



Il trattamento con oligonucleotidi antisenso riabilita l'espressione della proteina UBE3A e le funzioni neurocognitive in un modello murino della sindrome di Angelman

Di CLAUDIA MILAZZO – Ricercatrice FROM all'Erasmus MC di Rotterdam

La sindrome di Angelman (AS) è causata da fattori genetici, che portano alla perdita totale della funzione della proteina UBE3A, importante per lo sviluppo celebrale. Mutazioni nella copia materna del gene *UBE3A* sono tra le principali cause che portano alla perdita di questa proteina. Inoltre, tutti i pazienti con AS portano almeno una copia di *UBE3A* paterno non mutata, ma, come avviene normalmente nell'uomo, esclusivamente nei neuroni la *UBE3A* paterna è silenziata da un lungo RNA non codificante (*UBE3A-ATS*). Di conseguenza, a causa delle mutazioni sull'allele materno e del silenziamento dell'allele paterno, i pazienti con AS perdono del tutto la proteina UBE3A nei neuroni.

In questo studio abbiamo valutato l'efficacia di oligonucleotidi antisenso (ASO) per il trattamento della AS. Gli ASO sono brevi sequenze di DNA o RNA in grado di legare in maniera specifica un RNA e bloccarne la trascrizione o traduzione o modificarne il pattern di splicing. Queste molecole sembrano particolarmente efficaci contro alcune malattie neurologiche come SMA, SLA o Alzheimer. In uno studio pubblicato nel 2015, il gruppo del Prof. Dr. Beaudet ha dimostrato che attraverso la somministrazione intracerebroventricolare di specifici ASO si può ottenere il desilenziamento della *UBE3A* paterna in topi adulti e quindi il ripristino della funzionalità della proteina UBE3A. Tuttavia, in questo studio, il trattamento con ASO non si è mostrato efficace nella correzione dei comportamenti neurocognitivi tipici della AS, probabilmente perché i livelli di espressione raggiunti della UBE3A sono stati troppo bassi e/o perché il farmaco è stato somministrato quando i topi erano già in età adulta. Come infatti dimostrato dalla Dr.ssa Monica Sonzogni, una scienziata del nostro gruppo, i comportamenti neurocognitivi legati alla AS, nei topi,

possono essere trattati esclusivamente se l'espressione del gene *UBE3A* viene riattivata durante i primi giorni di vita.

Nel nostro studio, abbiamo generato nuovi ASO che sono stati testati prima *in-vitro*, in cellule cerebrali murine, e poi *in-vivo*, in un modello murino della AS. Gli ASO sono stati somministrati per via intra-cerebroventricolare in topi AS al primo giorno o a tre settimane dalla nascita. In entrambi i gruppi di età, abbiamo osservato che in più aree del cervello il farmaco è stato efficace per il ripristino della proteina UBE3A. Il farmaco raggiunge livelli massimi di efficacia una o due settimane dopo l'iniezione e il suo effetto diminuisce lentamente nel tempo. Abbiamo successivamente studiato la relazione tra il ripristino della espressione di UBE3A e il comportamento degli animali. Il trattamento con ASO è stato efficace per il trattamento dell'epilessia e comportamenti legati all'ansia e alla depressione. Abbiamo anche osservato un miglioramento notevole delle funzioni motorie ed un leggero miglioramento nel campo dell'apprendimento e della memoria (quest'ultimo comportamento non è risultato significativamente migliorato nei topi AS trattati con ASO e quindi tale risultato deve essere interpretato con maggiore prudenza). La somministrazione del farmaco non è stata sufficiente, in questo studio, per migliorare comportamenti innati e ripetitivi. Poiché studi precedenti nel nostro laboratorio hanno mostrato che l'epilessia può essere trattata anche se il gene UBE3A viene reintegrato in topi giovani, abbiamo testato l'efficacia dell'ASO anche in topi AS di tre settimane. Anche in questo caso, la somministrazione dell'ASO al cervello è stata altamente efficace per il trattamento dell'epilessia.

In conclusione, questo studio dimostra che la somministrazione intracerebrale di ASO è molto efficace per il ripristino della proteina UBE3A ed è in grado di migliorare alcuni comportamenti neurocognitivi legati alla AS nei topi. Riteniamo pertanto che ci siano evidenze sperimentali adeguate per un trattamento a base di ASO in trials clinici nell'uomo.

Nel passaggio alla sperimentazione clinica nell'uomo dobbiamo tenere conto che il nostro studio ha 3 limiti principali. Primo: l'ASO che è stato impiegato in questo studio è specifico per la sequenza murina dell'*Ube3a-ATS* (il target dell'ASO), dunque nuovi ASO specifici per la sequenza umana dell'*UBE3A-ATS* devono essere sviluppati e testati nei clinical trials. Secondo: in questo studio non è stato possibile valutare importanti deficit neurocognitivi umani che potrebbero essere migliorati dopo il trattamento con ASO come ritardo mentale, disturbo del sonno e assenza del linguaggio. Terzo: non è ancora chiaro quanto l'età critica per il trattamento nei topi (che per la maggior parte dei fenotipi si

estende dallo sviluppo embrionale ai primi giorni di vita) corrisponda a quella nell'uomo. Occorre anche considerare che un trattamento a base di ASO dovrebbe essere continuato probabilmente per tutta la vita, dal momento che, come abbiamo osservato in questo studio, l'effetto del farmaco diminuisce nel tempo.

La maggior parte delle domande lasciate irrisolte in questo studio, saranno molto probabilmente chiarite nei clinical trial, cominciati nel 2020 (GTX-102 sponsorizzato dalla GeneTX Biotherapeutics and RO7248824 sostenuto dalla Hoffmann- La Roche).
