

Report finale per 16° Bando pubblico per l'assegnazione di fondi a progetti di ricerca su:

“Epilessia farmaco-resistente:

1. Meccanismi di preavviso dell'insorgere di crisi epilettica.”
2. Meccanismi fisiopatologici, aspetti clinici e nuovi approcci terapeutici

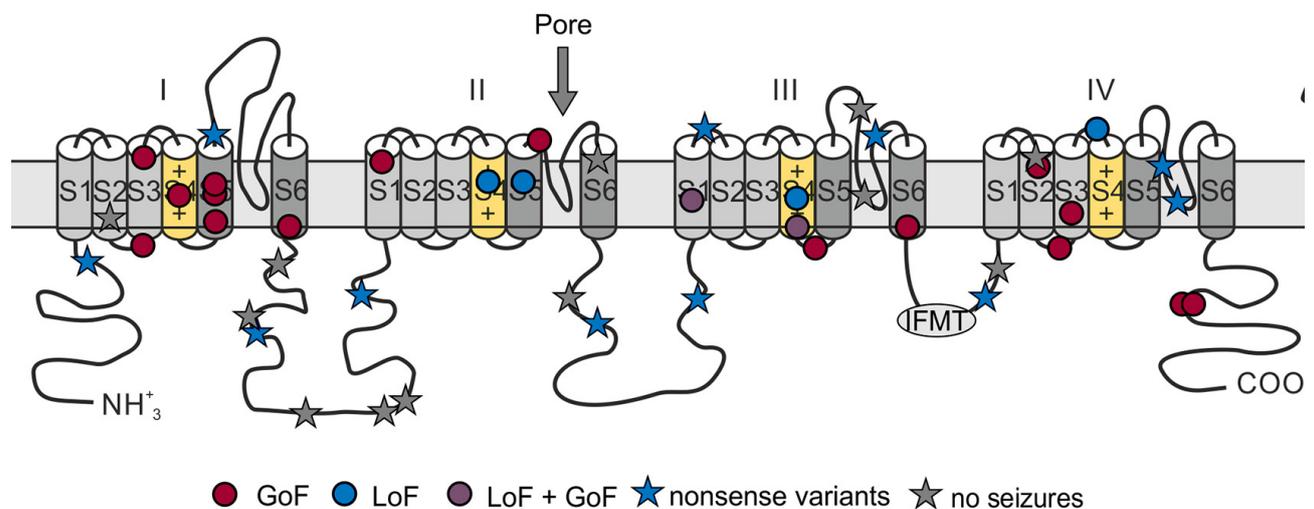
**Titolo:** Correlazioni genotipo-fenotipo nei disordini associati a SCN2A e potenziale trattamento personalizzato.

**Principal Investigator:** Dr. Loretta Ferrera; **Affiliation:** U.O.C. Genetica Medica, Istituto G. Gaslini di Genova

## Background.

*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, and *SCN8A* sono quattro geni omologhi che codificano per i canali al sodio voltaggio-dipendenti Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 e Nav1.6 che hanno un ruolo fondamentale nel sistema nervoso centrale (SNC) [1].

In particolare, il gene *SCN2A* codifica per la subunità- $\alpha$  del canale Nav1.2 [2], espressi nel segmento iniziale dell'assone [3]. La proteina canale Nav1.2 costituisce la subunità- $\alpha$  di circa 230 kDa che è composta di 24 segmenti transmembrana organizzati in quattro domini omologhi (Figura 1).



**Figura 1.** Rappresentazione schematica della topologia della subunità- $\alpha$  in cui sono mostrati i quattro domini omologhi (modificato da Duméniou *et al.*, 2017).

L'espressione della proteina nella corteccia cerebrale cambia durante lo sviluppo. In epoca prenatale e durante il primo anno di vita, il Nav1.2 è l'unica isoforma responsabile dell'inizio e della propagazione del potenziale d'azione [4]; in seguito è sostituito da altri canali al sodio voltaggio-dipendenti (Nav1.1 e Nav1.6), ma mantiene la specifica funzione di propagare il potenziale d'azione dall'assone verso corpo cellulare.

