



**CANDIDATO A RESPONSABILE DEL PROGETTO:** DOTT.SSA ANTONELLA RIVA

**TIPOLOGIA RICERCA:** RICERCA DI BASE

**AFFILIAZIONE:** DINOGLMI (Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili), Università degli Studi di Genova, Istituto "G. Gaslini", Genova

**Ente ospitante capofila:** Istituto "G. Gaslini", Via G. Gaslini 5, 16147, Genova (GE)

**Centri partecipanti:**

- **Federico Zara, Paolo Scudieri, Loretta Ferrera e Alessandra Ludovico (Under 40)**, UOC Genetica Medica, Istituto "G. Gaslini", Genova; Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOGLMI), Università degli Studi di Genova, Italia
- **Lorenzo Muzzi (under 40)**, Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi (DIBRIS), Università degli Studi di Genova, Italia
- **Pasquale Striano ed Elisabetta Amadori (Under 40)**, UOC Neurologia Pediatrica e Malattie Muscolari, Istituto "G. Gaslini", Genova; Dipartimento di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili (DINOGLMI), Università degli Studi di Genova, Italia
- **Federico Vigevano, Nicola Specchio e Marina Trivisano**, Unità di Epilessie Rare e Complesse, Dipartimento di Neuroscienze, IRCCS Istituto Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia
- **Gaetano Terrone**, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia
- **Pierangelo Veggiotti e Silvia Masnada (Under 40)**, Neuropsichiatria Infantile Ospedale ASST-Fatebenefratelli-Sacco, Milano, Italia
- **Raffaele Falsaperla**, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico "G.Rondolico-San Marco", Catania, Italia
- **Maurizio Elia**, Unità di Neurologia e Neurofisiopatologia Clinica, Oasi Research Institute-IRCCS, Troina, Italia
- **Tiziana Granata e Francesca Ragona**, Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano, Italia
- **Valentina De Giorgis**, Fondazione Mondino, Pavia, Italia
- **Lucio Giordano e Paola Martelli**, Ospedale Civile di Brescia, Brescia, Italia
- **Francesca Darra**, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata-Verona, Verona, Italia
- **Francesca Bisulli**, IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Bologna, Italia
- **Carla Marini**, Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedale Riuniti di Ancona, Ancona, Italia
- **Giuseppe d'Orsi**, IRCCS Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo, Foggia, Italia
- **Stefano Gambardella**, Neuromed-Laboratorio Genetica Molecolare, Isernia, Italia
- **Gaëtan Lesca**, Dipartimento di Genetica, Ospedale Universitario di Lione, Lione, Francia
- **In collaborazione con:** SCN2A Italia Famiglie in rete, INNESCO GROUP

## **Titolo del progetto:**

Saggio dell'attività **EPI**lettica e della risposta **FAR**macologica tramite **MEA** nell'epilessia *SCN2A*-relata (studio **EPIFARMA**)

## **Sinossi (max 600 parole)**

Il progetto si prefigge di caratterizzare l'attività elettrofisiologica di una rete neuronale derivata da cellule somatiche di pazienti portatori di mutazioni nel gene *SCN2A* su una matrice di microelettrodi (MEA), e di valutarne la specifica risposta farmacologica. Lo studio prevede la selezione di pazienti con diagnosi confermata di epilessia *SCN2A*-relata, che presentino fenotipo clinico e risposta ai trattamenti farmacologici "discordanti" e la cui gestione terapeutica sia, conseguentemente, più complessa. Cinque pazienti saranno sottoposti ad una biopsia cutanea minimamente invasiva per la raccolta di fibroblasti, che saranno utilizzati per generare cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) e cellule neuronali (iNeurons) paziente-specifici mediante tecniche di riprogrammazione *in vitro*. Le cellule iPSC ed i neuroprecursori (NPCs) saranno ottenuti tramite protocollo validato dal nostro setting di laboratorio (1), mentre per la generazione delle reti neuronali corticali è stato implementato un protocollo specifico volto ad ottenere una densa rete di cellule neuronali che permetta efficaci registrazioni su MEA. Quest'ultimo protocollo è stato messo a punto nel laboratorio dell'Ente ospitante capofila e ottimizzato per le registrazioni funzionali su MEA. Le colture saranno piastrate su substrato finale (MEA) dove saranno mantenute, con opportuni cambi di terreno ogni 2 giorni, monitorate per registrarne l'attività elettrica spontanea una volta a settimana a partire dal giorno di differenziamento *in vitro* (DIV) 21. Si otterrà così una caratterizzazione dell'attività elettrofisiologica tramite estrazione di parametri neurofisiologici standard (2) per la valutazione del fenotipo elettrofisiologico. I risultati saranno poi analizzati dal punto di vista statistico per la caratterizzazione dello specifico pattern di attività della rete neuronale paziente-derivata rispetto ad una rete neuronale di controllo. Successivamente, si procederà per gli specifici scopi volti al raggiungimento dell'obiettivo secondario, ossia il "*recupero farmacologico*" del fenotipo elettrofisiologico aberrante. Il medium di coltura sarà quindi arricchito con principi attivi di alcuni composti con specifica indicazione come terapia *add-on* in epilessie farmaco-resistenti (i.e., fenfluramina, cannabidiolo, e cenobamato) (3-5), in particolare, nelle epilessie sodio-relate (i.e., Sindrome di Dravet). Lo studio pertanto potrebbe corroborare possibili correlazioni tra tali principi attivi e correnti del sodio, mai dimostrate, e portare ad evidenze sperimentali per un loro utilizzo nel trattamento dei pazienti con epilessia *SCN2A*-relata. Inoltre, saranno testate anche molecole senza specifica indicazione anticrisi, cosiddetti "farmaci riposizionati" (i.e., butirrato ed alfa-lattalbumina) che hanno dimostrato tuttavia efficacia in modelli preclinici di epilessia e/o di autismo (6;7). L'idea fondante del progetto, da estendersi ad una popolazione più ampia in futuro, è quella di verificare le potenzialità della medicina personalizzata, mirata ad indirizzare la gestione terapeutica dei pazienti sulla base del loro specifico pattern elettrofisiologico aberrante.

