

## Poster P.07.41

### REGULATION OF ALTERNATIVE SPLICING OF VOLTAGE-GATED CA<sup>2+</sup> CHANNELS BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING AS POTENTIAL GENETIC THERAPY FOR EPISODIC ATAXIA TYPE 2

Jaudon F.<sup>[1]</sup>, Fruscione F.<sup>[2]</sup>, Thalhammer A.<sup>[1]</sup>, Baldassari S.<sup>[2]</sup>, Zara F.<sup>[2]</sup>, Cingolani L.\*<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università di Trieste ~ Trieste ~ Italy

**Aims and objectives:** We aim at up-regulating the splice isoforms of CaV2.2 that are most efficient in supporting synaptic transmission, thus compensating for CaV2.1 deficiency, which characterizes episodic ataxia type 2 (EA2).

To this end, we will use genome editing to regulate alternative splicing of CaV2.2 in mouse models of EA2 and in induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons carrying EA2 mutations.

**Background/Rationale:** In EA2, loss-of-function mutations in CaV2.1 induce a compensatory up-regulation of CaV2.2 and CaV2.3. Despite this, the up-regulated channels are unable to substitute fully for CaV2.1, likely because they are not as efficient as CaV2.1 in supporting synaptic transmission.

We have recently found that the efficiency of CaV2.1 and CaV2.2 in supporting synaptic transmission is regulated by a splicing event generating two alternative isoforms for each channel (EFa and EFb). In the brain, the relative abundance of the two isoforms differs for presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels: expression of EFa -the isoform more efficient in supporting synaptic transmission- is high for CaV2.1 but low for CaV2.2 and CaV2.3.

We reasoned that CaV2.2 (and possibly CaV2.3) would substitute more efficiently for CaV2.1 if the relative abundance of their EFa isoforms could be increased.

**Research design:** We will (i) use CRISPR/Cas9-mediated genome editing to shift the balance between EFa and EFb isoforms in favor of EFa in CaV2.2, (ii) assess to what extent this rescues synaptic defects and ataxic-like behaviors in CaV2.1-deficient mice, and (iii) electrophysiological defects in iPSC-derived neurons carrying EA2 mutations.

**Anticipated output:** The overall purpose is to develop a new gene therapy approach for EA2. Because we take advantage of a general up-regulation of CaV2.2, rather than targeting individual mutations in CaV2.1, our approach is potentially suitable for counteracting the effects of all the mutations (>80) identified in EA2 patients.

Regolazione dello 'splicing' alternativo dei canali Ca<sup>2+</sup> mediante 'genome editing' di tipo CRISPR/Cas9 come potenziale terapia genica per l'ataxia episodica di tipo 2

**Scopi e obiettivi:** Scopo di questo progetto è aumentare l'espressione delle isoforme di 'splicing' del canale Ca<sup>2+</sup> CaV2.2 che sono più efficienti nel supportare la trasmissione sinaptica, compensando così il deficit di CaV2.1, che causa ataxia episodica di tipo 2 (EA2).

A tal fine, useremo la tecnica del 'genome editing' per regolare lo 'splicing' alternativo di CaV2.2 in modelli murini di EA2 e in neuroni derivati da cellule staminali pluripotenti (iPSCs) con mutazioni che causano EA2.

**Background/Motivazione:** In EA2, mutazioni 'loss-offunction' in CaV2.1 inducono un aumento compensativo dell'espressione di CaV2.2 e CaV2.3. Nonostante ciò, CaV2.2 e CaV2.3 non sono in grado di sostituire CaV2.1, probabilmente perché non sono così efficienti come CaV2.1 nel supportare la trasmissione sinaptica.

Abbiamo recentemente scoperto che l'efficienza di CaV2.1 e CaV2.2 nel supportare la trasmissione

sinaptica è regolata da un evento di 'splicing' che genera due isoforme alternative per ciascun canale (EFa ed EFb). Nel cervello, l'abbondanza relativa delle due isoforme differisce per i canali Ca<sup>2+</sup>: l'espressione di EFa - l'isoforma più efficiente nel supportare la trasmissione sinaptica - è alta per CaV2.1 ma bassa per CaV2.2 e CaV2.3.

Abbiamo ipotizzato che CaV2.2 (e possibilmente CaV2.3) potrebbero sostituire in modo più efficiente CaV2.1 se fosse possibile aumentare l'espressione delle loro isoforme di tipo EFa.

Esperimenti: (i) Utilizzeremo la tecnica del 'genome editing' di tipo CRISPR/Cas9 per cambiare l'abbondanza relativa delle isoforme EFa ed EFb a favore di EFa in CaV2.2 e (ii) analizzeremo quanto questa manipolazione recupera i difetti sinaptici e comportamenti di tipo atassico in topi che non esprimono il canale CaV2.1, e (iii) difetti elettrofisiologici in neuroni derivati da cellule iPSCs con mutazioni EA2.

Risultati previsti: Scopo generale di questo progetto è mettere a punto un nuovo approccio di terapia genica per EA2. Poiché sfruttiamo un aumento dell'espressione di CaV2.2, che avviene in tutti i casi di EA2, piuttosto che correggere singole mutazioni in CaV2.1, il nostro approccio è potenzialmente adatto a contrastare gli effetti di tutte le mutazioni (>80) identificate in pazienti con EA2.

Thalhammer, A., Contestabile, A., Ermolyuk, Y.S., Ng, T., Volynski, K.E., Soong, T.W., Goda, Y., and Cingolani, L.A. (2017). Alternative Splicing of P/Q-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Shapes Presynaptic Plasticity. *Cell Rep* 20, 333-343.

Atassia episodica tipo II

Coordinator: Lorenzo Cingolani

Partner: Federico Zara

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2020

**Telethon Project (nr):**

GGP19181

**Disease Name:**

Episodic Ataxia Type II

**Keywords:**

Alternative splicing, Gene editing, Ataxia