

BANDO FONDAZIONE LICE 2020

TITOLO DEL PROGETTO:

SINDROME DA DEFICIT DI GLUT1: NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE PER INCREMENTARE IL TRASPORTO DEL GLUCOSIO ATTRAVERSO LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA (BEE)

RESPONSABILE SCIENTIFICO:

Prof. Pasquale Striano

ELENCO DEI CENTRI PARTECIPANTI E COLLABORATORI

- 1) UOC Neurologia Pediatrica, Istituto “Giannina Gaslini”, Università di Genova: P. Striano (U45), G. Balagura (U45), F. Zara;
- 2) Center for Synaptic Neuroscience and Technology, Istituto Italiano di Tecnologia, Genova: V. Castagnola (U45), F. Benfenati, L. Maragliano;
- 3) UOC SOD Neuropsichiatria Infantile, Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona: S. Matricardi (U45), Carla Marini;
- 4) Centro di Epilettologia dell’Infanzia e dell’Adolescenza, IRCCS Mondino, Pavia: C. Varesio (U45), V. De Giorgis (U45).

TIPO DI PROGETTO

Ricerca traslazionale

SINOSSI

Nel cervello dei mammiferi, il glucosio è la fonte principale di energia e la sua disponibilità è critica in epoca neonatale e infantile [1,2]. Tuttavia, il glucosio possiede una sola via di accesso al cervello, il trasportatore Glut1, presente nell'endotelio dei capillari cerebrali. Mutazioni mono- o bi-alleleliche nel gene codificante Glut1 (SLC2A1) determinano una carenza parziale o totale di attività di Glut1 (GLUT1DS) e causano uno spettro di patologie comprendenti crisi epilettiche intrattabili, disabilità intellettiva, atassia e distonia [3]. Ad oggi, il trattamento standard per la GLUT1DS è la dieta chetogenica, che è solitamente efficace sulle crisi epilettiche, ma ha un impatto limitato sulle altre manifestazioni e mostra effetti collaterali significativi. In questo scenario, è urgente identificare strategie diversificate per affrontare la complessità della patologia. Il rationale della nostra proposta è giustificato dalle seguenti evidenze:

- il rescue genetico di Glut1 previene la manifestazione del fenotipo neurologico in topi GLUT1DS [4];
- le cellule endoteliali sono cruciali per il trasporto di glucosio nella barriera emato-encefalica (BEE) [5];
- l'applicazione clinica della terapia genica presenta ancora importanti limitazioni [6];
- il livello di deficit di trasporto del glucosio correla con la severità del fenotipo [7-9];
- aumenti anche modesti nel trasporto di glucosio attraverso la BEE sono attesi avere un beneficio clinico significativo [8].

Il nostro obiettivo principale prevede di sviluppare nuovi strumenti molecolari per incrementare il trasporto del glucosio attraverso la BEE mediante due strategie complementari:

(i) stimoleremo la traduzione di Glut1 dall'allele sano utilizzando specifici RNA non-codificanti SINEUP [10];

(ii) indurremo la permeabilizzazione della BEE utilizzando specifici peptidi inibenti Claudin-5 (Cldn-5) nelle giunzioni serrate per aprire transitoriamente gli spazi tra le cellule endoteliali e lasciare diffondere il glucosio nel cervello [11, 12]. Per saggiare queste molecole innovative implementeremo un modello di BEE usando il sistema microfluidico Transwell [13], ricreando in vitro il deficit di Glut1 con cellule endoteliali cerebrali derivate da cellule pluripotenti indotte di pazienti con GLUT1DS.

Questi approcci permetteranno di:

- testare l'efficacia di una potenziale strategia terapeutica di precisione che mira a correggere l'eziologia della sindrome da deficit di GLUT1;
- ottimizzare un modello di patologia *in vitro* derivato dalle cellule dei pazienti portatori di diverse mutazioni del gene GLUT1, che permetterà una valutazione funzionale

personalizzata dell'efficacia di potenziali terapie molecolari sul trasporto di glucosio attraverso la barriera emato-encefalica.

PAROLE CHIAVE

epilessia; GLUT1; barriera ematoencefalica; SINEUP; terapia

RAZIONALE

GLUT1DS è un disturbo monogenico complesso, che abbraccia uno spettro di condizioni sotteso da una parziale o totale carenza di Glut-1, dovuta a una varietà di mutazioni nel gene SLC2A1. Lo spettro clinico abbraccia una serie di disturbi neurologici, comprendendo la più grave Sindrome di De Vivo, autosomica recessiva, e le più comuni forme autosomiche dominanti, caratterizzate da crisi epilettiche refrattarie, disabilità intellettiva, atassia, distonia [3].

La caratteristica distintiva della GLUT1DS è l'ipoglicorachia, definita come livello di glucosio nel liquor cefalorachidiano (LCR) $<40\text{mg/dl}$ e un rapporto di glucosio LCR/sangue <0.45 [14]. Evidenze sperimentali indicano una forte correlazione tra la severità clinica e il grado di compromissione della captazione di glucosio dovuto alle diverse mutazioni [7, 9]. La tomografia a emissione di positroni (PET) mostra una riduzione generalizzata della captazione di 18-fluorodeossiglucosio (FDG), con un importante ipometabolismo glucidico nel talamo, nelle regioni neocorticali e nel cervelletto [15]. Tuttavia, studi di neuroimaging riportano uno sviluppo totale del cervello normale anche in pazienti GLUT1DS con microcefalia. I dati patologici più significativi derivano da studi in modelli murini di GLUT1DS e rivelano un arresto dell'angiogenesi cerebrale che sottende alla ridotta micro-vascolarizzazione cerebrale, nel contesto di una funzione della BEE preservata [4, 5]. Questi reperti sono in accordo con il ruolo critico di Glut1 per le cellule endoteliali cerebrali e, tra queste, per le cellule "tip", che giocano un ruolo fondamentale nell'espansione microvascolare [5].

L'attuale standard terapeutico per GLUT1DS è la dieta chetogena, una dieta ad alto contenuto di grassi che mira ad aumentare il livello di corpi chetonici nel sangue come sostituti alternativi del glucosio [16]. I chetoni attraversano la BEE utilizzando il trasportatore monocarbossilato 1 (MCT1) e riforniscono il cervello come fonti di acetil-CoA. La precoce somministrazione della dieta chetogena è di solito efficace sulle crisi epilettiche, ma possiede un impatto limitato sulle altre manifestazioni cliniche [17], a causa di i) deficit di glucosio come molecola segnale nel cervello in sviluppo; ii) carenza di intermedi glicolitici che derivano esclusivamente dal glucosio; iii) scarsa compliance, specialmente negli adolescenti; iv) effetti collaterali clinicamente significativi come la riduzione della massa ossea e l'aterosclerosi [18]. Un altro trattamento disponibile per la GLUT1DS è il triptonato, un trigliceride a media catena con acidi grassi a catena dispari, la cui efficacia è però limitata ai sintomi motori parossistici [19].

In questo scenario, un approccio terapeutico innovativo è altamente auspicabile per il trattamento delle manifestazioni cliniche e la prevenzione della cascata patologica che porta a un disordine irreversibile del neurosviluppo. Di conseguenza, per dirimere la complessità clinica e genetica, devono essere identificate strategie multiple e complementari.

Negli ultimi anni è stata sviluppata una nuova tecnologia basata su RNA non-codificanti in grado di aumentare la traduzione di una proteina bersaglio agendo sul suo mRNA (SINEUP) [10]. Il SINEUP è un ncRNA antisense con struttura modulare: un Binding Domain responsabile della sua specificità verso un mRNA e un Effector Domain che up-regola la traduzione (Fig.1). Questo permette il rapido re-indirizzamento verso virtualmente qualsiasi mRNA bersaglio, progettando un Binding Domain estremamente specifico per il gene target. Nelle forme più comuni di GLUT1DS autosomica dominante, i SINEUP disegnati specificamente per Glut1 permettono di approfittare della presenza dell'allele sano come potenziale reservoir di proteina Glut1 funzionante ed ottenere un aumento della traduzione (Obiettivo 1.1). Questo effetto si esplica senza interferenze con il genoma, in quanto il SINEUP agisce a livello post-trascrizionale, legando uno specifico mRNA prodotto dalla cellula in modo fisiologico.