## **Parole chiave (max 5)**

Canalopatie

Epilessia

Matrice di microelettrodi

Testing farmacologico

## Razionale (max 1000 parole)

Il rationale del progetto è supportato dalle seguenti evidenze:

- *SCN2A* è uno dei geni più frequentemente mutati in pazienti con epilessia, disturbi dello spettro autistico e disabilità intellettiva. Tuttavia, i meccanismi alla base di questa variabilità fenotipica non sono stati completamente elucidati, in particolare in ambito epilettologico (8);
- Le matrici di microelettrodi (MEA) sono un modello innovativo per studiare le caratteristiche neurofisiologiche dei disturbi neurologici ed anche per lo screening farmacologico (9;10);
- Composti già utilizzati *in-label* (i.e., fenfluramina e cannabidiolo) o *off-label* (i.e., cenobamato) nella Sindrome di Dravet (SD), encefalopatia epilettica e dello sviluppo (DEE) causata dalla mutazione del canale della famiglia del sodio *SCN1A* (3-5), così come alcuni composti senza specifica indicazione anticrisi ma con evidenze in modelli preclinici (6;7) possono avere un rationale di utilizzo in altre forme di epilessia. Tuttavia, mancano dati in letteratura che studino specificamente il loro meccanismo farmacologico e necessitano dunque di ulteriori trial *in vitro* per poter essere poi efficacemente utilizzati in ambito clinico.

Il gene *SCN2A* codifica per la subunità  $\alpha$  del canale del sodio voltaggio-dipendente  $Na_v1.2$  (11), espresso a livello del segmento iniziale dell'assone, sito responsabile della generazione e propagazione del potenziale d'azione (PA) nei neuroni (12). L'espressione di  $Na_v1.2$  cambia nella neocorteccia durante lo sviluppo, influenzando l'eccitabilità dendritica e la connettività sinaptica (12). In particolare, in epoca neonatale  $Na_v1.2$  è il principale canale del sodio responsabile dell'inizio e della propagazione del PA. Successivamente, intorno a 1-2 anni di età, la funzione di  $Na_v1.2$  viene ampiamente assolta da  $Na_v1.6$ , relegando  $Na_v1.2$  alla propagazione retrograda del PA al comparto somato-dendritico (8). Inoltre, l'isoforma espressa nella corteccia "matura" è diversa da quella espressa nella corteccia "immatura", rivelando possibili ulteriori ruoli della proteina nello sviluppo cerebrale (8), la cui importanza è evidenziata dall'osservazione che i topi knock-out omozigoti (null) per *SCN2A* non sono compatibili con la vita (13).

Varianti patogenetiche in *SCN2A* sono state associate ad uno spettro di sindromi epilettiche e disordini del neurosviluppo complessivamente denominati "disordini *SCN2A*-relati" (14). Da un punto di vista biologico non è ancora del tutto chiaro come si manifesti questa variabilità fenotipica (8). Classicamente, le mutazioni con perdita di funzione (i.e., loss-of-function, LOF) sono associate ad epilessie ad esordio tardo-infantile ( $\geq 3$  mesi), meno severe ma con disturbi dello spettro autistico, mentre varianti con guadagno di funzione (i.e., gain-of-function, GOF) sono associate a forme più severe ad esordio infantile precoce, da cui il rationale per l'utilizzo di farmaci sodio bloccanti (14). Tuttavia, la complessità è tale per cui in alcuni casi la risposta farmacologica non è quella "attesa" dal fenotipo elettroclinico, determinando ripetuti fallimenti farmacologici ed un *outcome* negativo per il paziente.

Recentemente la complessità dei meccanismi fisiopatologici implicati è stata confermata in modelli murini e sistemi cellulari eterologhi, in cui alcune varianti in *SCN2A* si sono dimostrate al contempo GOF e LOF (15;16). Modelli sperimentali basati su neuroni derivati da pazienti possono dunque essere molto utili per comprendere come specifiche varianti possano impattare sull'attività neuronale e determinare distinte manifestazioni fenotipiche (8).

Le matrici di microelettrodi (MEA), sono dispositivi che permettono di registrare l'attività elettrofisiologica di cellule eccitabili elettrogeniche grazie a degli elettrodi presenti sulla superficie. Sono oramai considerate un modello robusto e la loro applicazione spazia dalla caratterizzazione di diversi disturbi neurologici (9) allo screening farmacologico (10). In particolare, protocolli per il differenziamento di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) permettono oggi di ottenere neuroni derivati dal paziente (2;17), ed, al contempo, MEA ad alta densità di elettrodi (HD-MEA), grazie alla tecnologia C-MOS, permettono di registrare il segnale elettrofisiologico delle rete neuronali con una risoluzione riconducibile alla singola cellula, rendendo l'approccio *in vitro* più informativo rispetto ad alcune condizioni *in vivo* (es. *drosophila*).

