

CANDIDATO RESPONSABILE DEL PROGETTO: Dott.ssa Maria Stella Vari

AFFILIAZIONE: Dipartimento di Neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili (DINOEMI), Università degli Studi di Genova, Genova, Italia

CENTRO OSPITANTE: UO Neurologia pediatrica e Malattie muscolari

GARANTE SCIENTIFICO: Prof. Pasquale Striano (Responsabile della Commissione Genetica)

CENTRI PARTECIPANTI:

- UO Neurologia pediatrica e Malattie muscolari, Università degli Studi di Genova, Istituto "G. Gaslini", Genova, Italia
- Laboratorio di Neurogenetica e Neuroscienze, Istituto "G. Gaslini", Genova, Italia
- Dipartimento di Medicina Sperimentale (DiMeS), Università degli Studi di Genova, Genova, Italia
- Neuroscience Campus Amsterdam, Vrije Universiteit (VU), Amsterdam, The Netherlands
- In collaboration with: LICE collaborative group on STXBP1
-

TITOLO DEL PROGETTO

UN'INNOVATIVA STRATEGIA MOLECOLARE PER IL TRATTAMENTO
DELL'ENCEFALOPATIA EPILETTICA DA MUTAZIONI IN *STXBP1*

RENDICONTAZIONE SCIENTIFICA DEI PRIMI 6 MESI DI PROGETTO

BANDO DI RICERCA ANNO 2019 - FONDAZIONE LICE ONLUS

Scopo del progetto di ricerca è di esplorare il potenziale terapeutico dei SINEUPs nell'encefalopatia da mutazioni in *STXBP1*. L'applicazione della tecnologia a RNA alle encefalopatie epilettiche mira ad aumentare l'attività dell'allele wild-type (WT) residuo e superare così la perdita di funzione dell'allele mutato. Lo scopo finale del progetto è di recuperare in vitro la quantità fisiologica della proteina target *stxbp1* nelle cellule neurali derivate da pazienti con encefalopatia da *STXBP1*, utilizzando i SINEUPs.

Nei primi 6 mesi del progetto abbiamo sviluppato i seguenti obiettivi specifici ed ottenuto i seguenti dati preliminari:

i) Selezione di pazienti per lo sviluppo di linee iPSCs mutazione-specifiche dai fibroblasti.

Abbiamo ampliato la casistica italiana dei pazienti portatori di mutazioni in *STXBP1* includendo 34 soggetti, in collaborazione con diversi Centri italiani. Abbiamo ricavato i fibroblasti di tre soggetti con mutazioni che portano a perdita di funzione .

ii) Disegno di SINEUPs che legano in modo specifico l'mRNA STXBP1.

Dopo un'analisi bioinformatica del promotore *STXBP1* (ZenbuGenome Browser) abbiamo disegnato tre SINEUPs con BDs diversi diretti contro lo stesso mRNA *target* e li abbiamo clonati in vettori di espressione contenenti i seguenti BDs: -40/+32, -40/+4, -14/+4 antisense all'mRNA *STXBP1* (dove +1 è la A del sito di inizio traduzione ATG). Come vettori per controllo negativo abbiamo utilizzato il SINEUP senza BD (SINEUP- Δ BD) oppure con un BD *mismatched* (SINEUP-Scramble).

iii) Valutazione dell'attività dei SINEUPs sulla traduzione di STXBP nella linee cellulare umana SK-N- BE (2)

Per prima cosa abbiamo identificato linee cellulari umane con una significativa espressione del gene target *Stxbp1* valutando l'espressione proteica di *STXBP1* con Western blot in varie linee disponibili nel nostro Laboratorio. Abbiamo individuato la più alta espressione di *STXBP1* nelle linee di neuroblastoma umano SK-N-BE(2) e SH-SY5Y (Fig. 1).

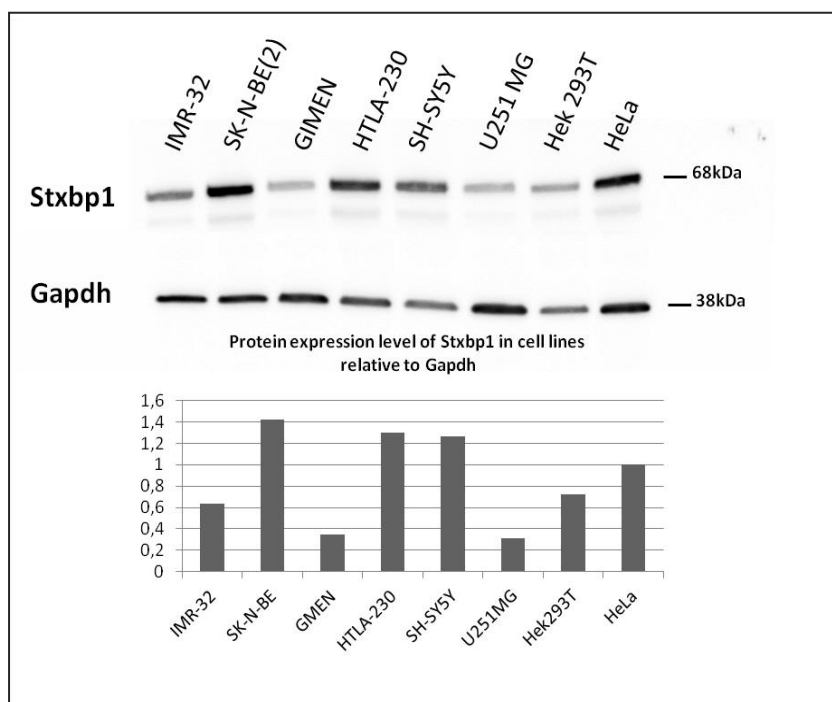
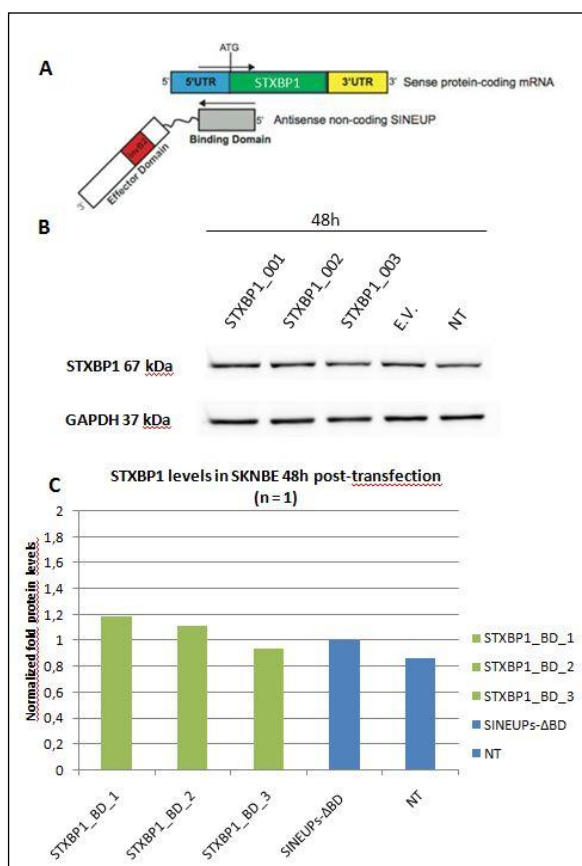