Un approccio complementare indipendente dalla natura delle mutazioni genetiche è invece basato sulla permeabilizzazione transiente della BEE utilizzando peptidi inibitori della Claudina-5, la componente chiave delle giunzioni serrate che sigillano gli spazi paracellulari della BEE (Obiettivo 1.2) [12, 13].

Per testare questi strumenti molecolari innovativi è richiesto un modello sperimentale flessibile di BEE. A questo scopo, ottimizzeremo il Transwell system, una piattaforma sperimentale già operativa che mima la BEE *in vitro*, per creare un modello specifico di carenza di Glut1 (Obiettivo 2.1) [13]. Il Transwell è un supporto permeabile a due camere, in cui le cellule endoteliali vengono fatte crescere sulla superficie superiore, che rappresenta il compartimento vascolare della BEE; il passaggio di sostanze attraverso la barriera cellulare può essere così dosato nel compartimento inferiore, che rappresenta il compartimento cerebrale (Fig.2).

L'efficacia degli strumenti molecolari più promettenti dell'Obiettivo 1 verrà valutata dal punto di vista funzionale nel Transwell system con deficit di Glut1 (Obiettivo 2.2).

OBIETTIVI

Il nostro obiettivo principale prevede di sviluppare nuovi strumenti molecolari per incrementare il trasporto del glucosio attraverso la BEE mediante due strategie complementari: (i) stimoleremo la traduzione di Glut1 dall'allele sano utilizzando RNA non-codificanti SINEUP [10]; (ii) indurremo la permeabilizzazione della BEE utilizzando specifici peptidi inibenti Claudin-5 (Cldn-5) nelle giunzioni serrate per aprire transitoriamente gli spazi tra le cellule endoteliali e lasciare diffondere il glucosio nel cervello [11, 12]. Per saggiare queste molecole innovative implementeremo un modello di BEE con il sistema microfluidico Transwell [13], ricreando *in vitro* il deficit di Glut1 con cellule endoteliali cerebrali derivate da cellule pluripotenti indotte di pazienti.

Obiettivi specifici:

OBIETTIVO SPECIFICO 1. DISEGNO DI NUOVI STRUMENTI MOLECOLARI PER AUMENTARE IL TRASPORTO DI GLUCOSIO AL CERVELLO

Lo scopo è di incrementare l'espressione endogena di Glut1 a livello traduzionale usando RNA non codificanti e di indurre il trasporto paracellulare di glucosio attraverso la BEE permeabilizzando le giunzioni serrate da Claudin-5.

1.1 Stimolazione della traduzione di Glut1 attraverso i SINEUPs. Valuteremo l'impatto dei SINEUPs sull'espressione di Glut1 e sul trasporto del glucosio nella linea endoteliale cerebrale umana (hBMEC/D3).

1.2 Apertura degli spazi paracellulari della BEE attraverso peptidi inibenti Claudin-5. Useremo un *modeling* per omologia e simulazioni di dinamica molecolare per generare nuovi peptidi che aumentano la permeabilità paracellulare inibendo Cldn-5. La capacità dei peptidi di legare Cldn-5 verrà caratterizzata in cellule Hek293.

OBIETTIVO SPECIFICO 2. SVILUPPO DI UN MODELLO INVITRO DI BEE PER TESTARE I NUOVI APPROCCI MOLECOLARI

L'efficacia di queste strategie sarà valutata in un modello in vitro della BEE con deficit di Glut1. A questo scopo, ottimizzeremo un modello di BEE con cellule endoteliali umane derivate da pazienti con GLUT1DS ed effettueremo test funzionali.

2.1 Implementazione di modelli in vitro di BEE utilizzando cellule endoteliali cerebrali umane con deficit di Glut1. Le cellule endoteliali cerebrali derivate dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) di pazienti con GLUT1DS verranno utilizzate per implementare il modello microfluidico di BEE Transwell. Lo studio funzionale sulla BEE verrà condotto attraverso la resistenza elettrica trans-endoteliale (TEER) e la permeabilità paracellulare con marcatori fluorescenti.

2.2 Studio dell'efficacia delle nuove strategie terapeutiche nel recuperare il deficit di Glut1 in modelli in vitro di BEE. Il SINEUP più efficace verrà trasdotto attraverso un AAV endotelio-specifico [20] nelle cellule endoteliali cerebrali generate dai pazienti e dai controlli a partire da iPSCs. L'attività verrà valutata in termini di incremento dell'espressione di Glut1, di captazione di glucosio e di passaggio di glucosio attraverso la BEE. I peptidi Claudin-5 verranno aggiunti in concentrazioni progressive per valutare gli effetti sulle proteine delle giunzioni e la permeabilità paracellulare.

PIANO SPERIMENTALE

OBIETTIVO SPECIFICO 1. DISEGNO DI NUOVI STRUMENTI MOLECOLARI PER AUMENTARE IL TRASPORTO DI GLUCOSIO AL CERVELLO

1.1 Stimolazione della traduzione di Glut1 attraverso i SINEUPs.

Per prima cosa trasferiremo i SINEUP-GLUT1 nella linea cellulare endoteliale umana hBMEC/D3 per quantificare l'incremento di espressione della proteina Glut1 endogena con il Western Blot, e selezionare il costrutto più performante. Il livello di mRNA Glut1 endogeno verrà monitorato con qRT-PCR. Quindi, valuteremo l'impatto funzionale della somministrazione dei SINEUP sulla captazione di glucosio con un Glucose Uptake-Glo Assay.

Dal momento che i SINEUPs agiscono a livello traduzionale, il rischio di effetti off-target è ritenuto basso. In ogni caso, investigheremo eventuali off-target attraverso due approcci: un'analisi bioinformatica delle sequenze Binding Domain dei SINEUP-GLUT1 per individuare eventuali siti di legame aspecifici, e un approccio proteomico e trascrittomico su proteine ed RNA totali, rispettivamente (vedi Metodi).

1.2 Apertura degli spazi paracellulari della BEE attraverso peptidi inibenti Claudin-5.

Utilizzeremo *modeling* strutturale per omologia, unitamente a simulazioni di *docking* e dinamica molecolare ("Molecular Dynamics" o MD) per disegnare una famiglia di nuovi oligopeptidi capaci di aumentare la permeabilità della BEE. Genereremo nuovi peptidi derivati dalla minima regione di *binding* dell'enterotossina del *Clostridium perfringens* [21, 22]. Dopo l'identificazione delle sequenze dalla superficie di legame con Claudin-5, i peptidi verranno ottimizzati mediante mutagenesi per aumentarne l'affinità utilizzando simulazioni MD e calcoli dell'energia libera utilizzando il codice NAMD e campo di forze all-atom (CHARMM) [23, 24] basato sul nostro modello omologo di Claudin-5. Le sequenze ottenute verranno sintetizzate e marcate con il fluoroforo rodamina. Utilizzeremo anche varianti D-amminoacidiche delle sequenze ottimizzate per evitare la proteolisi dei peptidi esogeni *in vivo*. Le proprietà di legame dei peptidi alla Claudina-5 verranno caratterizzate nelle cellule Hek293 con espressione costitutiva di Claudin-5 attraverso *live imaging* e saggi *ELISA*.

OBIETTIVO SPECIFICO 2. SVILUPPO DI UN MODELLO INVITRO DI BEE PER TESTARE I NUOVI APPROCCI MOLECOLARI

2.1 Implementazione di modelli in vitro della BEE utilizzando cellule endoteliali cerebrali umane con deficit di Glut1.

L'obiettivo primario è implementare il sistema Transwell con cellule hBMECs derivate dalle cellule iPSCs dei pazienti con GLUT1DS (hiBMECs). Due linee cellulari iPSCs per ciascun paziente (n=2) e controllo (n=2) ottenute come da [25], saranno differenziate in hiBMECs e piastrate su Transwell in hECSR1/acido retinoico [26]. La valutazione funzionale della BEE sarà effettuata con TEER e permeabilità paracellulare al destrano fluorescente. In caso di differenziamento incompleto delle hiBMECs e ridotta funzionalità della BEE (TEER basso), genereremo delle cellule hBMEC/D3 con

deficit di Glut1 utilizzando uno specifico CRISPR/Cas9-mediated NHEJ Crispr/Ca9 genome editing con pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) come in [27].

