



Genetic therapies for STXBP1 disorders

Ben Prosser, Ph.D

September 17th, 2018



Charlene:

Guten Tag und guten Abend. Ich bin Charlene Son Rigby, Präsidentin und Mitbegründerin der STXBP1-Stiftung und freue mich, unsere Webinar-Reihe zur Forschung fortzusetzen. Diese Webinar-Reihe ist Teil des STXBP1-Bewusstseins-Monats, der den ganzen September über stattfindet. Heute begrüßen wir Ben Prosser von der University of Pennsylvania und Ganna Balagura von der University of Genua. Ben Prosser, PhD, ist Assistenzprofessor für Physiologie an der University of Pennsylvania Perelman School of Medicine. Als er an der U Penn begann, konzentrierte sich **Dr. Prosser** auf Herzerkrankungen. Er expandierte schnell, um auch Störungen der Neuroentwicklung zu untersuchen, als er **Elternteil einer Tochter mit STXBP1-Enzephalopathie** wurde. Er ist ein wahrhaft engagierter Kreuzritter für eine Heilung von STXBP1-Kindern. Dr. med. Ganna Balagura wurde an der Universität von Genua zum Arzt ausgebildet. Sie entwickelte ein tiefes Interesse an Neurowissenschaften und Genetik, was sie zu ihrer heutigen Doktorarbeit in pädiatrischer Neurologie am "G. Gaslini"-Kinderkrankenhaus in Genua führte. Ich hatte das Glück, Ganna im vergangenen Dezember auf der Konferenz der American Epilepsy Society zu treffen, wo die Grundlage der Arbeit, die sie heute vorstellen wird, ihr eine blaue Schleife einbrachte und sie in der Konferenzsitzung "Hot Topics for Young Investigators in the Epilepsy Community" präsentierte.

Today's Virtual Session

Webinar Series

ASO AND GENETIC THERAPIES AS A THERAPEUTIC APPROACH FOR STXBP1 ENCEPHALOPATHY

• Thursday, 17 September @ 12 pm ET

• Speakers

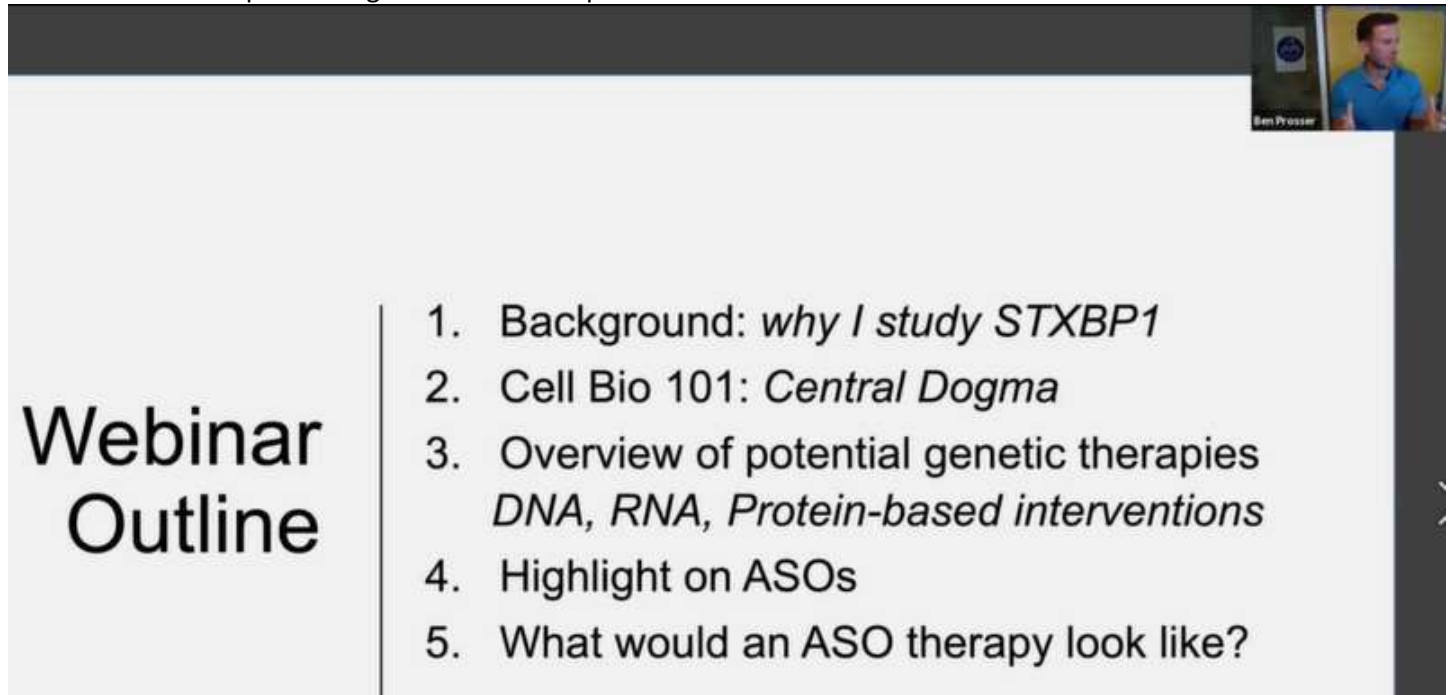
- Ben Prosser, PhD, University of Pennsylvania
- Ganna Balagura, MD, University of Genoa



Bevor wir also mit den heutigen Präsentationen beginnen, werden Sie sicher Fragen an unsere Redner haben. Um eine Frage zu stellen, klicken Sie bitte auf die Frage-und-Antwort-Schaltfläche am unteren Bildschirmrand. Geben Sie dann eine Frage in das Frage- und Antwort-Fenster ein. Wir werden die Fragen bis zum Ende aller Präsentationen aufbewahren. Und nun übergebe ich die Präsentation an Ben.

Ben:

Guten Morgen. Guten Tag allerseits. Könnt ihr meinen Bildschirm sehen, meinen Moderator-Modus? Ja. Alles klar. Danke, Charlene, für die Einleitung. Und danke, dass Sie mich in dieses Webinar aufgenommen haben. Es war großartig bis jetzt. Wenn Sie also die ersten paar Präsentationen mitverfolgt haben, haben wir etwas über die klinische Präsentation bei unseren Kindern gelernt, über das phänotypische Spektrum, ein wenig über die zugrunde liegende Genetik, die dieser Erkrankung zugrunde liegt. Wir lernten über naturwissenschaftliche Studien, ein wenig über die Suche nach neuen EEG-Biomarkern und über die Verhage-Gruppe, das gab uns einen Einblick in einige der innovativen, grundlegenden Wissenschaften, die zum Verständnis der STXBP1-Biologie betrieben werden. Und so wollte ich das heute ergänzen und mich wirklich mehr auf die translationale Wissenschaft konzentrieren, auf die Entwicklung neuer Therapien, mit einem besonderen Schwerpunkt auf genetischen Therapien für STXBP1.



Webinar Outline

1. Background: *why I study STXBP1*
2. Cell Bio 101: *Central Dogma*
3. Overview of potential genetic therapies
DNA, RNA, Protein-based interventions
4. Highlight on ASOs
5. What would an ASO therapy look like?