## Obiettivi (max 500 parole)

Obiettivo primario:

- Identificare uno specifico pattern di attività elettrofisiologica in una rete neuronale derivata da cellule di pazienti con mutazioni in *SCN2A* su una matrice di microelettrodi

Obiettivo secondario:

- Recupero *in vitro* del fenotipo elettrofisiologico tramite un trial con composti con indicazione anticrisi (i.e., fenfluramina, cannabidiolo, cenobamato) e “farmaci riposizionati” (i.e., butirrato e alfa-lattalbumina)

## Piano sperimentale (max 2000 parole)

**AIM 1:** Identificazione del pattern di attività elettrofisiologica della rete neuronale derivata dal paziente

### **Task 1.1:** *Arruolamento dei pazienti e raccolta di campioni biologici*

Verranno arruolati nello studio 5 (massimo 6) individui in età pediatrica con epilessia *SCN2A*-relata. I criteri di inclusione ed esclusione sono riportati nella sezione Metodi (vedi **Task 1.1**). Una volta arruolati nello studio, i pazienti saranno sottoposti a biopsia cutanea in regime ambulatoriale presso i Centri clinici che partecipano allo studio. Lo scopo è quello di minimizzare il disagio per il paziente ed i genitori/caregiver assicurando una procedura rapida (5 minuti per esecuzione punch biopsy + 45-60 minuti di osservazione post-procedura), minimamente invasiva ( $\varnothing$  3 mm; profondità 7 mm). Ogni Centro partecipante riceverà la provetta con apposito terreno (vedi sezione **Metodi**), preparata dall'Ente ospitante capofila, un paio di giorni prima dell'esecuzione della procedura. Subito dopo la raccolta, la provetta, contenente il terreno+biopsia cutanea sarà inviata tramite corriere all'Ente ospitante capofila a temperatura ambiente entro 72 ore dalla raccolta.

### **Task 1.2:** *Generazione di neuroni da iPSCs*

Una volta ricevuta la biopsia cutanea, in circa 15 giorni saranno allestite e sviluppate le colture di fibroblasti. Un'aliquota di fibroblasti verrà conservata presso la “Biobanca di linee cellulari e DNA da pazienti affetti da malattie genetiche” dell'Istituto Giannina Gaslini ([geneticbiobank@gaslini.org](mailto:geneticbiobank@gaslini.org)) per l'eventuale esecuzione di studi futuri. Successivamente, avrà inizio la fase di riprogrammazione dei fibroblasti per la generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs). Le cellule iPS verranno generate mediante il kit di riprogrammazione CytoTune™-iPS 2.0 che usa come vettore una forma modificata, non-integrante nel genoma ospite, del virus Sendai (SeV). Le cellule infettate genereranno aggregati clonali che saranno valutati dopo 25 giorni. Saranno isolate almeno 5 colonie per ciascun genotipo mediante prelievo manuale e coltivate separatamente. I cloni saranno testati per marcatori di pluripotenza mediante qRT-PCR e immunofluorescenza (IF). La pluripotenza sarà verificata in ciascuna linea cellulare mediante differenziamento nei tre tessuti germinali. Le linee iPSCs saranno quindi testate per micoplasma (kit EZ-PCR) e per stabilità genomica (cariotipo, array-CGH). Il tempo totale previsto per ciascuna linea è di circa 3 mesi. Una volta ottenute le iPSCs si procederà alla loro differenziazione neuronale, attraverso lo stadio di neuroprogenitori (NP). Le iPSCs saranno, quindi, coltivate con terreni di coltura appropriati (vedi sezione **Metodi**) e le rosette neurali diventeranno chiaramente visibili e selezionabili dopo circa 6 giorni. A questo punto, un nuovo cambio di terreno con l'aggiunta di quello finale (i.e., Neurobasal™ integrato con specifiche

sostanze supplementi) consentirà lo sviluppo di colture neuronali mature in circa 4 settimane sul substrato finale (MEA).

**Task 1.3:** *Piastramento dei neuroni derivati da pazienti su MEA e registrazione attività elettrofisiologiche di network*

A circa una settimana prima degli ultimi stadi di differenziazione neuronale, il substrato finale di adesione, ovvero la matrice di microelettrodi (MEA), sarà preparato per accogliere le colture neuronali. In particolare, il sistema dovrà essere adeguatamente sterilizzato e rivestito da fattori di adesione. Una volta piastrati i neuroni, questi dovranno essere mantenuti sul dispositivo cambiando il terreno ogni 2 giorni. L'attività elettrofisiologica sarà dunque registrata ai seguenti time points: giorno di differenziamento in vitro (DIV) 21-28-35-42-49-56. Verranno analizzati numerosi parametri, quali ad esempio: il Precise-Timing Spike Detection (PTSD), il Mean Burst Rate (MBR), la percentuale di spike random (PRS), il Mean Firing Rate (MFR).