2.2 Studio dell'efficacia delle nuove strategie terapeutiche nel recuperare il deficit di Glut1 in modelli in vitro di BEE.

I più efficienti SINEUP e peptidi inibenti Claudin-5 saranno testati in vitro nel modello Transwell di BEE con cellule hiBMEC umane derivate dai pazienti. Il SINEUP-GLUT1 e il controllo negativo SINEUP- Δ BD verranno trasdotti con un AAV endotelio-specifico [20] nelle cellule hiBMEC/D3 derivate da pazienti e controlli. La loro attività verrà valutata in termini di incremento dell'espressione di Glut1 mediante immunocitochimica, passaggio del glucosio attraverso il Transwell e captazione del glucosio all'interno delle cellule endoteliali utilizzando *live imaging* e "*fluorescence resonance energy transfer*" (FRET) con un reporter specifico per il glucosio (FLII12Pglu-700uDelta6) [28]. I peptidi inibenti l'assemblaggio di Claudin-5 saranno aggiunti a concentrazione crescente al modello di BEE per valutare l'effetto sulla distribuzione delle proteine delle giunzioni serrate e sulla permeabilità paracellulare analizzando il TEER, la diffusione del destrano fluorescente e il trasporto di glucosio attraverso la barriera.

Rispetto ai due obiettivi specifici descritti, abbiamo già ottenuto i seguenti risultati preliminari:

Obiettivo Specifico 1:

1.1 Al fine di aumentare la produzione di Glut1 dall'allele wt, abbiamo disegnato e clonato in plasmidi tre SINEUPs specifici per l'mRNA di Glut1 umano, caratterizzati da Binding Domains di lunghezza diversa: lungo (-40/+32), medio (-40/+0) e corto (14/+4), intorno all'ATG che rappresenta lo 0. Come controllo negativo abbiamo utilizzato il SINEUP privo di Binding Domain (SINEUP- Δ BD). Abbiamo individuato una linea cellulare umana U251MG in cui eseguire le trasfezioni con i costrutti SINEUP e abbiamo appurato il funzionamento dei SINEUP con un controllo positivo eGFP-SINEUP, ottenendo un aumento di GFP di 2.2 volte a 24 ore (Fig. 3A) rispetto alle cellule trattate con plasmide contenente solo eGFP.

Abbiamo quindi eseguito delle trasfezioni pilota nella linea U251MG *wt*, ottenendo un incremento della produzione di Glut1 di 1.2-1.5 volte rispetto al controllo negativo SINEUP- Δ BD (Fig.3B) a 24 ore post-trasfezione.

1.2 Per incrementare la permeabilità al glucosio della BEE, avevamo già generato un modello strutturale del complesso formato da Claudin-15 (omologo di Claudin-5) a livello delle giunzioni serrate (Fig. 4), ricapitolando le note proprietà selettive [21]. Abbiamo ora generato il modello Claudin-5 e lo abbiamo utilizzato per disegnare una serie di peptidi *docked* che andranno testati nei nostri modelli cellulari.

Obiettivo Specifico 2:

2.1 Abbiamo messo a punto un modello *in vitro* di BEE. Le cellule endoteliali sono state fatte crescere sulla superficie superiore di un supporto permeabile del Transwell system (Fig.2), con o senza terreno di coltura condizionato con astrociti [13].

Per modellare il deficit di Glut1, useremo cellule endoteliali cerebrali derivate dalle iPSCs dei pazienti. Abbiamo già generato e caratterizzato le linee iPSCs (Fig. 4) dai fibroblasti di due pazienti

con GLUT1DS con mutazione missense e troncante e dei relativi controlli sani (Tab. 1). Il modello iPSCs ricapitola le caratteristiche del deficit di Glut1 nei due pazienti, con proteina dimezzata nel paziente 1 e la produzione di una proteina Glut1 difettiva nel paziente 2 (Fig. 5).

METODI

METODI PRINCIPALI:

- I SINEUP-GLUT1 sono stati disegnati dopo analisi bioinformatica del 5'UTR di SLC2A1 utilizzando FANTOM Browser e sono stati sintetizzati da Cell Guidance Systems.
- Le trasfezioni nelle varie linee cellulari sono effettuate con Lipofectamine2000 secondo il protocollo e le cellule sono raccolte a 24, 48 e 72 ore post-trasfezione. Per ottenere la significatività statistica, saranno eseguite $n \geq 4$ trasfezioni indipendenti.
- L'aumento della traduzione di proteina Glut1 per effetto dei SINEUP è valutato attraverso Western Blot su lisato cellulare e quantificato con analisi densitometrica utilizzando UVITech Software. La proteina Gapdh è utilizzata come controllo di carica. I dati densitometrici per Glut1 sono normalizzati sul relativo dato Gapdh, e rapportati al controllo negativo.
- I livelli di mRNA target nei gruppi di trattamento sono valutati tramite qRT-PCR utilizzando la mix Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) con lo strumento CFX96 Real time PCR System (Bio-Rad) e l'espressione genica relativa verrà misurata con il metodo del DCt.
- Differenziamento delle cellule iPSCs derivate dai fibroblasti dei pazienti e controlli sani in cellule endoteliali cerebrali hiBMEC. Le iPSCs sono state caratterizzate per i marcatori di pluripotenza attraverso immunofluorescenza e qRT-PCR. Il potenziale di pluripotenza è stato valutato anche testando la capacità dei corpi embrioidi di differenziare in vitro nei foglietti embrionali endoderma (AFP), mesoderma (SMA), ectoderma (Tuj1) (Fig. 4). Le iPSCs sono mantenute in coltura su Vitronectina come da [25], differenziate in terreno di coltura non condizionato e piastrate su Transwell in terreno hECSR1 con acido retinoico come da [26]. La valutazione del differenziamento si basa sull'espressione di marcatori endoteliali, Glut1, proteine delle giunzioni serrate e trasportatori di efflusso con RT-qPCR e microscopia confocale.
- Valutazione degli off-target sul proteoma. Le cellule trattate con SINEUP-GLUT1 vs SINEUP- Δ BD sono solubilizzate e processate mediante il kit FASP Protein Digestion Kit (Expedeon Inc). L'analisi è effettuata mediante cromatografia liquida spettrometria di massa (LC-MS/MS) come da [29]. Gli esperimenti saranno condotti in triplicato per ciascuna linea e trattamento. I dati grezzi sono processati mediante il software MaxQuant software UniProt Release 2014_09. Le analisi della componente principale e del clustering gerarchico delle diverse repliche dei campioni si avvalgono del software Perseus per evidenziare le differenze significative tra i diversi gruppi sperimentali.
- Valutazione degli off-target sul trascrittoma. RNA sequencing (RNA-seq) su RNA totale dei diversi gruppi di trattamento come da [30].
- CRISPR/Cas9-mediated NHEJ sarà eseguito utilizzando pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) come da [27].
- Il software Rosetta è utilizzato nel modeling per omologia [31] e il docking proteico [32] per formare il complesso. Le simulazioni di Molecular Dynamics sono eseguite con il codice NAMD con il campo di forza con risoluzione atomica (CHARMM) [23, 24]

- L'attività di Glut1 sarà valutata con imaging in tempo reale (FLII12Pglu-700uDelta6 glucose-FRET probe [28]).

STATISTICA:

La significatività statistica è stabilita come $p < 0.05$. Test parametrici or non-parametrici saranno utilizzati in base alla distribuzione normale dei dati.

Tutti i metodi descritti rispettano e intendono rispettare la regola delle 3R della sostenibilità ambientale nella ricerca scientifica.