Quindi le varianti patogenetiche in *SCN2A* sono state associate a diversi disordini del neurosviluppo tra cui encefalopatia epilettica (DEE), disabilità intellettiva (ID) e disordini dello spettro

autistico (ASD). Classicamente, le mutazioni con perdita di funzione (LOF) sono associate a ASD e ID, mentre le varianti che causano un guadagno di funzione (GOF) variants hanno una correlazione con il fenotipo epilettico, che suggerisce un uso terapeutico di bloccanti dei canali al sodio, come la carbamazepina (CBZ).

In passato, gli studi funzionali sui canali al sodio espresso nel SNC sono stati difficoltosi perchè non era possibile ottenere sempre una quantità e una qualità di cDNA sufficiente per essere utilizzato con le normali tecniche di biologia molecolare. Recentemente, Dekeyser e collaboratori hanno identificato nel gene *SCN2A* la presenza di un elemento criptico simile a un promotore batterico che causa effetti tossici nelle cellule batteriche; hanno, quindi, inserito una piccola sequenza intronica per interrompere la sequenza tossica nel DNA del canale [5].

La nostra ipotesi è che i diversi effetti funzionali causati da mutazioni specifiche sul canale possono essere responsabili di fenotipi con risposte inattese ai farmaci comunemente usati. Capire il meccanismo pato-fisiologico potrebbe migliorare il trattamento dei pazienti alla luce di un approccio personalizzato alla terapia. La nostra proposta è di caratterizzare, in sistemi eterologhi, specifiche varianti patogenetiche di *SCN2A* che non rispondono in maniera attesa ai farmaci, anche allo scopo di identificare il composto più attivo per il paziente e indirizzarlo a un trattamento personalizzato.

Quindi, abbiamo valutato l'espressione e l'effetto funzionale della variante patogenetica di *SCN2A*: c.4976C>T (p.A1659V), trovata in stato di mosaico in due bambini che non rispondevano al trattamento con (CBZ).

## **1- Obiettivi generali, scopi specifici e motivazione.**

### **Obiettivi generali**

Il principale obiettivo di questo progetto è correlare gli effetti delle varianti nel gene *SCN2A* al fenotipo del paziente e identificare il composto più attivo per il paziente e indirizzarlo a un trattamento personalizzato.

La possibilità di caratterizzare in sistemi eterologhi specifiche varianti patogenetiche di *SCN2A* utilizzando il plasmide ottimizzato ci permette di ottenere velocemente il cDNA mutato per valutare possibili alterazioni nelle proprietà biofisiche e nell'espressione del canale in modo da chiarire il ruolo della variante sul fenotipo di uno specifico paziente.

### **Obiettivi specifici**

1 Scoprire il meccanismo patofisiologico di ogni variante patogenetica di *SCN2A*. Il nostro obiettivo è correlare l'effetto LOF o GOF al fenotipo del paziente.

2 Per applicare, successivamente alla determinazione del tipo di mutazione, alla proteina mutata il composto migliore per lo specific paziente.