**AIM 2:** Recupero *in vitro* del fenotipo elettrofisiologico tramite trial farmacologico

**Task 2.1:** *Test farmacologici nelle colture neuronali*

Per questo obiettivo ci riserviamo, in relazione allo specifico pattern di attività elettrofisiologica della rete neuronale derivata dal paziente, di cercare di revertire il fenotipo aberrante verso quello dei controlli inserendo nel medium dei principi attivi di cui alcuni con specifica indicazione anticrisi (i.e., fenfluramina, cannabidiolo, e cenobamato) ed altri "riposizionati" (i.e., butirrato ed alfa-lattalbumina) ma che hanno dimostrato efficacia in modelli preclinici. In sintesi, useremo i diversi composti a una dose iniziale di 100  $\mu\text{M}$  come indicato in letteratura (18), che sarà modulata, usando concentrazioni diverse (sia maggiori che minori rispetto a quella iniziale) in base alla risposta specifica di ciascuna coltura neuronale.

**Fattibilità ed approcci alternativi**

A priori non si evincono problematiche legate al reclutamento dei pazienti. Come backup, presso la Biobanca dell'Ente ospitante capofila sono già presenti i campioni biologici (i.e., fibroblasti) di 4 pazienti con epilessia *SCN2A*-relata e che rispettano i criteri di inclusione/esclusione per lo studio. I campioni sono stati donati a scopo ricerca e saranno utilizzabili per gli scopi dello studio proposto previa sottoscrizione del consenso informato studio-specifico da parte dei pazienti o dei genitori/caregiver. Inoltre, l'ampia rete collaborativa, che include Centri italiani altamente specializzati ed il supporto dell'Associazione Famiglie garantisce il sostegno al reclutamento attivo dei pazienti. Le metodiche utilizzante, poi, sono ampiamente validate presso l'Ente ospitante. I calcoli di potenza sono stati eseguiti per identificare la dimensione del campione e l'aumento adattativo della dimensione del campione verrà eseguito se indicato dai risultati (i.e., mancata identificazione di uno specifico pattern di attività elettrofisiologica in alcuni campioni).

**Metodi (max 2000 parole)**

**AIM 1:** Identificazione del pattern di attività elettrofisiologica della rete neuronale derivata dal paziente

**Task 1.1:** *Arruolamento dei pazienti e raccolta di campioni biologici*

Verranno arruolati almeno 5 (massimo 6) pazienti selezionati secondo i seguenti criteri.

Criteri di inclusione:

- età pediatrica (0-18 anni)
- diagnosi di epilessia e conferma genetica di disordine *SCN2A*-relato
- variante patogenetica in *SCN2A* non precedentemente caratterizzata dal punto di vista funzionale
- risposta farmacologica “inattesa” rispetto al fenotipo (es. mancata risposta a sodio bloccante ma fenotipo compatibile con mutazione GOF)
- firma del consenso informato da parte del paziente o di un suo rappresentante legale/genitore

Criteri di esclusione:

- diagnosi di epilessia senza conferma genetica di mutazione in *SCN2A*
- disordine *SCN2A*-relato ma senza epilessia
- variante patogenetica in *SCN2A* già caratterizzata dal punto di vista funzionale
- risposta farmacologica “attesa” rispetto al fenotipo (es. adeguata risposta a sodio bloccante in fenotipo compatibile con mutazione GOF)
- presenza di “geni modificatori” del fenotipo (es. mutazioni in altri geni correlati ad epilessia)
- presenza di altre condizioni progressive (es. tumore)
- mancata firma del consenso informato

I controlli, simili ai pazienti per età e sesso, saranno direttamente disponibili (come linee già differenziate) presso l’Ente ospitante (materiale donato a scopi ricerca).

Le biopsie cutanee saranno eseguite mediante punch cutaneo ( $\varnothing$  3 mm) in corrispondenza della regione volare dell’avambraccio, previa iniezione locale di lidocaina. Il campione sarà subito raccolto in falcon tube (15 mL) contenete 10 mL di terreno: 20% siero FBS, RPMI, GLUTAMAX 1X, PENSTREP 1X, FUNGIZONE (AMFOTERICINA B) 1X.

#### **Task 1.2:** *Generazione di neuroni da iPSCs*

Le biopsie cutanee saranno quindi suddivise con bisturi in piccoli pezzetti distribuiti poi in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> con l’aggiunta di RPMI supplementato con 20% siero FBS, 2 mM LGlutamina, e 1% Penicillina/Streptomicina. Il kit di riprogrammazione CytoTune™-iPS 2.0 che usa come vettore una forma modificata, non-integrante nel genoma ospite, del virus Sendai (SeV) sarà utilizzato per riprogrammare le cellule a stadi meno differenziati in condizioni prive di alimentazione, e i cloni saranno valutati dopo 25 giorni. Per ciascun genotipo saranno isolate singole colonie mediante prelievo manuale e coltivate separatamente su piastre ricombinanti rivestite con Vitronectina umana troncata (VTNN) nel terreno di coltura ESSENTIAL-8. I cloni saranno espansi separatamente come linee cellulari e testati per marcatori di pluripotenza mediante qRT-PCR e IF al 15° passaggio. Per verificare la pluripotenza delle cellule iPS le differenzieremo *in vitro* nei tre strati germinali. A tal fine le iPSCs indifferenziate confluenti saranno incubate in collagenasi IV e trasferite su piastre a bassa adesione in medium EBs. Tutte le linee iPSCs saranno testate per micoplasma utilizzando il kit per il test del micoplasma EZ-PCR.