RISULTATI ATTESI E RILEVANZA CLINICA

Il potenziale traslazionale del progetto proposto è molto alto. La GLUT1DS è un disordine del neurosviluppo che manca di una terapia effettiva. Abbiamo disegnato due distinti approcci innovativi che mirano ad incrementare il trasporto di glucosio attraverso la BEE: i) stimolazione della traduzione di Glut1 attraverso RNA non-codificanti sintetici, i SINEUPs, per aumentare l'attività dell'allele residuo wild-type e superare l'aploinsufficienza, e ii) permeabilizzazione strutturale transitoria delle giunzioni serrate della BEE con peptidi Claudina-5 non conformazionali. Questi approcci possono potenzialmente essere associati per ristabilire un apporto fisiologico di glucosio al cervello.

Nell'arco temporale di questo progetto pilota, ci aspettiamo di raggiungere i seguenti risultati:

- sviluppare strategie complementari per aumentare l'ingresso di glucosio nel cervello;
- generare un modello in vitro di deficit di GLUT1 con cellule derivate dai pazienti;
- valutare l'efficacia terapeutica di nuove molecole che recuperano il deficit di GLUT1 in vitro.

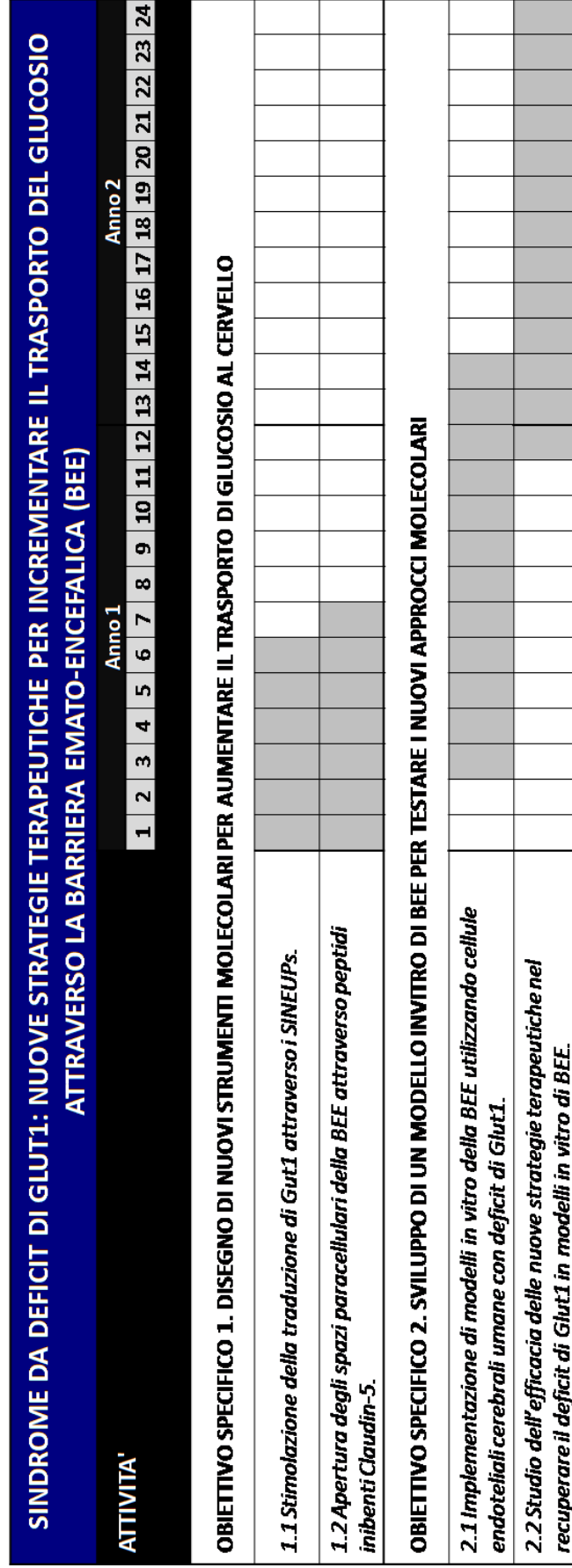
I suddetti risultati a breve termine si presentano come fasi preliminari di un progetto più ampio:

- Il modello Transwell deficitario di Glut1 può essere ulteriormente implementato in un modello di BEE più complesso, che meglio mima la BEE in vivo (es. aggiungendo astrociti umani [32]);
- I modelli Transwell base o deficitario di Glut1 possono essere immediatamente utilizzati come piattaforma di screening per strategie terapeutiche emergenti. Attualmente stiamo portando avanti un High Throughput Screening (HTS) di piccole molecole per promuovere la trascrizione di SLC2A1, utilizzando un saggio luciferasico cellulare [33].
- Stiamo sviluppando un topo Slc2a1 KO che ricapitola il fenotipo GLUT1DS [34, 35]. L'approccio risultato più efficace dagli esperimenti in vitro verrà testato in vivo nel topo omozigote ed eterozigote.

Questi studi preliminari possono aprire la strada verso una terapia di precisione mirata a correggere l'eziologia della GLUT1DS, con un potenziale impatto enorme sull'outcome cognitivo e la qualità di vita dei pazienti affetti.

PIANO TEMPORALE:

DIAGRAMMA GANTT



PIANO ECONOMICO

	COSTO TOTALE	QUOTA RICHIESTA A FONDAZIONE LICE	QUOTA CO-FINANZIATA	ENTE CO-FINANZIATORE
Personale di ricerca	47.574 *	20.000	27.574	Università degli Studi di Genova; IRCCS Istituto "G. Gaslini"
Attrezzature	0	0	0	-
Materiali di consumo	26.800 **	16.800	10.000	Università degli Studi di Genova; IRCCS Istituto "G. Gaslini"
Servizi informatici	0	0	0	-
Partecipazioni a congressi e collaborazioni	0	0	0	-
Costi di pubblicazione	0	0	0	-
Overhead 8%	3200	3200	0	'
Tot euro	77.574	40.000	37.574	

*Assegno di ricerca I fascia della durata di 2 anni per un giovane ricercatore che si occuperà di sviluppare il progetto

** Materiali per colture cellulari e differenziamenti da iPSCs; supporti Transwell; reagenti e consumabili per test quantitativi e funzionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011; 14:724-38.
2. Chugani HT. A critical period of brain development: studies of cerebral glucose utilization with PET. *Prev Med.* 1998; 27:184-8.
3. De Giorgis V, Veggiotti P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: current state of the art. *Seizure.* 2013; 22:803-11.
4. Tang M, Gao G, Rueda CB, Yu H, Thibodeaux DN, Awano T, Engelstad KM, Sanchez-Quintero MJ, Yang H, Li F, Li H, Su Q, Shetler KE, Jones L, Seo R, McConathy J, Hillman EM, Noebels JL, De Vivo DC, Monani UR. Brain microvasculature defects and Glut1 deficiency syndrome averted by early repletion of the glucose transporter-1 protein. *Nat Commun.* 2017; 8:14152.
5. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng LK, Betz I, Tembuyser B, Brepoels K, Welti J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F, Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, Deberardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M, Carmeliet P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell.* 2013; 154:651-63.
6. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. *Neuron.* 2019;101:839-862.
7. Suls A, Dedeken P, Goffin K, Van Esch H, Dupont P, Cassiman D, Kempfle J, Wuttke TV, Weber Y, Lerche H, Afawi Z, Vandenberghe W, Korczyn AD, Berkovic SF, Ekstein D, Kivity S, Ryvlin P, Claes LR, Deprez L, Maljevic S, Vargas A, Van Dyck T, Goossens D, Del-Favero J, Van Laere K, De Jonghe P, Van Paesschen W. Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain.* 2008; 131:1831-44.
8. Yang H, Wang D, Engelstad K, Bagay L, Wei Y, Rotstein M, Aggarwal V, Levy B, Ma L, Chung WK, De Vivo DC. Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. *Ann Neurol.* 2011; 70:996-1005.
9. Zaman SM, Mullen SA, Petrovski S, Maljevic S, Gazina EV, Phillips AM, Jones GD, Hildebrand MS, Damiano J, Auvin S, Lerche H, Weber YG, Berkovic SF, Scheffer IE, Reid CA, Petrou S. Development of a rapid functional assay that predicts GLUT1 disease severity. *Neurol Genet.* 2018; 4:e297.
10. Bon C, Luffarelli R, Russo R, Fortuni S, Pierattini B, Santulli C, Fimiani C, Persichetti F, Cotella D, Mallamaci A, Santoro C, Carninci P, Espinoza S, Testi R, Zucchelli S, Condò I, Gustincich S. SINEUP non-coding RNAs rescue defective frataxin expression and activity in a cellular model of Friedreich's Ataxia. *Nucleic Acids Res.* 2019 Oct 4, in press