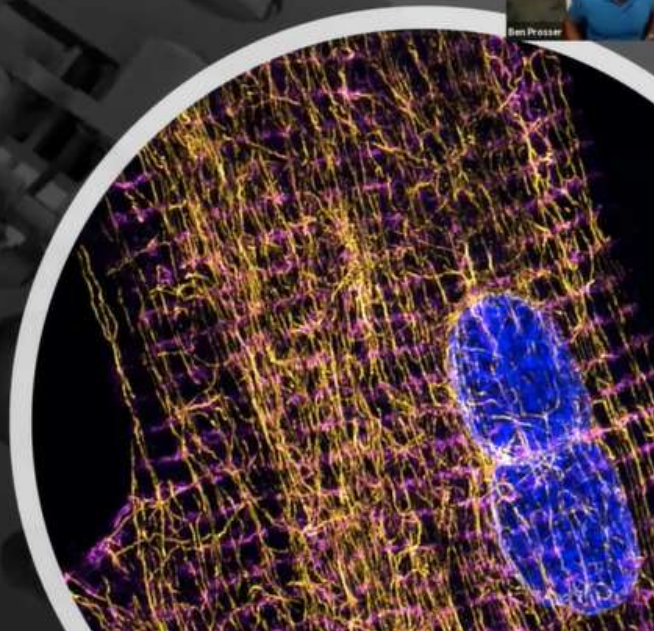
Um also zunächst die Voraussetzungen zu schaffen, beginne ich mit ein paar Hintergrundinformationen und werde darüber sprechen, warum ich STXBP1 studiere. Wir machen eine kleine Auffrischung der Zellbiologie über das zentrale Dogma, das wir verwenden werden, um unser Gespräch über verschiedene Therapien zu gestalten. Und ich werde einen Überblick auf hohem Niveau über verschiedene potenzielle genetische Therapien geben, die an der DNA auf der RNA- oder auf der Proteinebene eingreifen könnten, um STXBP1-Erkrankungen zu bekämpfen. **Ich werde die Arbeit hervorheben, die wir auf dem Gebiet der Antisense-Oligonukleotide oder ASOs leisten. Und dann zum Schluss noch ein bisschen darüber sprechen, wie eine ASO-Therapie für unsere Kinder eines Tages praktisch aussehen könnte.** In Ordnung, also ein bisschen Hintergrundinformationen über mich.

Ich habe mein Labor in Penn im Sommer 2014 eröffnet. Ich bin dort Assistenzprofessor für Physiologie sowie stellvertretender Direktor des Penn Muscle Institute, und ich bin Direktor des Transatlantischen Netzwerks Leducq.

Background (on me)

The Prosser Lab:
Softening Stiff Hearts

Assistant Professor of Physiology, Penn
Associate Director, Penn Muscle Institute
Director, Leducq Transatlantic Cytoskeletal Network



Und wie Charlene bereits andeutete, besteht meine Ausbildung ausschließlich aus Herzbiomechanik und Elektrophysiologie. Und der Schwerpunkt des Labors lag ausschließlich auf diesen Herzmuskelzellen, die Sie hier sehen können, und auf der Entwicklung neuer Therapien, um das Herz als effizientere Maschine arbeiten zu lassen, worauf im Hintergrund angespielt wurde.



Background (on Lucy!)



Rocking the EEG turban



Loves PT in the park



Hates aquatic therapy



Gives Dad the gaga eyes



Oh my gosh the cutest

- Born May 3rd, 2018, diagnosed with STXBP1 encephalopathy in August 2018
- C.663+1G>C (donor splice site of exon 8 of STXBP1, loss of function)

Und das änderte sich natürlich alles, als meine Tochter Lucy am 3. Mai 2018 geboren wurde und nur wenige Tage später Anfälle bekam. Und so wurde im August 2018 bei ihr eine STXBP1-Enzephalopathie diagnostiziert. Wie für viele Familien war das erste Jahr mit Lu ein wirklich hartes erstes Jahr für uns. Sie litt unter häufigen kindlichen Spasmen, die wir nur schwer in den Griff bekamen. Schließlich hat die ketogene Ernährung für unsere Familie tatsächlich gut funktioniert. Deshalb ein ganz großer Applaus für das Keto-Team bei CHOP und für meine Frau Erin, die unser Superstar-Keto-Chefkoch im Haus ist. Und wie Sie hoffentlich auf diesen beiden neueren Fotos rechts im Bild oben sehen können, ist für mich der wichtige Punkt, dass Lou ein glückliches Kind ist. Zumindest so lange, wie jemand sie irgendwie ständig anstarrt und mit ihr spielt. Sie arbeitet daran, sich aufzusetzen. Sie arbeitet daran, krabbeln zu lernen. Und ich persönlich versuche, ihr jeden Abend ein Buch vorzulesen, damit sie "da da" als ihr erstes Wort sagt, sehr zum Leidwesen ihrer Mutter natürlich. Lucys Glück steht also an erster Stelle. Aber ich erkenne auch an, dass Lucy, wenn sich der Pflegestandard nicht ändert, vielleicht nie Mama oder Papa sagen wird. Und deshalb wollen wir mehr für unsere Kinder, nicht wahr? Unsere Kinder haben mehr verdient. Und so begann ich, in meinem eigenen Labor an ihrer Erkrankung zu arbeiten und auch zu versuchen, meine etwas einzigartige Position als Elternteil und Wissenschaftler zu nutzen, um auch andere zu motivieren. Und so ist eine der großen Möglichkeiten, wie wir diese Arbeit unterstützen, die entweder bereits im Gange ist oder mit der wir mehr Gruppen in diesen Raum einbinden wollen, die Beschaffung von Mitteln für die STXBP1-Forschung.



Lulu's Crew: Fundraising for STXBP1



Rockstar mom [Erin Prosser](#) and wild man [Sam](#)



Lulu's Crew at the Million Dollar Bike Ride (the biggest, baddest team out there)

- Raised \$280,000+ in our first two years to fund STXBP1 research!
- Still time to submit an LOI to apply for funding this year
 - Join us in 2021!

Und so haben einige von Ihnen vielleicht von Lulus Crew gehört. Das oben im Bild ist unser Team mit unserem Fahrrad-Fundraising-Team, das jetzt jährlich am Million Dollar Bike Ride teilnimmt, in Zusammenarbeit mit der STXBP1 Foundation, die über das Orphan Disease Venter in Penn abgehalten wird. In den ersten beiden Jahren unserer Tätigkeit haben wir über 280.000 Dollar gesammelt, mit denen jetzt mehrere STXBP1-Forschungsprogramme in Labors auf der ganzen Welt finanziert werden. Dies ist unser Teamfoto aus dem Jahr 2019. Wir hatten das größte Team da draußen, das inspirierend war und die meisten Gelder aufgebracht hat. Dies ist Lulus persönliches Cheerleader-Team. Das sind Mama und Papa hier und ihr verrückter Bruder Sam, und es gibt zwei Dinge, auf die ich hinweisen möchte. Erstens: Es ist noch Zeit, eine Absichtserklärung einzureichen, um die in diesem Jahr gesammelten Mittel zu beantragen, aber sie sind in den nächsten Tagen fällig. Also holen Sie sie bitte ein. Und dann möchte ich jeden von Ihnen, der zuhört, wirklich dazu ermutigen, darüber nachzudenken, sich uns 2021 anzuschließen. Dies ist wirklich ein phänomenal aufbauendes Ereignis. Sie werden von großartigen Menschen umgeben sein. Sie bekommen ein bisschen Bewegung. Es ist offensichtlich für einen guten Zweck. Und ich verspreche Ihnen, dass wir auch eine großartige After-Party schmeißen werden. Bitte denken Sie also darüber nach, nächstes Jahr nach Philadelphia zu kommen.

Aber nun zur Wissenschaft. Ich denke, das Klügste, was ich schon früh getan habe, war zu erkennen, dass ich nicht über das Fachwissen oder die Erfahrung verfüge, um diese Herausforderung wirklich allein zu bewältigen, und Leute, die viel klüger sind als ich, für unser Team zu gewinnen. Und dies hat sich wirklich zu einer starken Zusammenarbeit zwischen der Penn und einem Team am CHOP unter der Leitung von Dr. Beverly Davidson entwickelt, die wirklich umfangreiche Erfahrungen mit der Untersuchung von Störungen der neurologischen Entwicklung hat.