Per indurre la differenziazione neuronale delle iPSCs, le cellule saranno staccate dalla piastra di coltura e fatte aggregare in strutture simili a corpi embrionali (EB) utilizzando le piastre AggreWell™800 (STEMCELL Technologies Inc., Colonia, Germania). Gli EB saranno quindi mantenuti in STEMdiff™ Neural Induction Medium + SMADi + 10  $\mu$ M Y-27632 (STEMCELL Technologies Inc.) per 4 giorni. Il quinto giorno, gli EB saranno

seminati su piastre rivestite con Geltrex in STEMdiff™ Neural Induction Medium + SMADi medium. Dopo 6 giorni, gli EB si saranno diffusi e le rosette neurali saranno chiaramente visibili. Le rosette neurali saranno quindi selezionate utilizzando il reagente di selezione delle rosette neurali STEMdiff™ e seminate su piastre rivestite con Geltrex. Le rosette selezionate adese e la sovracrescita di NPC formeranno un monostrato tra i cluster. Dopo alcuni giorni, i neuroprecursori (NPC) saranno pronti per il passaggio su piastre rivestite con Geltrex e saranno mantenute con STEMdiff™ Neural Progenitor Medium (STEMCELL Technologies Inc).

Circa ~4'000'000 neuroprecursori saranno seminati in fiasche T-25 rivestite con Geltrex. Durante la piastratura (giorno di differenziamento in vitro [DIV] 0) utilizzeremo STEMdiff™ Neural Progenitor Medium (ThermoFisher, #05833) integrato con Supplemento A (1:50, #05836) e Supplemento B (1:1000, #05837) e Rock inibitore (1:1000) come terreno per piastrare i neuroprecursori. Al DIV 1 sarà rimosso tutto il terreno del progenitore neurale, e la flask sarà lavata con 1 ml di DPBS (ThermoFisher, 14190144). Conseguentemente verrà aggiunto nuovo terreno costituito da Neurobasal™ (Gibco, 21103049) integrato con 100x pen/strep, 100x GlutaMAX™ (Gibco, #35050061), supplemento B-27 (Gibco, #17504044), 1uM acido retinoico (Sigma Aldrich), 10ng/ml BDNF (BioConnect), 10ng/ml GDNF (BioConnect). Al DIV 3 le cellule saranno raccolte nelle fiasche e piastrate nel substrato finale (cioè vetrino coprioggetto e HD-MEA). Per staccare le cellule il terreno verrà rimosso e si procederà a lavare la fiasca con 2 ml di DPBS. Successivamente sarà aggiunto 1 ml di StemPro™ Accutase™ (Gibco, #A1110501) e la fiasca sarà incubata a 37 °C per 3 minuti. Quindi, utilizzeremo 1 ml di DMEM/F12 per staccare tutte le cellule dalle fiasche e le raccoglieremo in una provetta conica da 15 ml riempita con 9 ml di DMEM/F12 (Gibco, n. 11320033). La provetta sarà centrifugata a 1200rpm per 5 minuti e dopo aver scartato il soprannatante risospenderemo il pellet in 2 ml di terreno Neurobasal™, integrato con 100x pen/strep, 100x GlutaMAX™ (Gibco, #35050061), supplemento B-27 (Gibco, #17504044), 1uM acido retinoico (Sigma Aldrich), 10ng/ml BDNF (BioConnect), 10ng/ml GDNF (BioConnect), Acido ascorbico, 100x CulturONE (Gibco). Successivamente metteremo le cellule nel substrato finale (vale a dire vetrino coprioggetto e HD-MEA) priverestito con PLO e laminina. Dopo aver valutato l'adesione delle cellule sul chip, aggiungeremo 1 ml di terreno Neurobasal supplementato.

### **Task 1.3: Piastramento dei neuroni derivati da pazienti su MEA e registrazione attività elettrofisiologiche di network**

Per valutare l'attività funzionale di network della coltura neuronale utilizzeremo i dispositivi Accura HD-MEA (3Brain AG, Svizzera). Questi dispositivi presentano un'area attiva di 3.8 mm X 3.8 mm in cui sono allocati 4096 elettrodi C-MOS. Ogni microelettrodo ha una dimensione di 21 µm x 21 µm con un passo di 60 µm, disposto in una griglia 64x64. Prima dell'uso, gli HD-MEA saranno sterilizzati con 3 ml di EtOH al 70% per 20 minuti, quindi una volta rimosso l'etanolo, i dispositivi saranno sottoposti a 30 minuti di esposizione alla luce UV. Infine, le camere saranno lavate 3 volte con DPBS e i dispositivi saranno quindi conservati nell'incubatore per 2 notti con 2 ml di DPBS in ciascuna camera, per migliorare l'idrofilia del substrato (fase di condizionamento). Dopo questa fase, tutti i dispositivi saranno rivestiti con un doppio strato composto da poli-L-ornitina (PLO, Sigma-Aldrich) e laminina (BioConnect). Più specificamente, depositeremo una goccia di 100 µl nell'area attiva da una soluzione fresca di 50 µg/ml PLO in DPBS e incuberemo i dispositivi a 4 °C overnight. Il giorno seguente, rimuoveremo la goccia contenente PLO, laveremo due volte le camere con DPBS, depositeremo una goccia di 80 µl di 20 µg/ml di laminina nell'area attiva. I dispositivi saranno dunque lasciati per una notte a 4 °C, per essere utilizzati il giorno successivo.