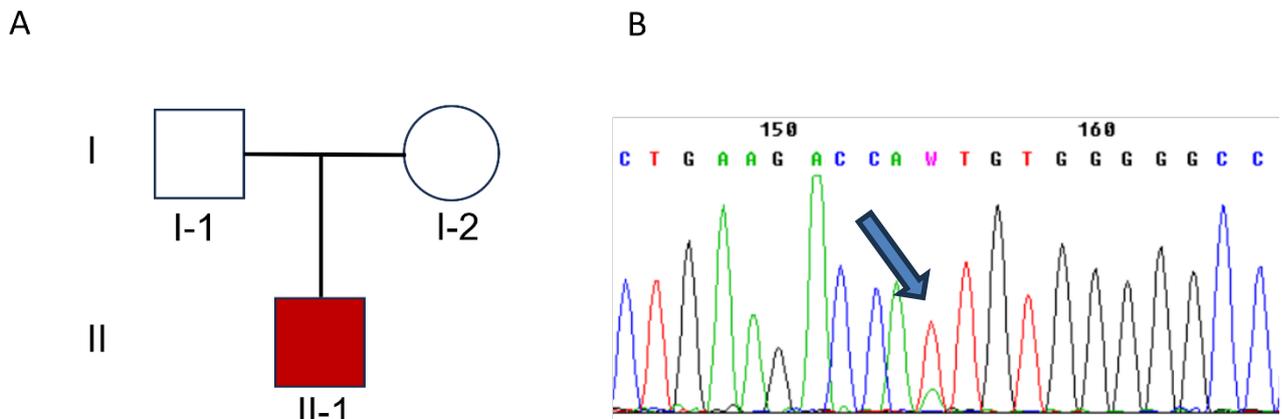
## **Risultati**

Il presente report mostra gli studi che sono stati condotti durante l'anno del progetto in accord con I nostril obiettivi.

## WP1: Reclutamento e caratterizzazione clinica dei pazienti.

In quest'anno abbiamo arruolato due pazienti pediatriche con epilessia correlata a *SCN2A*, ma non responsivi ai farmaci.

Il primo paziente è un bambino di 5 anni nato da genitori sani e non consanguinei (Figure 2A). L'esordio della malattia è avvenuto a un giorno di vita. In seguito, ha mostrato disabilità intellettiva severa e ipotonia. I bloccanti dei canali al sodio (fenitoina, carbamazepina e lamotrigine) sono stati usati nel sospetto che la variante fosse GOF, ma non hanno avuto effetto clinico. La tecnica di NGS ha identificato la variante missenso *de novo* nel gene *SCN2A* c.710T>A (p.I237N) nel nostro probando, la variante è stata confermata da sequenziamento in Sanger. Nonostante la variante sia stata identificata in stato di mosaico nei linfociti, (Figure 2B). L'aminoacido Ile237 è localizzato nel loop intracellulare tra i segmenti S4 e S5 del primo dominio della proteina.



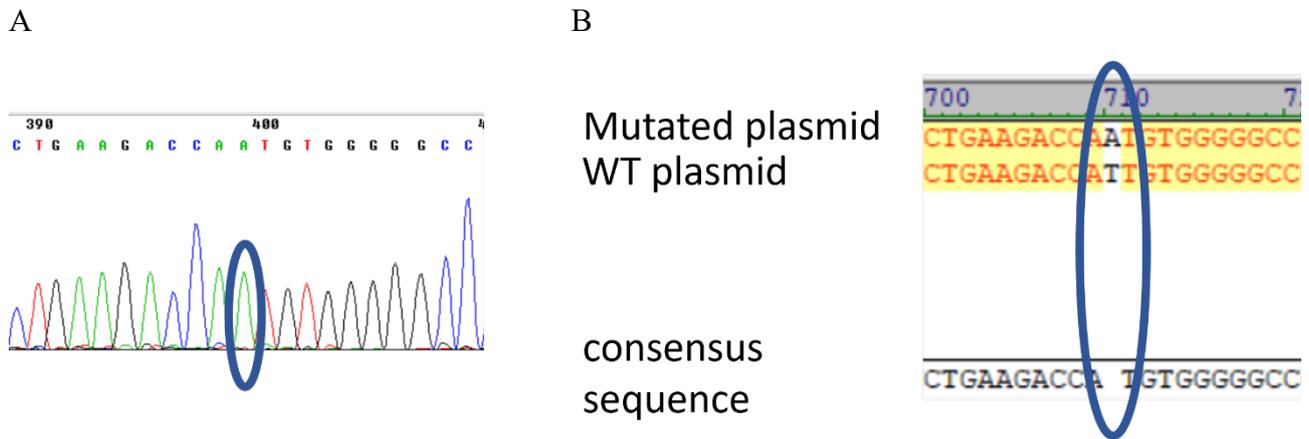
**Figure 2.** A) Albero genealogico del paziente. Il simbolo rosso indica il nostro probando affetto, i simboli vuoti rappresentano i soggetti non affetti. B) Sequenziamento Sanger dell'esone 7 del gene *SCN2A* del paziente1, la freccia blu indica la variante c.710T>A.