11. Krause G, Protze J, Piontek J. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;42:3-12.
12. Alberini G, Benfenati F, Maragliano L. Molecular Dynamics Simulations of Ion Selectivity in a Claudin-15 Paracellular Channel. *J Phys Chem B.* 2018; 122:10783-10792.
13. Bramini M, Ye D, Hallerbach A, NicRaghnaill M, Salvati A, Aberg C, Dawson KA. Imaging approach to mechanistic study of nanoparticle interactions with the blood-brain barrier. *ACS Nano.* 2014; 8:4304-12.
14. Leen WG, Wevers RA, Kamsteeg EJ, Scheffer H, Verbeek MM, Willemsen MA. Cerebrospinal fluid analysis in the workup of GLUT1 deficiency syndrome: a systematic review. *JAMA Neurol.* 2013; 70):1440-4.
15. Akman CI, et al. *Epilepsy Res* 2015;110:206-15
16. Klepper J, Leiendecker B. Glut1 deficiency syndrome and novel ketogenic diets. *J Child Neurol.* 2013; 28:1045-8.
17. Pascual JM, Ronen GM. Glucose Transporter Type I Deficiency (G1D) at 25 (1990-2015): Presumptions, Facts, and the Lives of Persons With This Rare Disease. *Pediatr Neurol.* 2015; 53:379-93.
18. Tang M, Park SH, De Vivo DC, Monani UR. Therapeutic strategies for glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Ann ClinTransl Neurol.* 2019; 6:1923-1932.
19. Mochel F, et al. *J NeurolNeurosurgPsychiatry* 2016;87:550-3
20. Körbelin J, Dogbevia G, Michelfelder S, Ridder DA, Hunger A, Wenzel J, Seismann H, Lampe M, Bannach J, Pasparakis M, Kleinschmidt JA, Schwaninger M, Trepel M. A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol Med.* 2016; 8:609-25.
21. Protze J, Eichner M, Piontek A, Dinter S, Rossa J, Blecharz KG, Vajkoczy P, Piontek J, Krause G. Directed structural modification of *Clostridium perfringens* enterotoxin to enhance binding to claudin-5. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72:1417-32.
22. Neuhaus W, Piontek A, Protze J, Eichner M, Mahringer A, Subileau EA, Lee IM, Schulzke JD, Krause G, Piontek J. Reversible opening of the blood-brain barrier by claudin-5-binding variants of *Clostridium perfringens* enterotoxin's claudin-binding domain. *Biomaterials.* 2018; 161:129-143.
23. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem.* 2005; 26:1781-802.
24. Best RB, Zhu X, Shim J, Lopes PE, Mittal J, Feig M, Mackerell AD Jr. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *J Chem Theory Comput.* 2012; 8:3257-3273.
25. Fruscione F, Valente P, Sterlini B, Romei A, Baldassari S, Fadda M, Prestigio C, Giansante G, Sartorelli J, Rossi P, Rubio A, Gambardella A, Nieus T, Broccoli V, Fassio A, Baldelli P, Corradi A, Zara F, Benfenati F. PRRT2 controls neuronal excitability by negatively modulating Na⁺ channel 1.2/1.6 activity. *Brain.* 2018; 141:1000-1016.19.
26. Lippmann ES, Al-Ahmad A, Azarin SM, Palecek SP, Shusta EV. A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci Rep.* 2014; 4:4160.

27. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013; 8:2281-2308.
28. Takanaga H, Chaudhuri B, Frommer WB. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *BiochimBiophysActa.* 2008; 1778:1091-9.
29. Petretto A, Carbotti G, Inglese E, Lavarello C, Pistillo MP, Rigo V, Croce M, Longo L, Martini S, Vacca P, Ferrini S, Fabbi M. Proteomic analysis uncovers common effects of IFN- γ and IL-27 on the HLA class I antigen presentation machinery in human cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7:72518-72536.
30. Domenger C, Allais M, François V, et al. RNA-Seq Analysis of an Antisense Sequence Optimized for Exon Skipping in Duchenne Patients Reveals No Off-Target Effect. *Mol Ther Nucleic Acids.* ;10:277–291. doi:10.1016/j.omtn.2017.12.008).
31. Song Y, et al. *Structure* 2013;21:1735-42
32. Chaudhury S, et al. *PLoS ONE* 2011;6:e22477
33. Cappato S, Tonachini L, Giacomelli F, Tirone M, Galietta LJ, Sormani M, Giovenzana A, Spinelli AE, Canciani B, Brunelli S, Ravazzolo R, Bocciardi R. High-throughput screening for modulators of ACVR1 transcription: discovery of potential therapeutics for fibrodysplasia ossificans progressiva. *Dis Model Mech.* 2016; 9:685-96.
34. Ohtsuki S, Kikkawa T, Hori S, Terasaki T. Modulation and compensation of the mRNA expression of energy related transporters in the brain of glucose transporter 1-deficient mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29:1587-91.
35. Nakamura S, Osaka H, Muramatsu SI, Takino N, Ito M, Aoki S, Jimbo EF, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T. Gene therapy for a mouse model of glucose transporter-1 deficiency syndrome. *MolGenetMetab Rep.* 2017; 10:67-74.

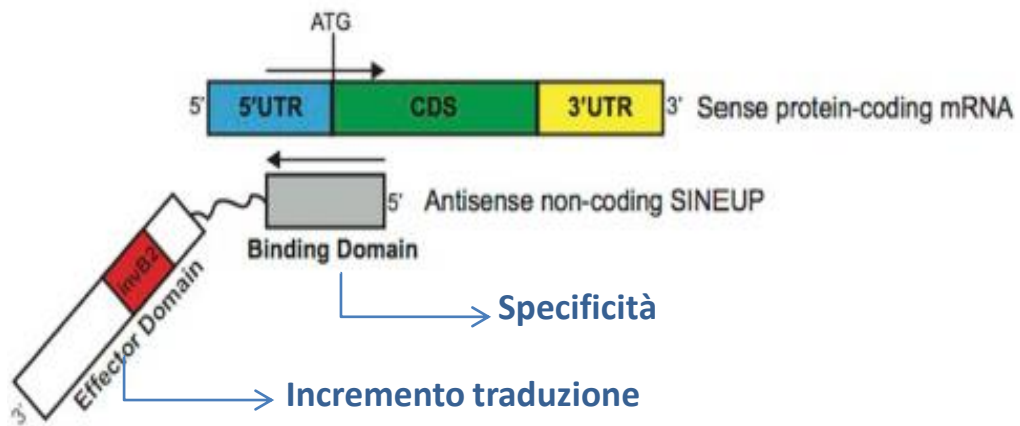


Fig. 1 La struttura modulare del SINEUP. Il Binding Domain conferisce la specificità di sequenza per l'mRNA bersaglio; l'Effector Domain attiva la sintesi proteica.