Registreremo 5 minuti di attività elettrofisiologica a partire dal DIV 21 (a seguire: DIV 28-35-42-49-56) utilizzando BioCam Duplex (3Brain AG). I dati saranno campionati a 20 kHz. Condizioni simili all'incubatore saranno mantenute durante la registrazione mantenendo la coltura a 37 °C e 5,5% di CO2 in condizioni sterili.

Il dato grezzo verrà poi analizzato tramite algoritmi scritti in Matlab adattati dalla letteratura per le nostre colture.

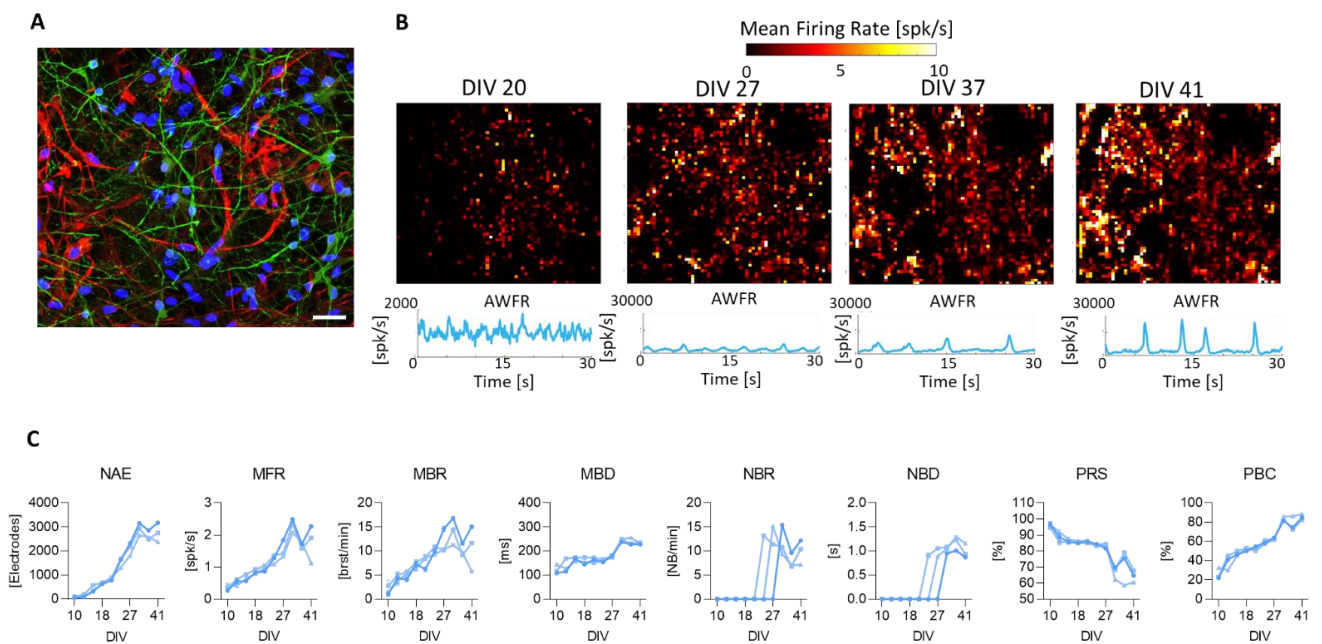
**Rilevazione degli spike.** Il Precise-Timing Spike Detection (PTSD) sarà utilizzato per rilevare i picchi (19). Un fattore di deviazione standard (THsd) di 8 sarà utilizzato per HD-MEA. Periodo di durata del picco di 1 ms, periodo refrattario di 1 ms e spike (spk) assegnato allo spike più alto saranno utilizzati come impostazioni di rilevamento.

**Firing rate medio.** Il Mean Firing Rate (MFR) sarà valutato per ciascun elettrodo come rapporto tra tutti i picchi rilevati e il tempo di registrazione. Saranno considerati nell'analisi solo gli elettrodi "attivi" con  $MFR > 0,1$  spike/s.

**Rilevazione dei burst.** Considereremo un burst come una serie di 3 picchi consecutivi che si attivano a non più di 100 ms l'uno dall'altro. Il Mean Burst Rate (MBR) sarà valutato come la somma di tutti i burst rilevati avvenuti in un canale attivo diviso il tempo di registrazione, e saranno considerati elettrodi burst quelli con un  $MBR > 0,1$  burst/min. La durata media del burst (MBD) sarà valutata calcolando la media di tutta la durata del burst rilevata nell'intera coltura. Pertanto, valuteremo la percentuale di spike random (PRS) come il rapporto tra il numero totale delle spike non-burst e il numero totale delle spike. In maniera simile, valuteremo la percentuale di bursting channels (PBC) come il rapporto tra elettrodi bursting ed elettrodi attivi.

**Raster plots.** Genereremo dei rasterplots per una valutazione panoramica dell'attività totale registrata da ciascun elettrodo MEA. Rappresenteremo l'attività (cioè i punti che indicano una spike rilevata) registrata da ciascun elettrodo di registrazione (cioè una singola linea su asse y) durante il tempo (cioè l'asse x).

**Rilevamento dei burst di rete.** Gli eventi sincroni che si verificano all'interno della rete, definiti come Network Burst (NB), saranno rilevati come precedentemente descritto.



