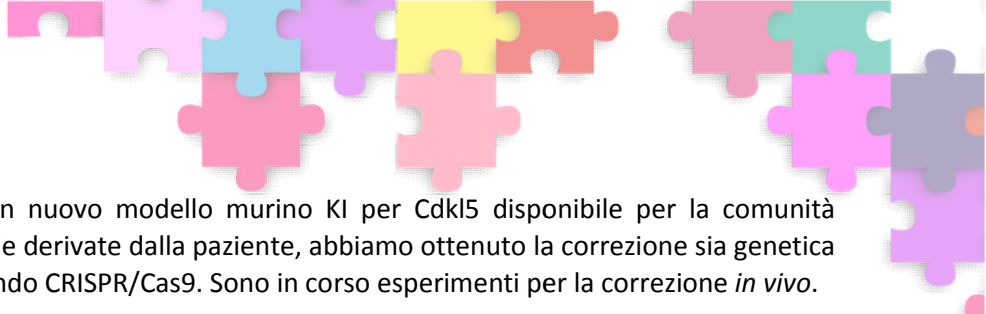
Un nuovo modello murino per la deficienza di CDKL5: un passo verso la terapia personalizzata mediante Gene Editing.

Giada Beligni¹, Miriam Lucia Carriero¹, Vito Antonio Baldassarro², Luca Lorenzini², Antonia Gurgone³, Katia Capitani^{1,4}, Flavia Di Re^{1,4}, Angel Raya⁶, Maria Antonietta Mencarelli⁷, Silvo Conticello^{4,5}, Neil Humphreys⁸, Cornelius Gross⁹, Maurizio Giustetto³, Laura Calza^{2,10}, Alessandra Renieri^{1,7,11}, Ilaria Meloni^{1,11}.

1. Medical Genetics, University of Siena, Italy.
2. Department of Veterinary Medical Science, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia, Italy.
3. Department of Neuroscience "Rita Levi Montalcini", Turin.
4. Core Research Laboratory - ISPRO, Florence, Italy.
5. Institute of Clinical Physiology, National Research Council, 56124 Pisa, Italy.
6. Regenerative Medicine Program, Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL) and Program for Clinical Translation of Regenerative Medicine in Catalonia (P-CMRC), 08908 L'Hospitalet del Llobregat, 08098 Barcelona, Spain; Center for Networked Biomedical Research on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain; and Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), 08010 Barcelona, Spain Institut.
7. Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Italy.
8. Gene Editing & Embryology Facility European Molecular Biology Laboratory, EMBL Rome.
9. Epigenetics & Neurobiology Unit European Molecular Biology Laboratory, EMBL Rome.
10. CIRI-SDV and Fabit University of Bologna Fondazione IRET - Tecnopolo di Bologna - Ozzano Emilia (Bologna).
11. Med Biotech Hub and Competence Center, Department of Medical Biotechnologies, University of Siena, Italy.

Abstract

Mutazioni nel gene *CDKL5* sono alla base di un grave disordine del neurosviluppo (CDD, OMIM#300203) che colpisce prevalentemente le femmine e per il quale al momento non sono disponibili terapie. I modelli murini che presentano specifiche mutazioni identificate nei pazienti (topi KI) sono fondamentali per lo studio e lo sviluppo di terapie innovative per CDD così come per altri disordini del neurosviluppo. L'approccio di gene editing per mezzo del sistema CRISPR/Cas9 consente di modificare il DNA inserendo o correggendo una specifica mutazione. In questo contesto il nostro scopo è quello di generare un nuovo modello murino KI per *CDKL5* e dimostrare che è possibile utilizzare il gene editing per correggere la specifica mutazione. Usando il sistema CRISPR/cas9 è stato generato un modello murino knock-in che presenta una regione umanizzata di 40 bp che circonda la mutazione di nostro interesse identificata in una paziente: c.1090G>T (p.Glu364*). La caratterizzazione del modello ha dimostrato anomalie motorie e comportamentali compatibili con CDD. Il profilo del trascrittoma cerebrale ha inoltre rivelato una ridotta espressione di *GABRA5*, suggerendo una compromissione dei circuiti del GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio nel cervello dei mammiferi, in linea con la ridotta espressione di *GAD1* identificata nei neuroni derivati dalla paziente. In parallelo, abbiamo messo a punto il sistema di correzione tramite gene editing utilizzando l'approccio già descritto (1, 2). Abbiamo inoltre generato iPSCs (cellule staminali pluripotenti indotte) partendo da fibroblasti della paziente e ottenuto una linea cellulare isogena. Abbiamo ottenuto la correzione della mutazione sia nei fibroblasti che nelle iPSCs derivanti dalla paziente. I neuroni ottenuti dalle iPSC mutate hanno confermato l'assenza della proteina *CDKL5* che viene ripristinata dopo la correzione mediante il sistema CRISPR/Cas9. A ulteriore conferma del ripristino della condizione WT si osserva inoltre una normalizzazione nell'espressione di *GAD1*, l'enzima chiave della biosintesi del GABA, che risulta ridotta nei neuroni mutati.



In conclusione, abbiamo generato un nuovo modello murino KI per Cdkl5 disponibile per la comunità scientifica. Lavorando *in vitro* su cellule derivate dalla paziente, abbiamo ottenuto la correzione sia genetica che biologica della mutazione utilizzando CRISPR/Cas9. Sono in corso esperimenti per la correzione *in vivo*.

Referenze:

1-Croci S et al., High Rate of HDR in gene editing of p.(Thr158Met) MECP2 mutational hotspot Eur J Hum Genet 2020.

2-Croci S et al., AAV-mediated FOXP1 gene editing in human Rett primary cells. Eur J Hum Genet 2020.

Finanziamenti: Il progetto è stato finanziato in parte da un contributo da parte di “CDKL5–associazione di volontariato onlus.