Il secondo paziente è un bambino di 4 anni nato da genitori sani e non consanguinei. Gli spasmi epilettici sono comparsi a pochi giorni di vita. Mostra disabilità intellettiva, episodi di assenza e problemi del movimento. Il trattamento con bloccanti del sodio, come la CBZ, è risultato inefficace. L'analisi NGS ha rilevato la variante *de novo* di *SCN2A* c.685T>A (p.S229T) nel nostro probando, la variante è stata validata in sequenziamento Sanger. L'aminoacido Ser229 è localizzato nel segmento transmembrane S4 del primo dominio.

## WP2: Preparazione del cDNA mutato

Il plasmide ottimizzato pIR-CMV-SCN2A-Variant-1-IRES-mScarlet (Addgene plasmid RRID: Addgene162279), che codifica per Nav1.2 è stato usato per introdurre le mutazioni di interesse [5] tramite mutagenesi sito-specifica usando il kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). Gli oligonucleotidi contenenti le mutazioni al centro della sequenza sono stati così disegnati: forward, 2A-I237N-F 5'CCTGAAGACCAATGTGGGGGCC3' e reverse 2A-I237N-R 5'GGGCCCCACATTTGGTCTTCAGG3' per la variante p.I237N e forward, 2A-S229T-F 5'GCATTGAAAACAATTACAGTCATTCCAGGCC3' e reverse 2A-S229T-R 5'GGCCTGGAATGACTGTAATTGTTTTCAATGC3' per la variante p.S229T. La sequenza

corretta del plasmide mutato p.I237N è stata controllata tramite sequenziamento Sanger (Figure 3 A e B).

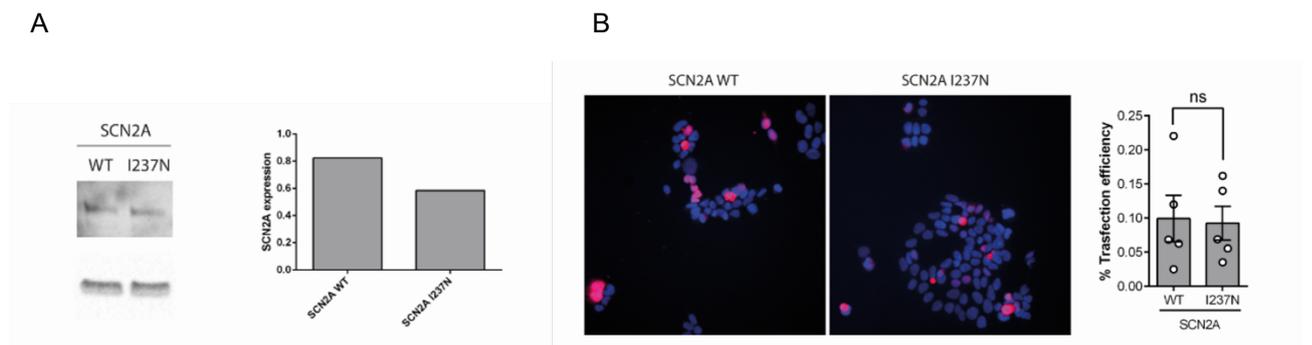


**Figure 3. Sequenziamento Sanger del plasmide mutato I237N.** A) Il cerchio blu indica la presenza della sola A nel plasmide mutato. B) Confronto tra le sequenze del plasmide mutato e di quello WT, come indicato.