The ENDD Therapeutics Team

(Epilepsy and Neuro-Developmental Disorders)



Ben Prosser, Ph.D



Beverly Davidson, Ph.D



Alexey Bogush
Ph.D



Jennine McKenna
Ph.D



Elizabeth Heller
Ph.D



Ingo Helbig
M.D



Congsheng Cheng
Ph.D



Elisa Waxman
Ph.D



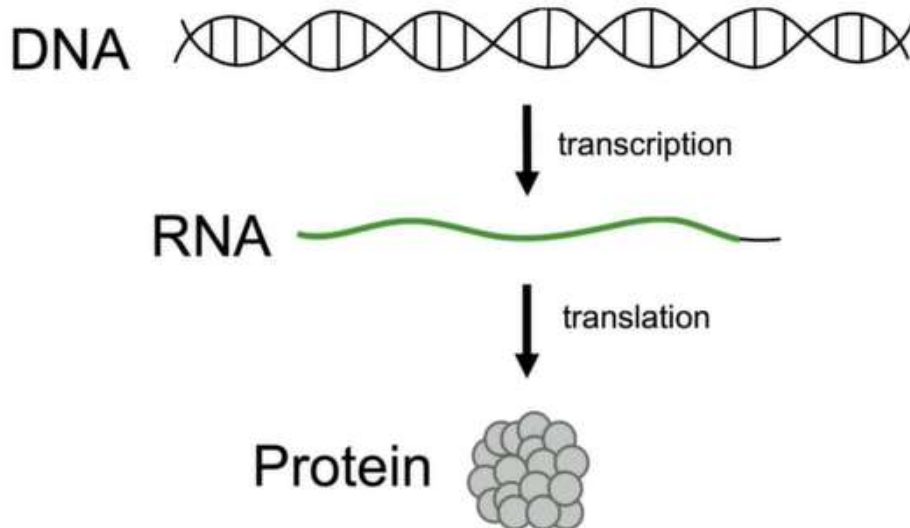
Deborah French
Ph.D

Aber auch damit alle wichtigen Erfahrungen mit der Einnahme einer neuen Therapie von Anfang bis Ende. Von der ersten Idee einer neuen therapeutischen Idee bis hin zur Anwendung am Patienten. Und das ist also unser derzeitiges und ständig wachsendes Team, das, wie ich glaube, wirklich diese kraftvolle Kombination von Wissenschaftlern und Klinikern ist, die diesen Sweet Spot getroffen haben, weil sie über vielfältige, wissenschaftliche und klinische Fachkenntnisse verfügen, Erfahrung sowohl auf einer sehr persönlichen Ebene als auch auf der beruflichen und klinischen Seite haben und voller Motivation stecken. Und so weiß ich, dass ich mich glücklich schätzen kann, mit dieser Mannschaft zusammenzuarbeiten, und ich denke, es ist ein Team, das bereit ist, echte Veränderungen in der Gemeinschaft herbeizuführen. Der derzeitige Arbeitsname und Fortschritt ist das ENDD Therapeutics Team for Epilepsy and Neurodevelopmental Disorders (ENDD-Therapeutika-Team für Epilepsie und neurologische Entwicklungsstörungen). Von all den PR- und Marketing-Leuten im Publikum nehme ich gerne neue Vorschläge für unseren Teamnamen entgegen. Okay. Das ist natürlich die große Frage, die wir beantworten wollen. **Wie korrigieren wir einen Verlust von funktionellem STXBP1? Und gibt es mehrere Möglichkeiten, wie dies erreicht werden könnte?** Um dieses Gespräch zu umrahmen, möchte ich mit einer kleinen Bio 101-Auffrischung dessen beginnen, was als das zentrale Dogma der Zellbiologie bezeichnet wird. Und zwar so, dass innerhalb einer Zelle wie einer Gehirnzelle der genetische Code oder die DNA dann in RNA transkribiert wird, die dann in Proteine übersetzt wird, und die Proteine sind das, was im Inneren der Zelle tatsächlich die Arbeit verrichtet.

How do we correct for a loss of functional STXBP



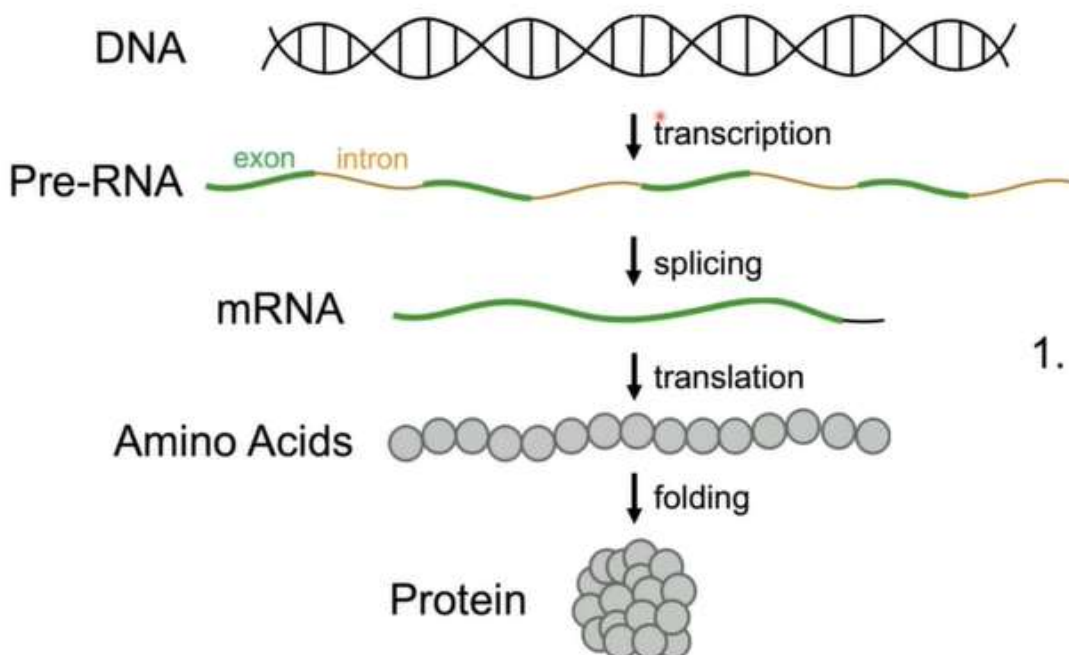
Central Dogma of Cell Biology (*Bio101*)



Um also einen Verlust des STXBP1-Proteins zu korrigieren, könnten wir auf der Ebene der DNA, der RNA oder der Proteine eingreifen. Und es gibt Bestrebungen, Therapien zu entwickeln, die an jedem dieser Bereiche eingreifen, was ich heute hervorheben werde. Aber um diese therapeutischen Ansätze zu verstehen, müssen wir eine etwas detailliertere, eine Art Bio 202-Version des zentralen Dogmas schätzen, die einige Zwischenschritte enthält. Wenn wir das also aufschlüsseln, beginnen wir mit unserer doppelsträngigen DNA. Diese wird in einzelsträngige RNA transkribiert.



Central Dogma (*Bio 202 version*)



1. Highly tunable

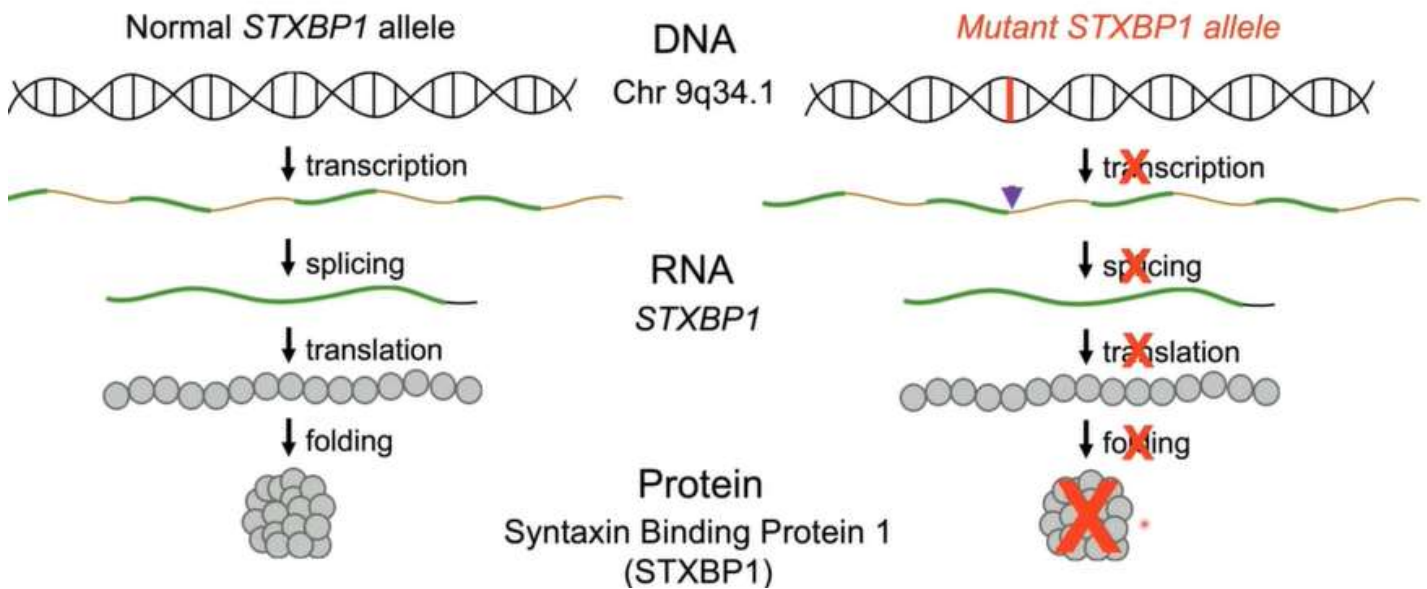
Aber RNA wird nicht in ihrer voll ausgereiften Form transkribiert. Sie muss gespleißt werden. Und so werden Regionen, die Exons genannt werden und grün dargestellt sind, eingespleißt. Diese enthalten den Code für die Herstellung von Proteinen, und Regionen, die als Introns bezeichnet werden, werden ausgespleißt, um eine dann reife Boten-RNA herzustellen. Von dort wird dieser mRNA-Code ausgelesen und in Aminosäuren, den Bausteinen der Proteine, übersetzt. Aber diese