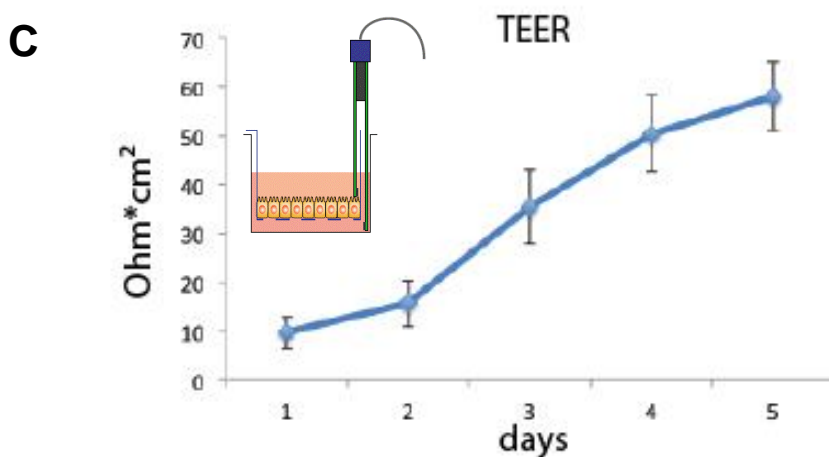
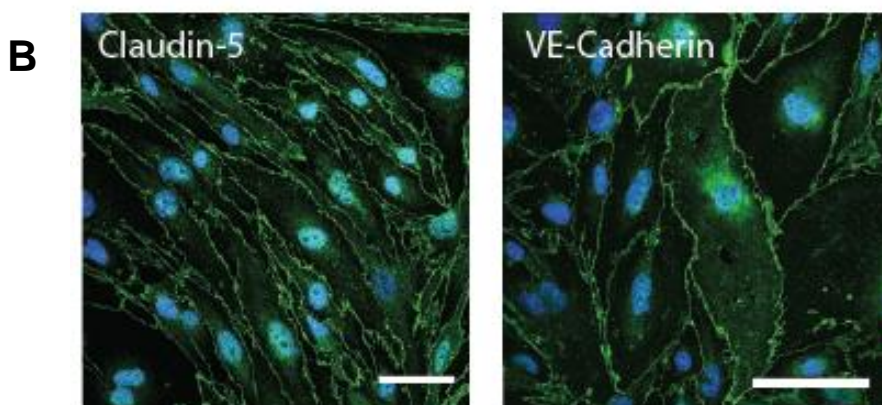
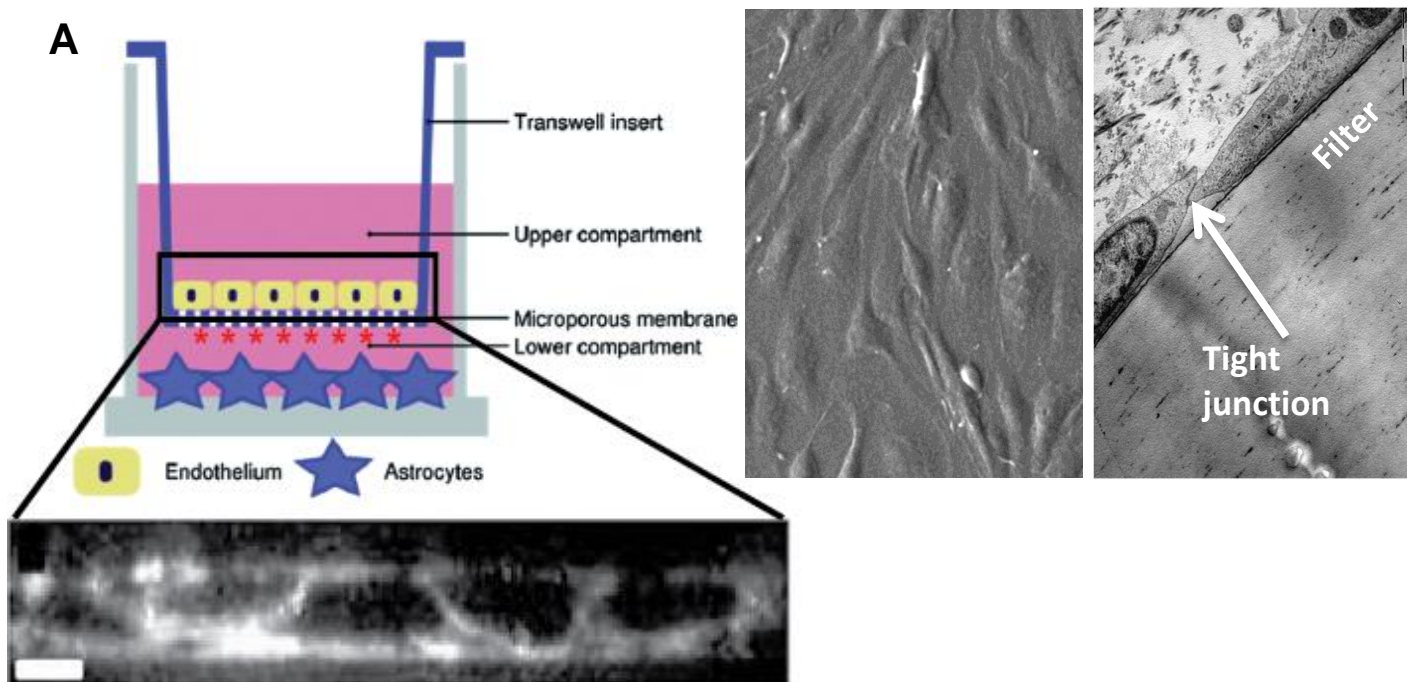


Fig. 2 Modello Transwell della Barriera Emato-Encefalica (BEE).

(A) *Sinistra*: schema del sistema Transwell e sezione di cellule endoteliali (scala, 5 μm);
Destra: microscopia elettronica a scansione e trasmissione delle giunzioni serrate di uno strato di cellule hBMEC/D3.

(B) Espressione delle giunzioni serrate e aderenti (scala, 20 μm);

(C) Resistenza elettrica trans-endoteliale (TEER) di uno strato di endotelio nel sistema Transwell in funzione del tempo in coltura.

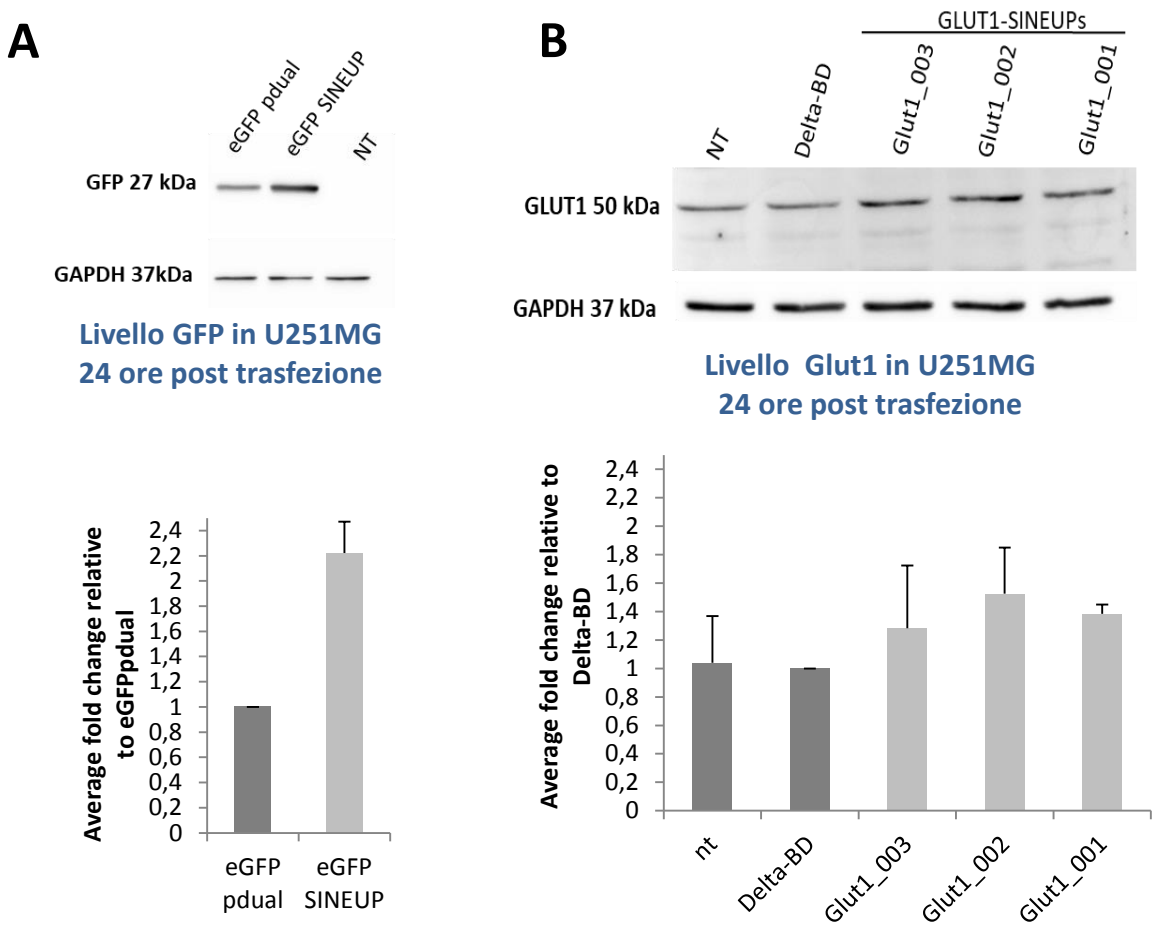


Fig. 3 Struttura dei SINEUPs ed attività sulle proteine GFP e GLUT1 nella linea cellulare umana U251MG.