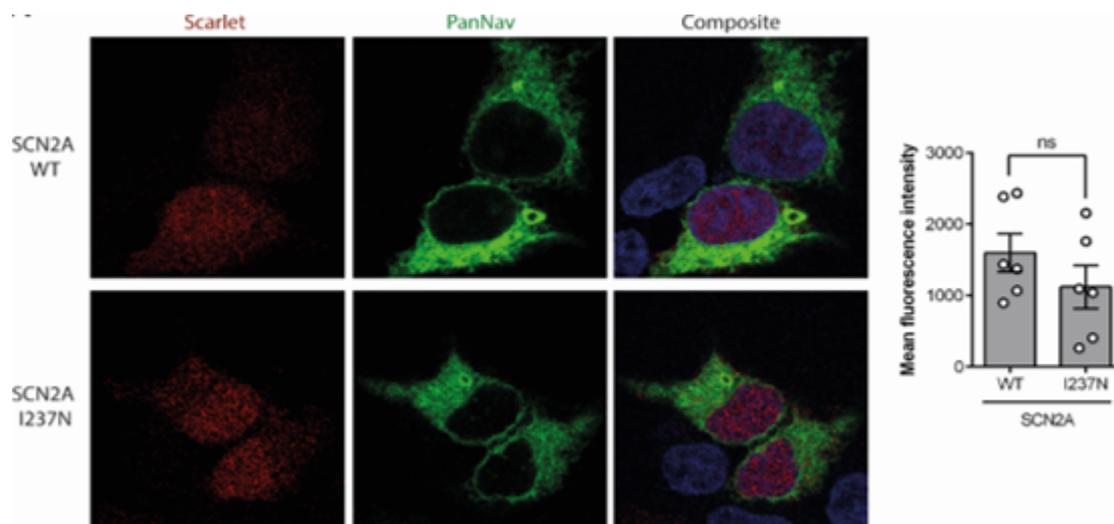
### WP3: Esperimenti funzionali e espressione della proteina.

Ad ora, abbiamo analizzato i cambiamenti del profilo di espressione e le proprietà biofisiche del mutante del Nav1.2 I237N attraverso la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell configuration e tramite western blot l'analisi di immagini. Abbiamo analizzato le cellule HEK293 che esprimono il canale mutato da solo e abbiamo confrontato i risultati con quelli ottenuti dall'espressione del canale WT.

Abbiamo dimostrato che la variante I237N non modifica l'espressione del canale Nav1.2 (Figure 4).

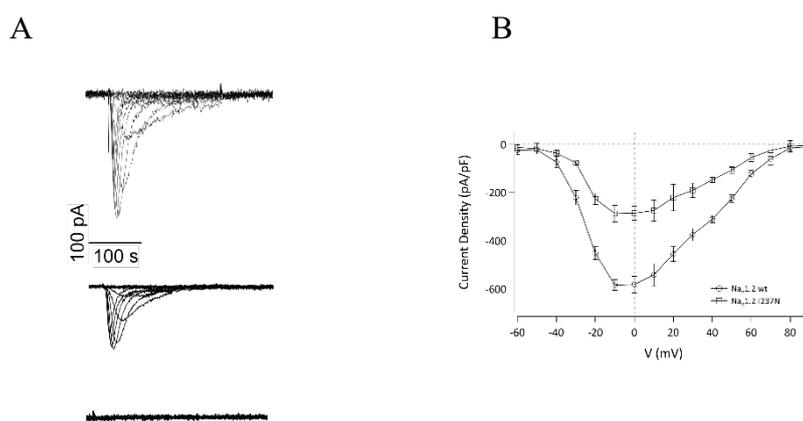


**C**



**Figure 4: La variante I237N non modifica l'espressione del canale.** A) *Sinistra*: Lisati di proteina estratti da cellule HEK293 trasfettate con WT o I237N Nav<sub>v</sub>1.2 sono stati analizzati mediante western blotting usando l'anticorpo anti-PanNav. *Destra*: Analisi densitometrica delle bande immuno-reattive. GAPDH è stata usata come controllo B) Immagini rappresentative di cellule HEK293 trasfettate con Nav<sub>v</sub>1.2 WT o mutato e marcato con l'anticorpo anti-PanNav (verde). La colorazione DAPI è stata usata per visualizzare i nuclei (blu). Scala 50 µm. C) *Sinistra*: Immagini rappresentative ottenute al microscopio confocale di cellule HEK293 trasfettate con Nav<sub>v</sub>1.2 WT o mutato e marcato con l'anticorpo anti-PanNav (verde). Il DAPI è stato usato per marcare i nuclei (Blu).