Aminosäuren müssen dann in die richtige dreidimensionale Struktur gefaltet werden, die ein funktionelles Protein bildet, das für die Zelle tatsächlich nützlich ist. Es gibt also zwei Dinge, die ich an diesem System, an dieser Art Fließband, hervorheben möchte. Und das erste ist, dass die Zelle eine sehr komplexe Maschinerie entwickelt hat, um jeden Schritt in diesem Prozess abzustimmen, richtig? Man kann sie lauter stellen, man kann sie leiser stellen, man kann sie ganz abschalten. Das zweite ist, dass dies ein sehr unvollkommenes System ist. Es gibt Fehler und Ineffizienzen in diesem Prozess, selbst in vollkommen gesunden Zellen unter den besten Bedingungen. Und so bieten diese Unvollkommenheiten wirklich eine therapeutische Chance, nicht wahr? Wir können Therapien entwickeln, die diese Ineffizienzen nutzen. Sie sorgen dafür, dass dieses Fließband besser funktioniert, zum Beispiel um einen Spleißfehler zu korrigieren, um die Transkription oder Translation zu verbessern, um mehr Proteine herzustellen, wenn wir sie brauchen, wie zum Beispiel bei einem STXBP1-Mangel. Betrachten wir dies also im spezifischeren Kontext des STXBP1-Mangels.

Jede unserer Gehirnzellen hat also jeweils zwei Chromosomensätze, zwei Kopien dieses STXBP1-Gens auf Chromosom neun, und unsere Kinder haben eine Variante in einer dieser Genkopien, die hier rot dargestellt ist. Und wie Sie im vorangegangenen Vortrag gehört haben, können diese Mutationen im gesamten Spektrum des STXBP1-Gens liegen. Und je nachdem, wo diese Mutation liegt, kann sie sich auf alle nachgelagerten Aspekte des zentralen Dogmas auswirken.



STXBP1 loss of function



Zum Beispiel hat meine Tochter eine Mutation in einer Spender-Spleißstelle, die ich hier oben im Bild in violett zeige und die das Spleißen an Exon 8 unterbricht. Und von da an ist alles stromabwärts kompromittiert. Aber unabhängig davon, wo die Mutation liegt, glauben wir, dass es eine Art gemeinsamen stromabwärtigen Endpunkt gibt. Die Zelle produziert einfach nicht genug funktionsfähiges STXBP1-Protein. Sie können sich also konzeptionell mindestens drei verschiedene therapeutische Strategien vorstellen, mit denen dieses Problem angegangen werden könnte. **Sie könnten also versuchen, dieses mutierte Allel zu korrigieren und das Problem an seiner Quelle zu beheben. Wir könnten versuchen, das normale Allel oder das Wildtyp-Allel dazu zu bringen, mehr Protein herzustellen, indem wir die Transkription, die Spleißtranslation und die Proteinfaltung verstärken. Oder wir könnten versuchen, der Zelle zusätzliche externe Kopien des STXBP1-Gens hinzuzufügen.** Okay. Dann zerlegen wir das Ganze in die DNA-, RNA- und Proteinebene. Beginnen wir zunächst mit Eingriffen auf der DNA-Ebene und vielleicht mit dem heutzutage bekanntesten Eingriff auf der DNA-Ebene, dem einen, zumindest dem größten Teil der Öffentlichkeit, nämlich CRISPR.

DNA-targeted therapies:

CRISPR



CRISPR gene editing



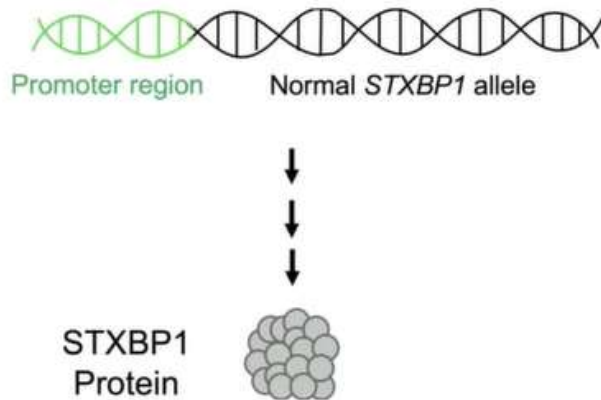
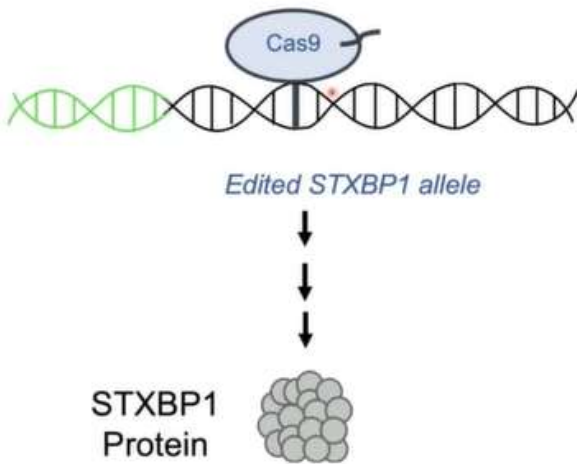
DNA-targeted therapies:

CRISPR



CRISPR gene editing

CRISPR Activation ("CRISPRa")



Pro: tremendous therapeutic potential;
Con: specificity, not yet safe in humans

Dies ist also das CRISPR CAS9-Gen-Editierwerkzeug. Und die Grundprämisse von CRISPR ist, dass man dieses CAS9-Enzym auf eine bestimmte Region der DNA abstimmen kann. Zum Beispiel die Stelle einer pathologischen Variante in SYXBP1, und dieses CAS9 kann dann dieses mutierte DNA-Stück zerschneiden und das Genom mit der korrekten Sequenz editieren. Das ist irgendwie erstaunlich, nicht wahr? Ich meine, Sie beheben das Problem genau dort, wo es angefangen hat. Und deshalb glaube ich, dass CRISPR, deshalb hat es so viel Buzz, vielleicht das höchste therapeutische Potenzial von allem ist, worüber wir heute sprechen werden. Aber Potential ist ein wichtiges Wort, nicht wahr? Mit CRISPR sind viele Hürden zu überwinden, bevor das Gen-Editieren wirklich eine Realität und eine sichere Realität beim Menschen ist.