(A) Attività dei SINEUPs sui livelli di GFP in cellule U251MG. Immagine rappresentativa di un Western blot di proteine totali 24 ore post-trasfezione e relativa analisi densitometrica. Come controllo positivo, un costrutto esprime GFP è stato trasfettato in U251MG in assenza (eGFPpdual) o in presenza (eGFP-SINEUP) di SINEUP specifico per l'mRNA di GFP. In presenza di GFP-SINEUP, la proteina GFP ha un incremento di 2.2 volte dopo 24 ore. I risultati sono mostrati come media \pm SEM di n=2 esperimenti.

(B) Attività dei SINEUPs sui livelli di Glut1 in cellule U251MG. Immagine rappresentativa di un Western blot di proteine totali 24 ore post-trasfezione e relativa analisi densitometrica. Le U251MG sono state trasfettate con 3 SINEUP-GLUT1 di diversa lunghezza, e SINEUP- Δ BD (controllo negativo). I campioni trattati con SINEUPs hanno un incremento medio di 1.2 – 1.5 volte della proteina Glut1 dopo 24 ore post trafezione. I risultati sono mostrati come media \pm SEM di n=2 esperimenti.

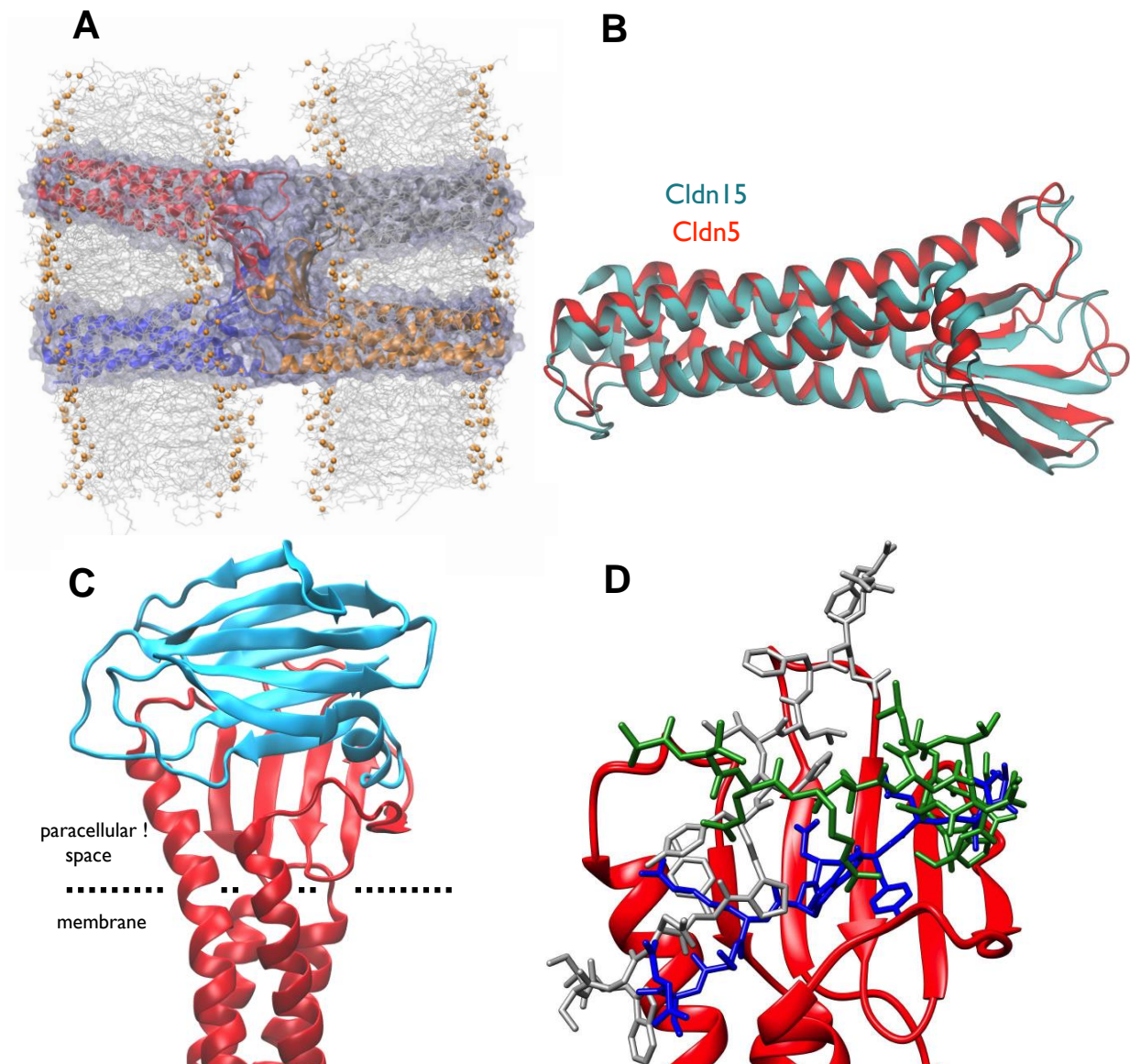


Fig. 4 Modeling computazionale delle claudine e dei peptidi inibitori.

(A) Visione laterale del nostro modello di complesso Claudin-15 nelle giunzioni serrate, con protomeri rappresentati come nastri di diversi colori e le membrane delle cellule adiacenti in grigio e arancione.

(B) Confronto tra Claudin-15 (ciano) ed il modello per omologia di Claudin-5 (rosso).

(C) Struttura cristallina del complesso Claudin-4/cCPE (PDB ID: 5b2g); la claudina è rappresentata in rosso, mentre il cCPE in azzurro; la linea tratteggiata indica l'interfaccia tra la membrana cellulare endoteliale e lo spazio paracellulare.

(D) Modello per omologia di Claudin-5 (rosso) con tre peptidi estratti dal cCPE (blu, bianco e verde) e legati al dominio extracellulare della proteina.

	Genotipo GLUT1	Glucosio LCR/siero	Fenotipo			Terapia	Età alla biopsia	Linee iPSCs validate
			Epilessia	Altre caratteristiche cliniche	Sviluppo			
Paziente 1	p.Asn29Trp-fs*60 Het <i>de novo</i>	0,26	Crisi miocloniche	Microcefalia (10-25° perc.)	Severo RPM/DI	DC	1 anno	#PLL c.3 #PLL c.13
Paziente 2	p.Arg400Cys Het <i>de novo</i>	0,38	Crisi miocloniche Crisi di assenza	CC normale (50° perc.) Disturbo parossistico del movimento	Borderline RPM/DI	DC	15 anni	#PBC c.18 #PBC c.24
Controllo 1	<i>wt</i>	Normale		normale		no	1 anno	#8591 c.6 #8591 c.23
Controllo 2	<i>wt</i>	Normale				no	18 anni	#1983 c.3 #1983 c.10

Tab. 1 Caratteristiche cliniche e genetiche di due pazienti e due controlli e le linee di cellule staminali pluripotenti indotte derivate. I due pazienti mostrano un fenotipo severo (Paziente 1) e più lieve (Paziente 2) di Sindrome da Deficit di GLUT1. I controlli sono abbinati per età alla biopsia. Due cloni iPSCs per ciascun individuo sono stati già derivati e validati per i biomarker di pluripotenza.
CC: circonfenza cranica; DC: dieta chetogena; Het: eterozigote; iPSCs: induced pluripotent stem cells; perc.: percentile; RPM/DI: ritardo psicomotorio / disabilità intellettiva.