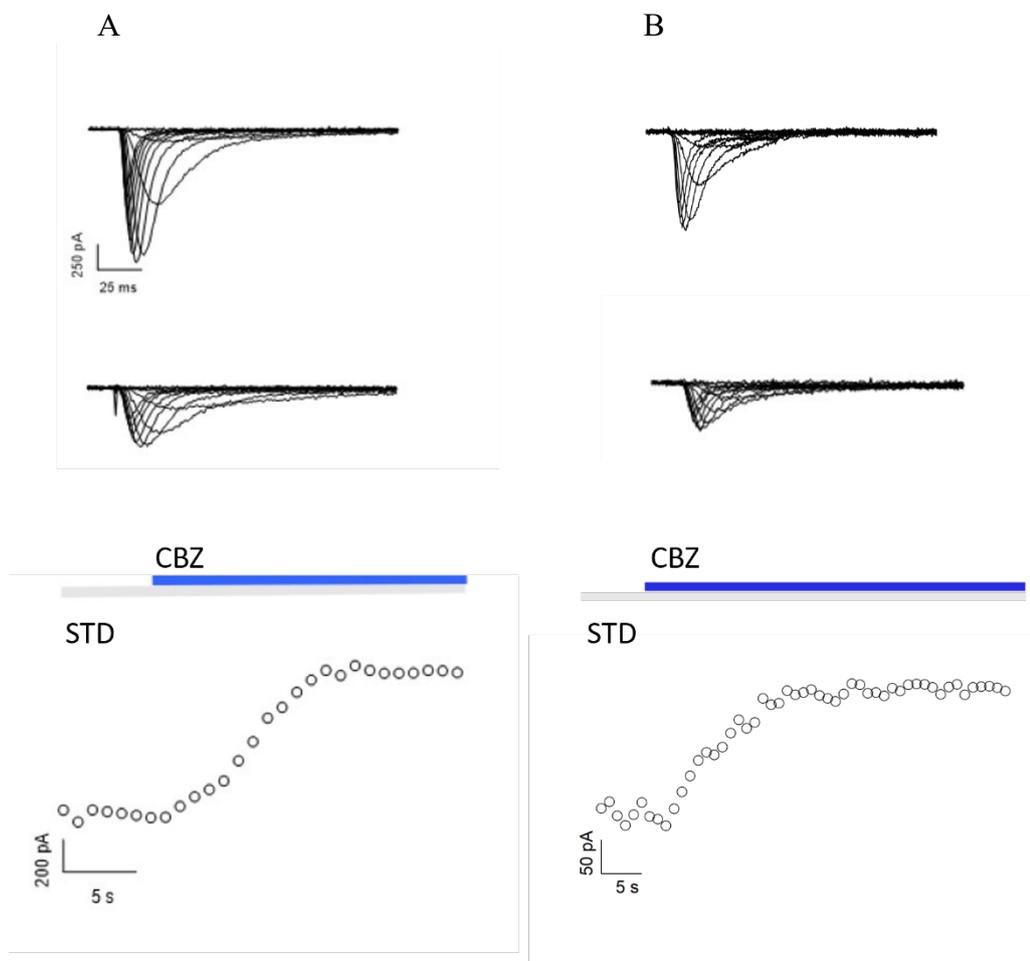
La variante I237N modifica l'attività del canale Nav<sub>v</sub>1.2. Abbiamo studiato le sue proprietà funzionali attraverso la tecnica del patch-clamp in configurazione whole-cell in cellule HEK293 transientemente trasfettate con il canale WT o mutato. Abbiamo osservato una forte riduzione della corrente entrante al sodio (Figure 5 A). Il mutante I237N mostra una densità di corrente con una riduzione di circa il 50% rispetto a quella del canale (Figure 5B).



**FIGURE 5: La variante I237N mostra una corrente al Na<sup>+</sup> più piccola rispetto al canale nativo.** A) Tracce rappresentative di correnti al sodio ottenute da cellule HEK293 trasfettate con il plasmide WT (pannello in alto), con il plasmide mutato (pannello centrale) o con il solo gene reporter CD8 (pannello in basso). B) Media dell'intensità di corrente rispetto al potenziale applicato per le cellule HEK293 trasfettate con il canale nativo (Cerchi e linea piena) or mutato (Quadrati e linea tratteggiata) come indicato.