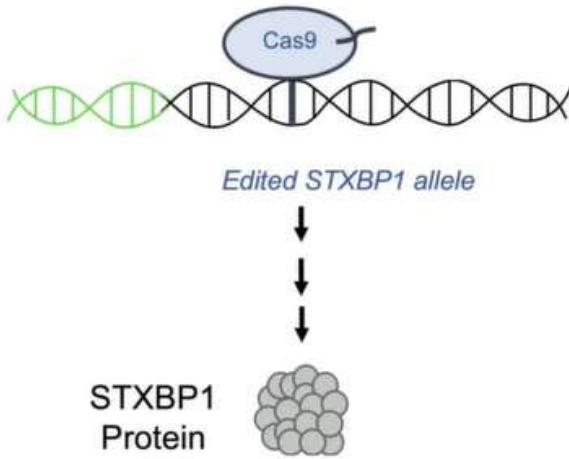
Um diese Probleme zu sehr zu vereinfachen, besteht einer der Schlüssel darin, dass dieses CAS9 zwar Ihr Gen genau dort schneidet, wo Sie es haben wollen, aber es kann auch das Genom an anderen, unbeabsichtigten Stellen schneiden. Und das könnte natürlich schwerwiegende Folgen haben. Viele Labors in der STXBP1-Gemeinschaft verwenden das CRISPR-Gen-Editing, aber eher als Forschungsinstrument. Wir verwenden es, und wir haben es zum Beispiel erfolgreich eingesetzt, um die

Mutation in den STEM-Zellen meiner Tochter zu korrigieren. Aber mir ist im Moment keine Gruppe bekannt, die diese Art von Basen-Editierstrategie für STXBP1 wirklich ernsthaft verfolgt.

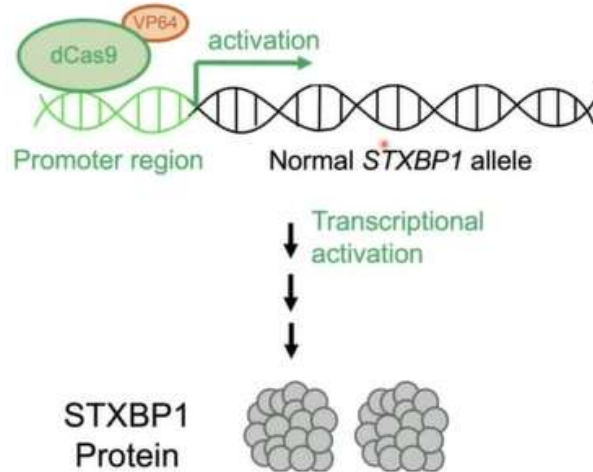


DNA-targeted therapies: CRISPR

CRISPR gene editing



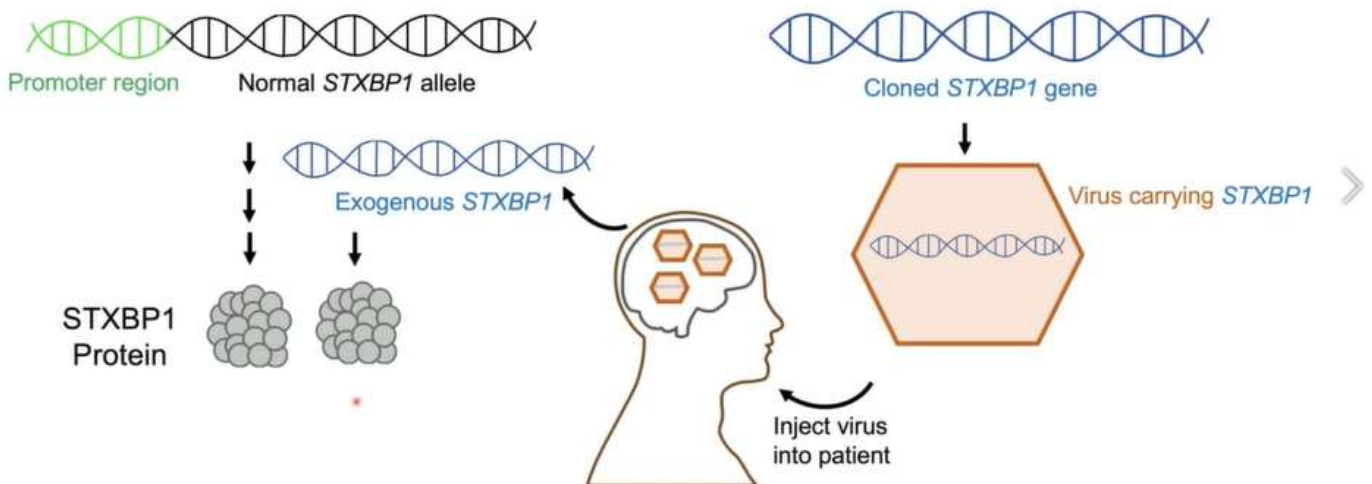
CRISPR Activation ("CRISPRa")



Pro: tremendous therapeutic potential;
Con: specificity, not yet safe in humans

Es gibt jedoch Gruppen, die sich damit befassen, einige der anderen Funktionen von CRISPR für STXBP1-Störungen einzusetzen. **Bei CRISPR geht es also nicht nur darum, das Genom zu schneiden. Man kann es auch zur Aktivierung von Genen verwenden.** Mit dieser Technik, die zur Aktivierung **CRISPRa** genannt wird, zielen Sie auf ein so genanntes totes CAS9. Es kann keine DNA schneiden. Sie zielen auf die Promotorregion eines Gens, d.h. auf die Region unmittelbar stromaufwärts, z.B. von STXBP1. Und hier ist CRISPR also wirklich ein Verabreichungssystem. Es bringt den Transkriptionsaktivator mit, der die Gentranskription einschaltet, um die Übersetzung von mehr STXBP1-Protein zu steuern. Der andere übliche Eingriff auf DNA-Ebene ist die Gensatztherapie. Bei der Gensatztherapie wird also eine Kopie des für Sie interessanten Gens wie STXBP1 in ein virales Verabreichungssystem kloniert.

DNA-targeted therapies: Gene Replacement Therapy



Pro: working in humans for other disorders!
Con: no off switch, viruses difficult to target and titrate

Xue Lab, Baylor
Boland Lab, Columbia
Verhage Lab, Amsterdam

Und dieses Virus, das STXBP1 trägt, wird dann den Patienten injiziert. Und das Virus wird modifiziert, um zu versuchen, es zu den Zellen von Interesse zu bringen, und in diesem Fall zu den Gehirnzellen. Dies führt also zur Expression von zusätzlichen

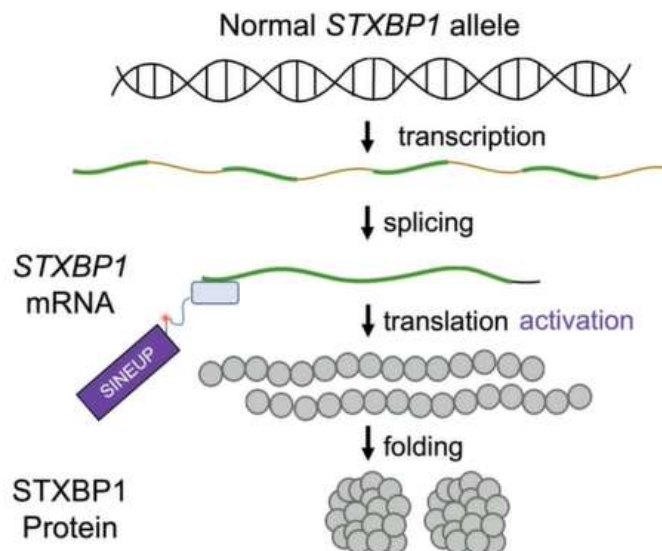
Kopien von STXBP1 in diesen Zellen, die dann in Proteine übersetzt werden. Und dies könnte den Mangel an STXBP1 ausgleichen. Es gibt also eine Reihe von Vorteilen. Einer der großen Vorteile ist, dass nach vielen Jahren in der Entwicklung die Gensatztherapie nun Realität ist. Sie wirkt beim Menschen auch bei anderen Krankheiten, nicht wahr? **Aber eine der größten verbleibenden Hürden ist, sie speziell im Gehirn zum Funktionieren zu bringen.** So haben wir zum Beispiel bei Mäusen sehr gute Viren, um Dinge auf Neuronen auszurichten. Bei Primaten war dies jedoch viel schwieriger zu bewerkstelligen. **Der andere Nachteil der Gen-Ersatztherapie ist, dass es im Allgemeinen keinen wirklichen Aus-Schalter gibt, wenn man das einmal gemacht hat.** Wenn diese zusätzlichen Kopien von STXBP1 einmal in der Zelle sind, bleiben sie wahrscheinlich ein Leben lang dort. Wir müssen also sicherstellen, dass wir die richtige Menge und nicht zu viel einnehmen, was eine Herausforderung für diese Art von Therapie sein kann.