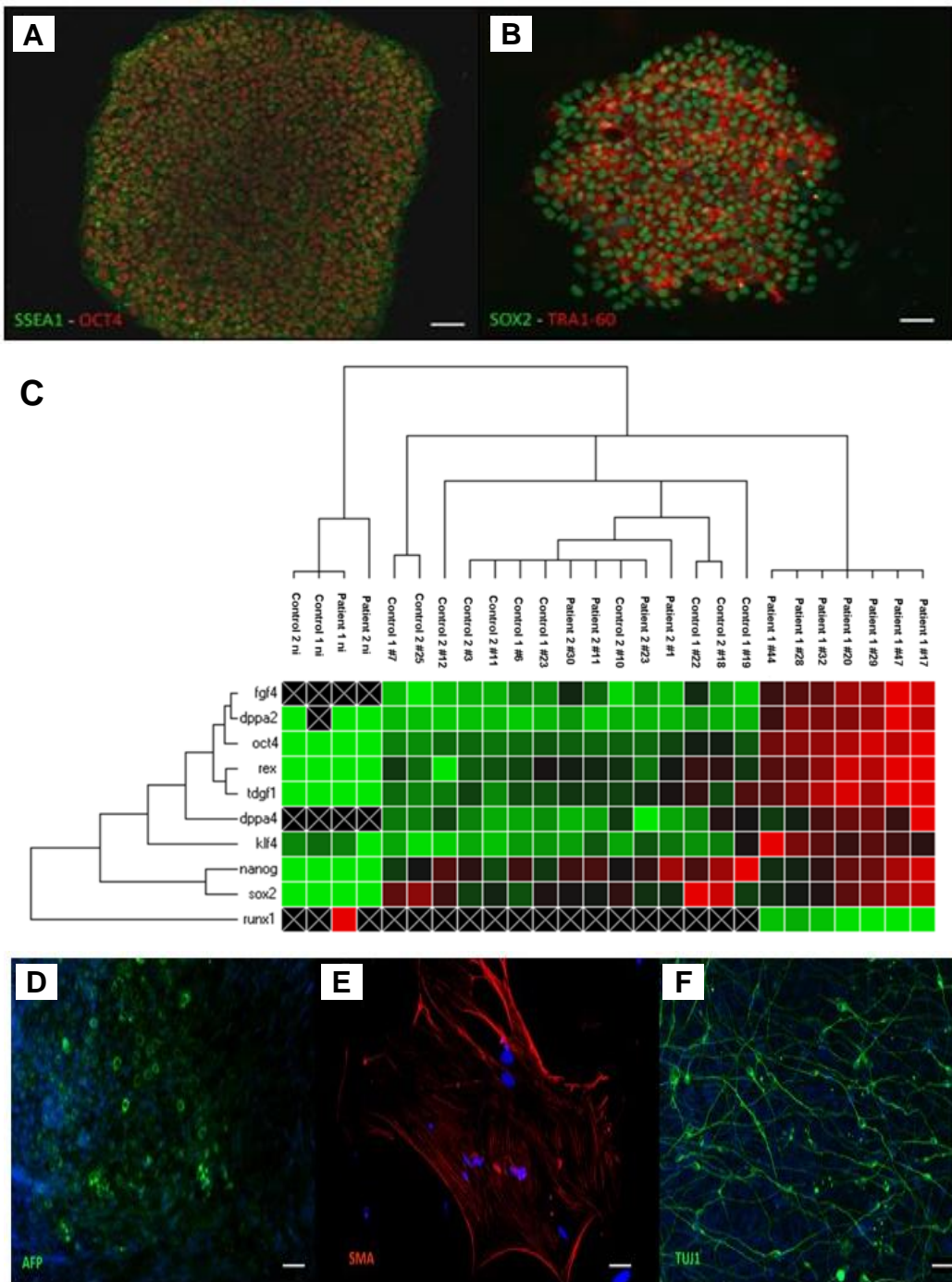


Fig. 5 Generazione di iPSCs da fibroblasti con CytoTune™-IPS 2.0 Reprogramming Kit.

(A,B) Espressione dei marcatori di pluripotenza Ssea4, Oct4, Sox2 e Tra-1-60 delle colonie iPSCs.

(C) Il profilo di espressione genica mostra un'incremento di espressione dei geni della pluripotenza nei cloni iPSCs rispetto alle cellule di partenza.

(D-F) L'espressione di marcatori dei foglietti embrionali (endoderma, AFP; mesoderma, alphaSMA; ectoderma, Tuj1/ β III-tubulin) mostra il potenziale delle iPSCs a differenziare nei 3 foglietti embrionali.

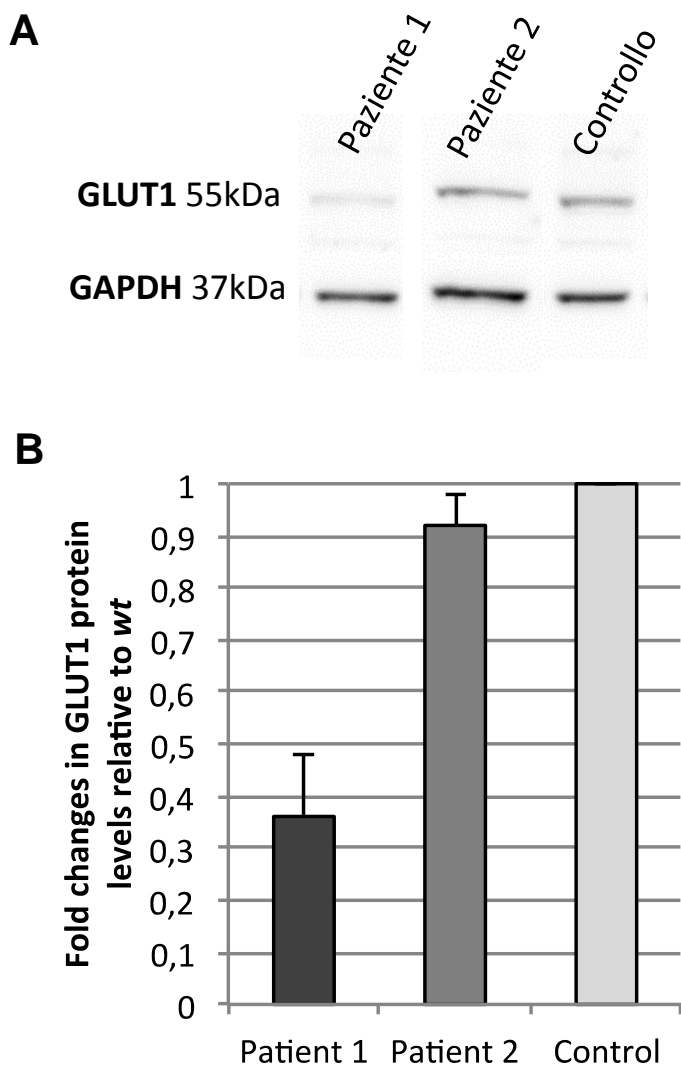


Figura 5. Livelli di proteina Glut1 nelle cellule iPSCs derivate da due pazienti e un controllo.

(A) Immagine rappresentativa di un Western blot di proteine totali da IPCSs derivate dal paziente 1 (severo), paziente 2 (lieve) e un controllo sano (vedi Tab. 1).

(B) Analisi densitometrica del Western blot: marcata riduzione di espressione di Glut1 nel paziente 1 (mutazione frameshift/troncante) rispetto al paziente 2 (mutazione missense) e al controllo sano.