**Figura 1. Dati preliminari di registrazioni di colture neuronali su MEA.**

**A)** Immagine che mostra una cultura fissata al girone di differenziamento in vitro (DIV) 42. In verde MAP2, in rosso GFAP, in magenta Ki67, in blu DAPI. Scala 25  $\mu\text{m}$ . **B)** Mappe di attività e Array Wide Firing Rate della stessa cultura su



MEA in diversi DIV. Ogni pixel rappresenta un elettrodo. **C)** Quantificazione dell'attività spontanea durante lo sviluppo. Grafici che mostrano il numero di elettrodi attivi (NAE), frequenza di scarica media (MFR), frequenza di bursting media (MBR), durata burst media (MBD), frequenza burst di rete (NBR), durata burst di rete (NBD), picchi casuali percentuali (PRS), canali di bursting percentuale (PBC). I dati sono mostrati come media e l'errore rappresenta l'errore standard della media.

**AIM 2:** Recupero *in vitro* del fenotipo elettrofisiologico tramite trial farmacologico

**Task 2.1:** *Test farmacologici nelle colture neuronali*

Il medium dei MEA sarà arricchito con principi attivi di cui alcuni con specifica indicazione anticrisi (i.e., fenfluramina, cannabidiolo, e cenobamato) ed altri "riposizionati" (i.e., butirrato ed alfa-lattalbumina) ma che hanno dimostrato efficacia in modelli preclinici. Useremo i diversi composti a una dose iniziale di 100  $\mu$ M come indicato in letteratura (18), che sarà modulata, usando concentrazioni diverse (sia maggiori che minori rispetto a quella iniziale) in base alla risposta specifica di ciascuna coltura neuronale. Si rivaluterà l'attività della coltura neuronale secondo i parametri visti nella **Task 1.3** e si procederà ad una nuova analisi statistica dei dati ottenuti.

**Risultati attesi e rilevanza clinica (max 500 parole)**

Ci attendiamo i seguenti risultati:

1. Mettere a punto innovativi modelli sperimentali cellulari per studiare meccanismi patogenetici e risposte farmacologiche nei disturbi neurologici, con particolare riferimento alle canalopatie epilettiche.
2. Identificare pattern di attività elettrofisiologica in pazienti con diverse varianti patogenetiche nel gene *SCN2A*.
3. Identificare composti specificamente diretti contro l'attività di firing ed in grado di revertire la il pattern elettrofisiologico aberrante.

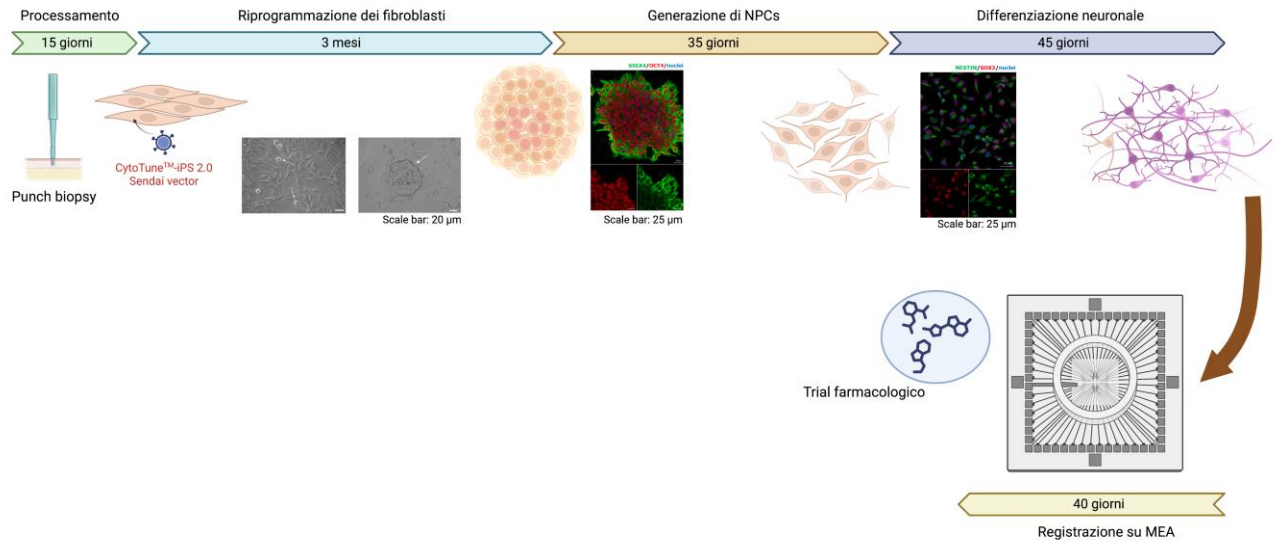
La rilevanza clinica dei risultati ottenuti è strettamente correlata alla necessità di orientare l'approccio all'epilessia ad una medicina personalizzata. Identificando le basi elettrofisiologiche del fenotipo elettroclinico dei pazienti e testando dei composti con analisi specifica sull'effetto elettrofisiologico potremo indirizzare la gestione terapeutica (es., valutazione dell'introduzione *off-label* di fenfluramina in terapia) di questi pazienti. Inoltre, potremo eventualmente guidare studi futuri (trial randomizzati) per accertare l'efficacia *in vivo* dei composti "riposizionati".