Aber dies ist ein Bereich, der meiner Meinung nach für STXBP1 wirklich sehr schnell wächst. Er wird jetzt von mehreren verschiedenen akademischen Gruppen aktiv verfolgt, die im Bild oben rechts hervorgehoben sind. Und auch der Biotech-Sektor ist jetzt aktiv beteiligt, was für diese Gemeinschaft sehr spannend ist.

Ich werde jetzt ein paar Schritte nach unten springen, um auf der Proteinebene zu intervenieren. Und die erste Idee, die ich vorstellen wollte, ist die translatorische Aktivierung. Und darauf werde ich gar nicht weiter eingehen, denn das wird im folgenden Vortrag ausführlich besprochen werden. Aber ein vielversprechender Weg ist die Verwendung eines so genannten SINEUP. Und so kann sich ein SINEUP mit der STXBP1-RNA verbinden und die Translation aufdrehen, um mehr Protein herzustellen wie unten im Bild zu sehen ist.



Protein-targeted therapies: *Translational Activation: SINEUPs*

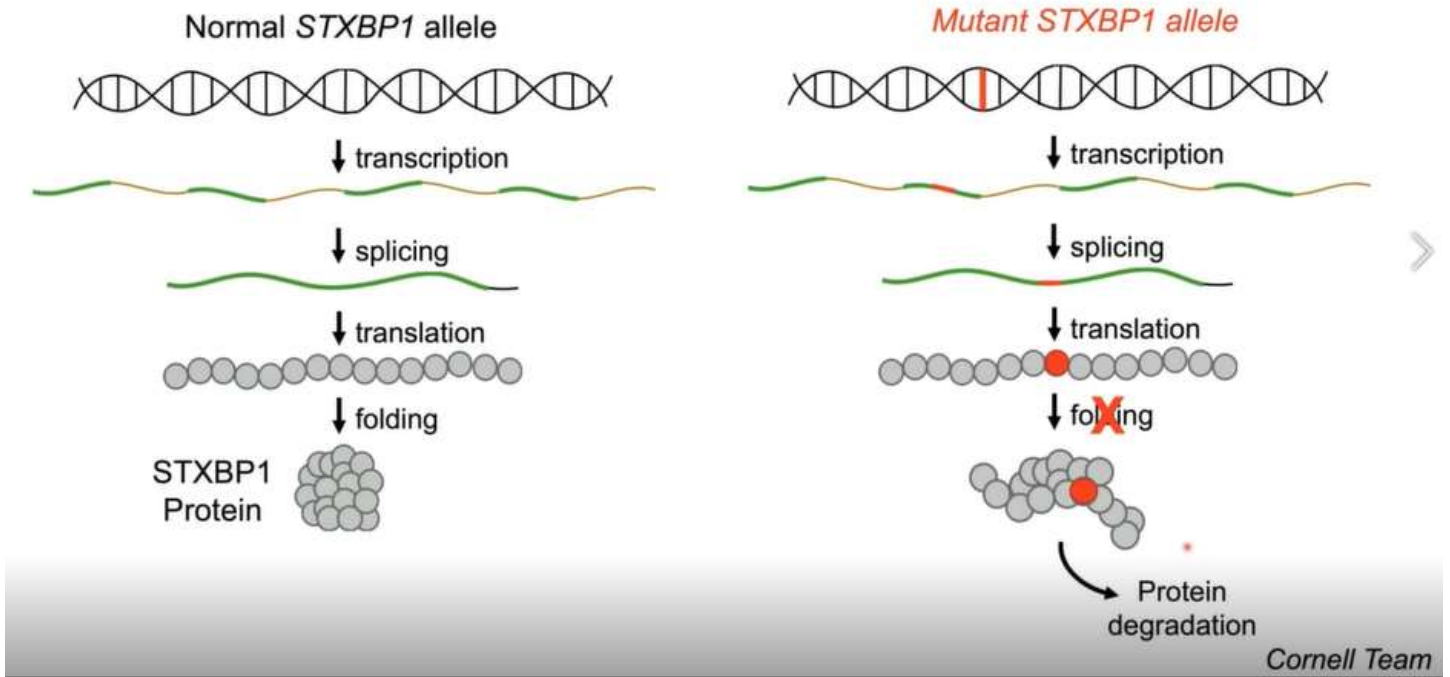


Pros and Cons, see next talk!

Genoa Team

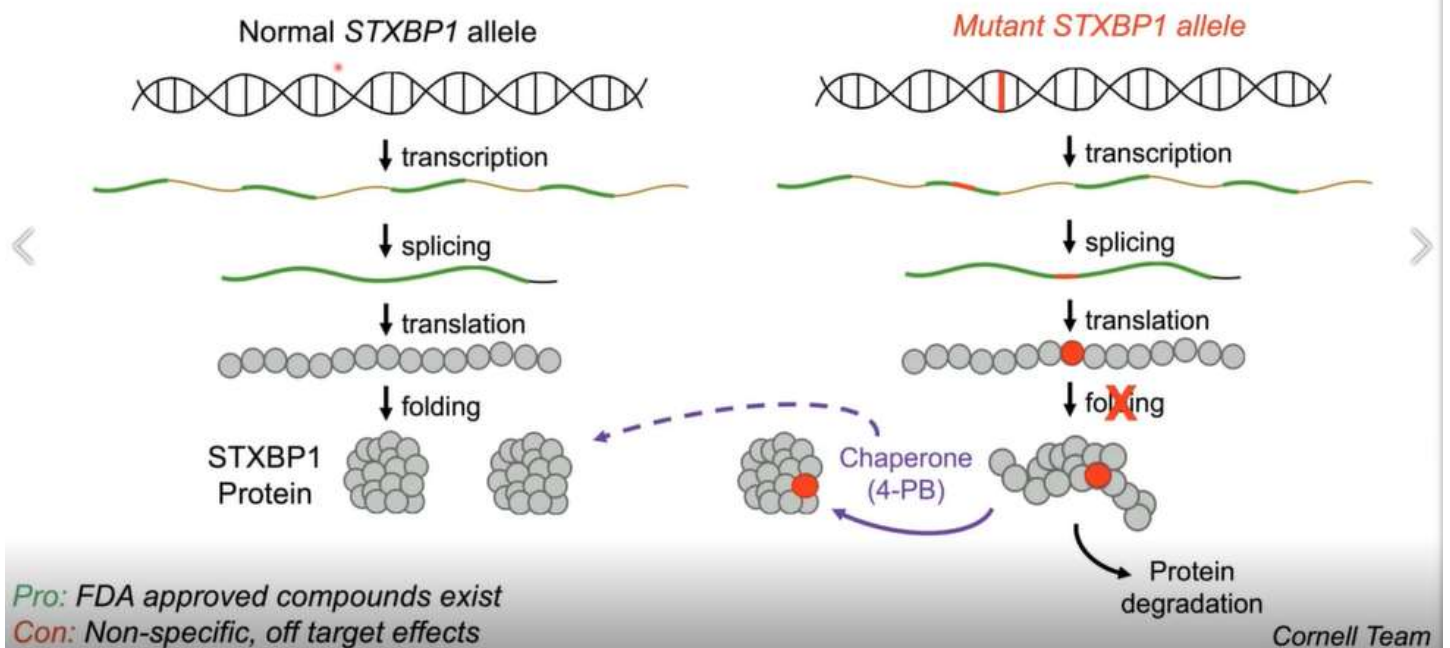
Dies ist also eine sehr coole Technik, über die Sie in Kürze mehr hören werden. Die letzte Intervention auf Proteinebene, über die ich mit Ihnen allen sprechen wollte, ist nicht unbedingt eine genetische Intervention, aber sie passt irgendwie in dieses zentrale Dogma-Schema. Und ich weiß, dass einige von Ihnen sich dessen bewusst sind und sich dafür interessieren. So viele Patienten haben vielleicht eine Missense-Variante, die die Transkription nicht stört. Sie stört die Transkription nicht, aber jetzt ist eine Aminosäure irgendwo in der Proteinsequenz von STXBP1 verändert. Was dies bewirken kann, ist eine Störung der Proteinfaltung. Man erhält also nicht die richtige dreidimensionale Struktur eines funktionellen STXBP1-Proteins.