#### WP4: Identificazione di composti attivi sulle specifiche varianti di SCN2A

In questo studio, abbiamo studiato l'effetto dell'CBZ sul canale Nav1.2 s usando la tecnica del patch-clamp su cellule HEK293 che esprimono il canale WT o mutato per confermare l'inefficacia del trattamento per quella specifica mutazione studiata. LA somministrazione esterna di 100  $\mu\text{M}$  CBZ determina una significativa riduzione dell'ampiezza della corrente sia nei controlli che nelle cellule esprimenti il canale con la mutazione I237N (Figura 6 A e B). Questo è un punto importante perchè può spiegare l'inefficacia del trattamento con CBZ nel paziente: il bloccante del canale al sodio determina una riduzione della funzione della proteina in una proteina mutata che mostra già una ridotta attività, peggiorando così il fenotipo clinico.



**Figure 6. Il bloccante dei canali al sodio CBZ cambia la corrente del mutante I237N.** A) Effetto dell'applicazione di 100  $\mu\text{M}$  CBZ nella soluzione di lavoro su cellule HEK293 esprimenti il canale WT. B) Effetto dell'applicazione di 100  $\mu\text{M}$  CBZ nella soluzione di lavoro su cellule HEK293 esprimenti il canale mutato.

## CONCLUSIONI

L'identificazione dell'effetto funzionale: perdita di funzione (LOF) o guadagno di funzione (GOF) causato dalla variante studiata consente l'applicazione diretta sulla proteina mutante di composti già utilizzati in terapia la cui azione specifica sul canale NaV1.2 è nota per valutarne l'effetto in vitro come attivatore per mutazioni LOF o come inibitore nel caso di varianti GOF. Il nostro obiettivo è suggerire un nuovo approccio terapeutico mutazione-specifico per il paziente portatore della mutazione al fine di definire un trattamento personalizzato. I nostri risultati evidenziano il significativo impatto fisio-patologico della variante I237N sulla funzione neuronale e danno ragione del fenotipo grave sul paziente affetto. Inoltre, forniamo una correlazione genotipo-fenotipo che può guidare le scelte di trattamento farmacologico e potenzialmente avere un impatto sulle strategie neuro-evolutive dei pazienti con disturbi correlati a SCN2A. Ora, stiamo caratterizzando il profilo di espressione e le proprietà funzionali dell'altra mutazione SCN2A S229T. Il nostro studio ha dato risultati importanti sulla caratterizzazione farmacologica di varianti rare e private, dimostrando l'utilità di sapere come la mutazione impatta sulla funzione della proteina per scegliere la terapia più efficace. Purtroppo, in questo anno di finanziamento, nonostante la collaborazione dell'associazione delle famiglie SCN2A, non è stato possibile arruolare più di due pazienti con i criteri di selezione. Inoltre, questi pazienti sono giunti alla nostra attenzione anni dopo la diagnosi e manifestano sintomi molto gravi con grave ritardo neuro-evolutivo. Sarebbe opportuno conoscere la risposta del paziente SCN2A ai farmaci somministrati per avviare rapidamente i test funzionali in vitro.

## Bibliografia

- [1] Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 2003;4(3):207.
- [2] Bender KJ, Trussell LO. The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:249-65.
- [3] Kole MH, Stuart GJ. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron.* 2012 Jan 26;73(2):235-47.
- [4] Spratt PWE, Ben-Shalom R, Keeshen CM, Burke KJ Jr, Clarkson RL, Sanders SJ, Bender KJ. The Autism-Associated Gene Scn2a Contributes to Dendritic Excitability and Synaptic Function in the Prefrontal Cortex. *Neuron.* 2019 Aug 21;103(4):673-685.e5.
- [5] DeKeyser JM, Thompson CH, George AL Jr. Cryptic prokaryotic promoters explain instability of recombinant neuronal sodium channels in bacteria. *J Biol Chem.* 2021 Jan-Jun;296:100298.