## Bibliografia

1. Baldassari et al., Vesicular Glutamate Release from Feeder-Free hiPSC-Derived Neurons. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 11;23(18):10545. doi:10.3390/ijms231810545.
2. Mossink B., et al. Human neuronal networks on micro-electrode arrays are a highly robust tool to study disease-specific genotype-phenotype correlations in vitro. *Stem Cell Reports.* 2021 Sep 14;16(9):2182-2196. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.07.001.
3. Lagae L., et al. Fenfluramine hydrochloride for the treatment of seizures in Dravet syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2019 Dec 21;394(10216):2243-2254. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32500-0.
4. Devinsky O., et al. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N Engl J Med.* 2017 May 25;376(21):2011-2020. doi: 10.1056/NEJMoa1611618.
5. Makridis KL., et al. Successful treatment of adult Dravet syndrome patients with cenobamate. 2022 Dec;63(12):e164-e171. doi: 10.1111/epi.17427.
6. Citraro R., et al. Preclinical activity profile of  $\alpha$ -lactoalbumin, a whey protein rich in tryptophan, in rodent models of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2011 Jun;95(1-2):60-9. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2011.02.013.
7. Leo A., et al. Increased efficacy of combining prebiotic and postbiotic in mouse models relevant to autism and depression. *Neuropharmacology.* 2021 Oct 15;198:108782. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108782.
8. Asadollahi R., et al. Pathogenic SCN2A variants cause early-stage dysfunction in patient-derived neurons. *Hum Mol Genet.* 2023 Apr 3;ddad048. doi: 10.1093/hmg/ddad048.
9. Keller JM., et al. Past, present, and future of neuronal models in vitro. *Adv Neurobiol.* 2019;22:3-17. doi: 10.1007/978-3-030-11135-9\_1.
10. Vassallo A., et al. A multi-laboratory evaluation of microelectrode array-based measurements of neural network activity for acute neurotoxicity testing. *Neurotoxicology.* 2017 May;60:280-292. doi: 10.1016/j.neuro.2016.03.019.
11. Li M., et al. Antisense oligonucleotide therapy reduces seizures and extends life span in an SCN2A gain-of-function epilepsy model. *J Clin Invest.* 2021 Dec 1;131(23):e152079. doi:10.1172/JCI152079.
12. Spratt PWE., et al. The Autism-Associated Gene Scn2a Contributes to Dendritic Excitability and Synaptic Function in the Prefrontal Cortex. *Neuron.* 2019 Aug 21;103(4):673-685. doi:10.1016/j.neuron.2019.05.037.
13. Eaton M., et al. Generation and basic characterization of a gene-trap knockout mouse model of Scn2a with a substantial reduction of voltage-gated sodium channel Nav 1.2 expression. *Genes Brain Behav.* 2021 Apr;20(4):e12725. doi: 10.1111/gbb.12725.
14. Wolff M., et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A related disorders. *Brain.* 2017 May 1;140(5):1316-1336. doi: 10.1093/brain/awx054.
15. Echevarria-Cooper DM., et al. Cellular and behavioral effects of altered NaV1.2 sodium channel ion permeability in Scn2aK1422E mice. *Hum Mol Genet.* 2022 Aug 25;31(17):2964-2988.
16. Yang XR., et al. SCN2A-related epilepsy of infancy with migrating focal seizures: report of a variant with apparent gain- and loss-of-function effects. *J Neurophysiol.* 2022 May 1;127(5):1388-1397. doi: 10.1152/jn.00309.2021.
17. Pelkonen A., et al. Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived models of the brain with microelectrode arrays. *Cells.* 2021 Dec 29;11 (1):106. doi: 10.3390/cells11010106.
18. Adney SK., et al. Functional and pharmacological evaluation of a novel SCN2A variant linked to early-onset epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020 Sep;7(9):1488-1501. doi: 10.1002/acn3.51105.
19. Maccione et al., A novel algorithm for precise identification of spikes in extracellular recorded neuronal signals. *J Neurosci Methods.* 2009 Feb 15;177(1):241-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.09.026.



## Schema grafico del progetto



## Piano economico

	Costo totale del progetto	Quota richiesta a Fondazione LICE	Quota cofinanziata	Ente cofinanziatore
<b>Personale di ricerca</b>	36000	29000	7000	SCN2A Italia Famiglia in rete
<b>Attrezzature</b>	0	0	0	0
<b>Materiali di consumo</b>	10000	7000	3000	SCN2A Italia Famiglia in rete
<b>Servizi informatici</b>	0	0	0	0
<b>Partecipazioni a congressi e collaborazioni (max 10%)</b>	2000	2000	0	0
<b>Costi di pubblicazione</b>	0	0	0	0
<b>Overheads (max 10%)</b>	2000	2000	0	0
<b>Totale</b>	<b>50000</b>	<b>40000</b>	<b>10000</b>	

## Dettaglio delle spese previste

Personale di ricerca	Quota di cofinanziamento per 1 assegno di ricerca
Attrezzature	Non previsto
Materiali di consumo	Reagenti e terreni per cellule derivate da pazienti e riprogrammazione in iPSC. Reagenti/terreni per la differenziazione e il mantenimento di colture neuronali derivate da iPSC. Anticorpi e altri reagenti IHC per la caratterizzazione morfologica di colture neuronali e analisi mediante microscopia confocale. Accura HD-MEA per le registrazioni elettrofisiologiche dell'attività neuronale. Standard molecole per testing farmacologico.
Servizi informatici	Non Previsto
Partecipazioni a congressi e collaborazioni (max 10%)	Partecipazione a congressi in cui si presentano i dati
Costi di pubblicazione	Non Previsto
Overheads (max 10%)	Manutenzione, assicurazione e sicurezza