Protein-targeted therapies: Enhancing protein stability



Jetzt haben Zellen Wege, ich sollte damit beginnen -- diese instabilen fehlgefalteten Proteine, sie werden typischerweise schnell von der Zelle aufgelöst, und das könnte zum Mangel an STXBP1-Protein beitragen. Aber Zellen haben Möglichkeiten, diesen Proteinen mit Hilfe eines so genannten Protein-Chaperons bei der korrekten Faltung zu helfen. Der Begriff Chaperon erinnert mich also immer an einen Highschool-Tanz. Also ging ich auf eine katholische Schule. Wenn man sich also als Teenager mit seinem Tanzpartner verheddert hat, und in meinem Fall mit dem Priester oder der Nonne, kamen sie herein und trennten euch, um sicherzustellen, dass ihr euch nicht zu sehr verheddert. Und so versucht die Gruppe an der Cornell wirklich, STXBP1 zu entwirren, indem sie **ein kleines Molekül hinzufügt, das als Protein-Chaperon fungieren kann, nämlich dieses 4-Phenylbutyrat oder 4PB**. Dies könnte helfen, die Fehlfaltung von STXBP1 zu verhindern, siehe Bild unten.

Protein-targeted therapies: Enhancing protein stability



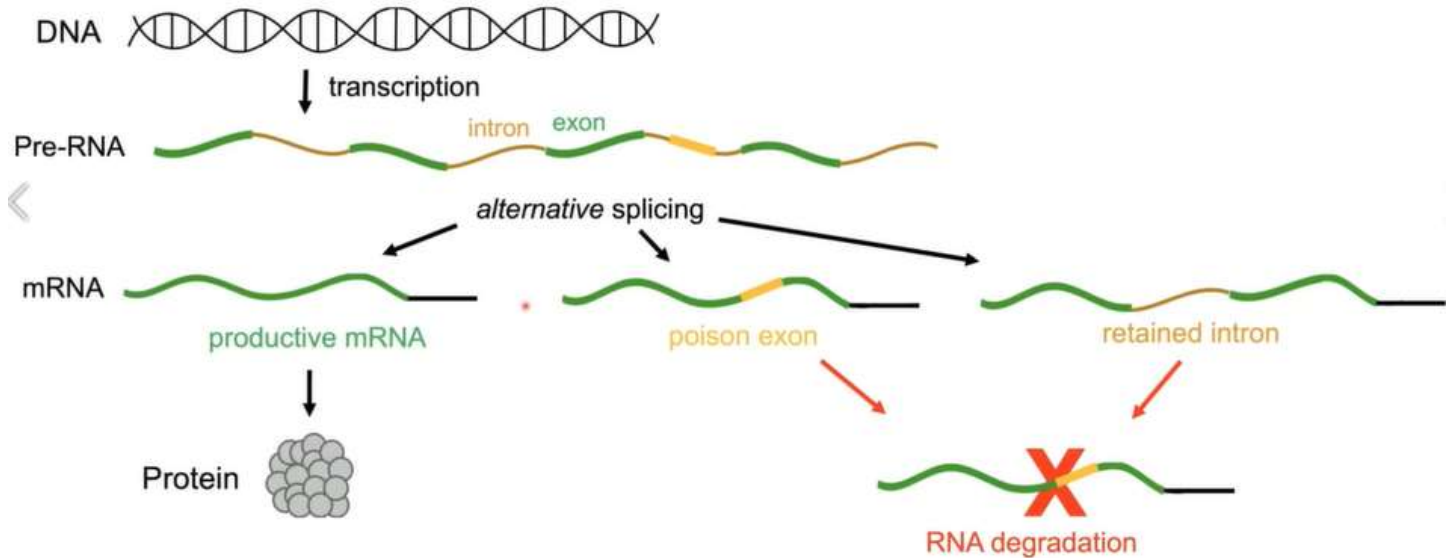
Pro: FDA approved compounds exist
Con: Non-specific, off target effects

Diese Fehlfaltung kann tatsächlich sogar manchmal auf dem normalen Protein auftreten. **Wenn es Ihnen also gelingt, die Faltung des normalen Proteins zu verbessern, können Sie vielleicht sogar mehr aus dem normalen STXBP1-Allel herausholen.** Ich denke also, einer der Hauptvorteile dieses Ansatzes besteht darin, dass **einige dieser chemischen Chaperone bereits von der FDA zugelassene Verbindungen sind, die für andere Indikationen eingesetzt werden. Und dies kann den Zeitplan für die Zulassung eines solchen Medikaments für eine andere Indikation, wie die Behandlung von STXBP1, dramatisch beschleunigen.**

Die Kehrseite dieses Ansatzes ist, dass er nicht wirklich spezifisch auf das STXBP1-Gen oder die Proteinsequenz abzielt. Und so wird 4PB andere Wirkungen in Gehirnzellen oder anderen Zelltypen im Körper haben. Und das muss natürlich bei der Abwägung der Vor- und Nachteile berücksichtigt werden. In Ordnung, für den letzten Teil des Vortrags werde ich mich auf die RNA-Therapeutika konzentrieren, an denen wir arbeiten.



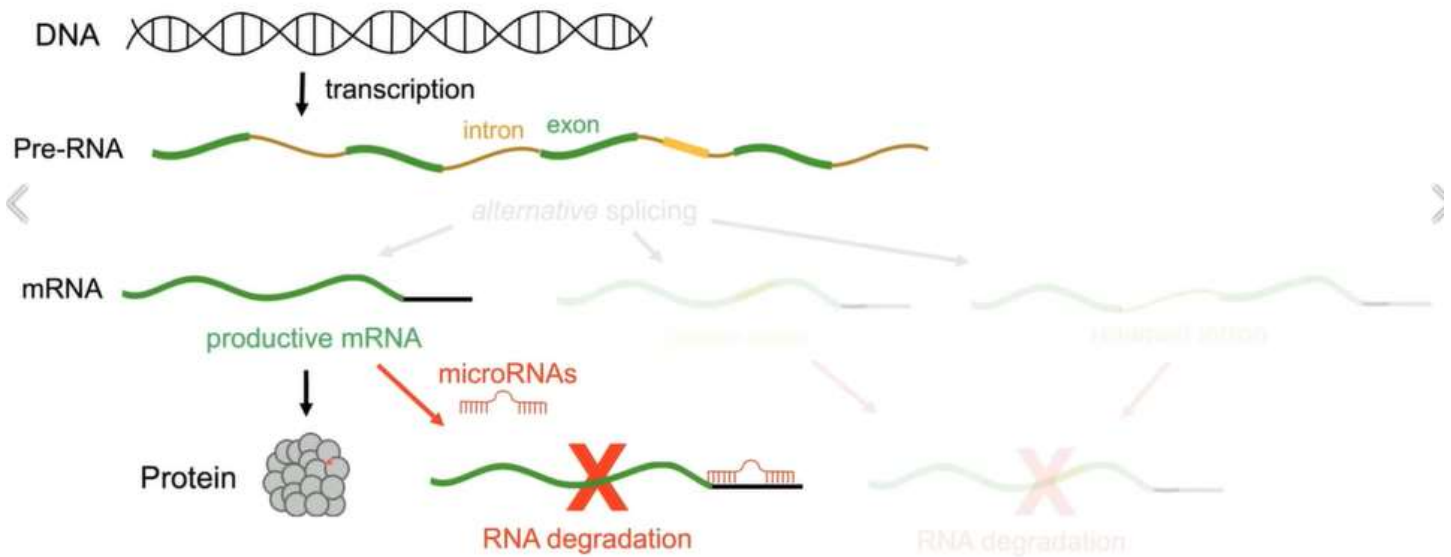
RNA biology: RNA *splicing* and *microRNAs*