Fig 1. Analisi dell'espressione della proteina STXBP1 in varie linee cellulari umane con Western Blotting GAPDH è utilizzata come controllo di caricamento. La linea cellulare SK-N-BE(2) è risultata mostrare la maggior espressione di STXBP1. In basso è riportata l'analisi densitometrica del western blot. I livelli di espressione relativi sono stati calcolati sulle immagini Western blot (UVitec, Cambridge, UK) normalizzando sulla Gapdh.

Abbiamo quindi verificato l'efficacia di trasfezione e l'attività del SINEUPs per la proteina GFP nelle cellule SK-N-BE(2): analogamente alle cellule SH-SY-5Y (come già riportato nei dati preliminari del progetto) le cellule trasfettate con SINEUP-GFP mostrano un aumento di 4 volte della GFP rispetto alle cellule trasfettate con il solo vettore GFP (Dato non mostrato).

I tre STXBP1-SINEUPs sono stati testati in un esperimento pilota nelle cellule SK-N-BE(2) mediante trasfezione con SINEUPs specifici o i controlli negativi (SINEUPs- Δ BD and SINEUP-Scramble) (Fig. 3). Dopo 48h dalla trasfezione, la proteina target è stata valutata attraverso Western blot e quantificata con UVitec software. In questo primo esperimento, i livelli di STXBP1 a 48 ore dopo la trasfezione risultano aumentati (con un incremento di 1.2 volte per STXBP1-SINEUP_001, che lega il mRNA a -40/+32 dall'ATG). Testeremo i livelli proteici dopo trattamento con STXBP1-SINEUPs a vari tempi post-trasfezione (24, 48 e 72 ore), con cellule subconfluenti al momento della lisi.



Inoltre, proveremo questi composti in un'altra linea cellulare con un'espressione endogena inferiore della proteina target rispetto alla linea SK-N-BE(2), in modo da evitare l'effetto di saturazione e poter apprezzare potenzialmente un aumento più evidente dei livelli della proteina target. Dopo analisi con Western blot di varie linee cellulari, abbiamo identificato e selezionato per questo scopo la linea cellulare HEK293T (Fig.1). Ripeteremo gli esperimenti di trasfezione nelle linee SK-N-BE(2) e HEK293T secondo questo protocollo per almeno tre volte, e per ciascun esperimento indipendente sia Western blot che qPCR saranno effettuati in duplicato, al fine di confermare i risultati preliminari e identificare il costrutto più performante. Quest'ultimo verrà utilizzato per sviluppare il vettore lentivirale per l'infezione di neuroni ottenuti da cellule IPSC derivate

dai pazienti portatori di mutazioni.

Fig. 3 Attività dei STXBP1-SINEUP nella linea cellulare SK-N-BE(2) (n=1). **A.** Rappresentazione schematica della struttura modulare del STXBP1-SINEUP. Il dominio di legame (Binding Domain, BD) (grigio) determina la specificità per l'mRNA STXBP1 target (verde) con legame antisenso. L'Effector Domain (EF) (bianco) contiene l'elemento SINEB2 invertito (invB2, rosso) che permette l'attivazione della sintesi proteica. **B.** Le cellule SK-N-BE(2) sono state trasfettate con il plasmide esprimente tre STXBP1-SINEUP con BD di lunghezza diversa, oppure con un vettore vuoto (SINEUPs- Δ BD). Un gruppo di cellule è stato trattato solo con Lipofectamine2000 (NT). Dopo 48h post-trasfezione, le proteine totali sono state estratte ed è stata testata l'espressione di STXBP1. La Gapdh è stata utilizzata come controllo di caricamento. **C.** Analisi densitometrica del western blot. I livelli di espressione relativi sono stati calcolati sulle immagini Western blot (UVitec, Cambridge, UK) normalizzando sulla Gapdh e relativo ai campioni SINEUPs- Δ BD. I campioni trattati con SINEUP mostrano una espressione tendenzialmente aumentata (1.2 volte) nell'esperimento di trasfezione pilota dopo 48 ore.