Und das erfordert eine weitere kleine biologische Fabel. Das ist also das vorangegangene Bild oben, das ich mit dieser Prä-RNA gezeigt habe, die dann zu einer reifen RNA gespleißt wird, die in ein Protein übersetzt wird, aber die Realität ist natürlich komplexer, und im Allgemeinen kann dieselbe Prä-RNA zu mehreren verschiedenen RNAs gespleißt werden, die unterschiedliche Komponenten enthalten. Dieser Prozess wird alternatives Spleißen genannt. Manchmal können diese verschiedenen RNAs also einfach für ein etwas anderes, aber dennoch sehr funktionelles Protein kodieren. Aber manchmal sind einige genomische Elemente, die hätten ausgespleißt werden sollen, immer noch enthalten, wie dieses Intron hier oben im Bild, das zurückgehalten wurde, oder etwas, das man ein Gift-Exon nennen könnte, das ein Terminationscodon enthält. Und wenn die RNA diese Elemente enthält, kann die Zellmaschinerie diese Defekte erkennen und diese RNA abbauen, anstatt sie produktiv zur Herstellung von Proteinen verwenden zu müssen. Die Zelle säubert also dieses Durcheinander, aber der wichtige Aspekt, über den man bei Therapien nachdenken muss, ist, dass eine Zelle nur begrenzte Ressourcen hat. Wenn sie ihre Ressourcen nutzt, dann nutzt sie die zelluläre Maschinerie, um diese unsachgemäß gespleißten RNAs zu bereinigen, und sie nutzt diese Maschinerie nicht, um neue Proteine zu transkribieren und zu übersetzen. Sie können sich also vorstellen, dass, wenn wir die Effizienz des Spleißens steigern könnten, diese Ressourcen frei würden, um mehr Protein herzustellen.

Nun, das andere Element, das ich hier zur RNA-Biologie vorstellen muss, sind die microRNAs. Vergessen Sie also für einen Moment diese alternativ gespleißten Isoformen, konzentrieren Sie sich einfach auf diese produktive RNA-Isoform. Sogar diese müssen also konkurrieren, um in Proteine umgewandelt zu werden, denn es stellt sich heraus, dass es noch andere kleine RNAs gibt, die in der Zelle herumschwimmen und microRNAs genannt werden. Und was sie tun können, ist, dass sie an RNAs binden und sie gezielt abbauen.

RNA biology: RNA *splicing* and *microRNAs*



Wenn man also ein Element von dieser Folie wegnimmt, ist es, dass diese Prä-RNA den ganzen Weg bis hier oben hinauf eine Menge Hürden überwinden muss, um es bis zu einem funktionsfähigen Protein zu schaffen. Wenn wir also diesen Weg bereinigen können, können wir vielleicht mehr Protein aus der gleichen Menge an Prä-RNA herstellen. Wie können wir dann die RNA-Biologie zu unserem therapeutischen Vorteil abstimmen?

Und die Antwort hierauf sind **Antisense-Technologien oder Antisense-Oligonukleotide, die allgemein als ASOs bezeichnet werden. Ein ASO ist also ein kleines, chemisch synthetisiertes Stück RNA, das dazu bestimmt ist, an eine Zielsequenz auf der RNA zu binden und ihre Biologie zu manipulieren.** Und diese werden für eine Vielzahl von therapeutischen Ansätzen im gesamten Krankheitsgebiet verfolgt.

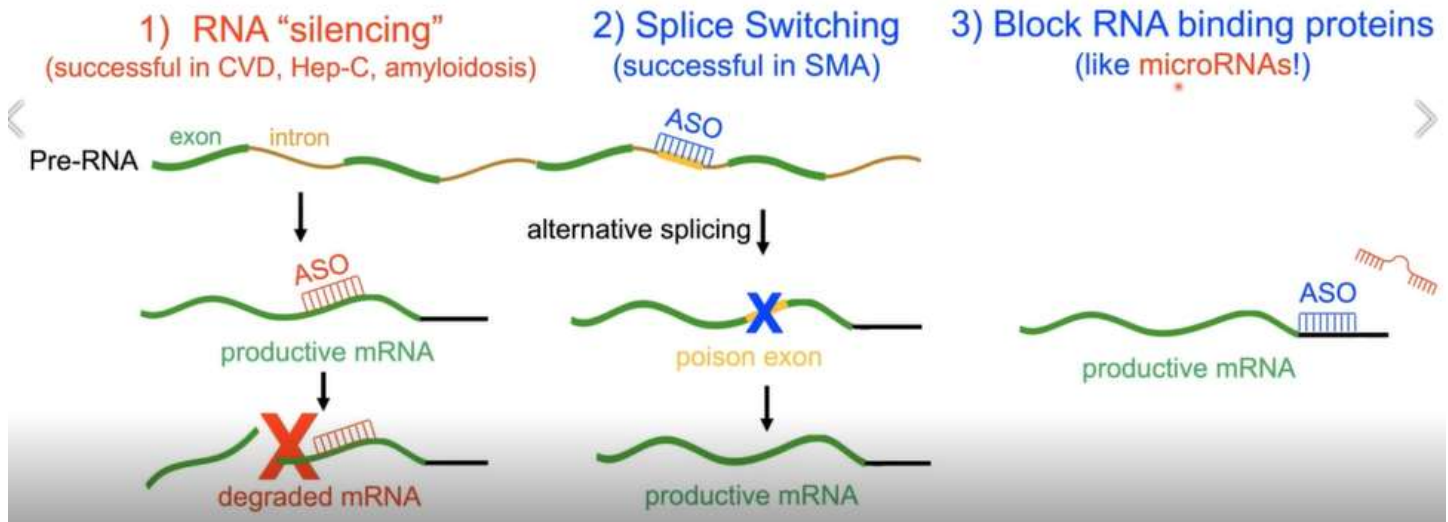
Ich werde drei Möglichkeiten aufschlüsseln, wie eine ASO die RNA-Biologie regulieren kann. Und die erste besteht in einer so genannten stillenden ASO. Wir nehmen also unser Standardbeispiel von produktiv gespleißter RNA, sagen aber, dass unser Ziel darin besteht, die Expression eines bestimmten Proteins in der Krankheit zu reduzieren, was ein häufiges Ziel in der Krebstherapie sein kann. Wir können also ein ASO mit einer bestimmten Chemie so entwerfen, dass es an diese RNA bindet und bewirkt, dass sie zerschnitten oder abgebaut wird. Das ist ein ASO zum Schweigen zu bringen, und das ist wirklich die klassische und erste Art und Weise, wie ASOs verwendet wurden, aber das hilft uns nicht weiter. Wir brauchen mehr RNA, mehr Protein. Das zweite gemeinsame Ziel der ASOs ist also die Modulation des Spleißens. Nehmen wir also an, wir haben ein Gift-Exon eingespleißt, das normalerweise diese RNA für den Abbau markieren würde. Um zu versuchen, dies zu behandeln, können wir also eine andere ASO-Chemie verwenden. Diese ASOs zerschneiden also ihr Ziel nicht. Sie binden sich einfach fest an ihr Ziel. Und wenn Sie dieses ASO einsetzen. An der richtigen Stelle, um ein giftiges Exon herum, kann es dieses Exon dazu bringen, herausgespleißt zu werden. Jetzt haben Sie also eine produktiver gespleißte RNA. Das ist genau die Strategie, die **Stoke Therapeutics zur Behandlung des Dravet-Syndroms verfolgt**, das durch den Verlust von SCN1A verursacht wird, und **sie zeigt ein echtes präklinisches Versprechen.** Sie wurde auch **erfolgreich bei der Behandlung von SMA eingesetzt**, auf die ich noch kurz eingehen werde. Nun, die dritte Möglichkeit, wie man ein ASO einsetzen könnte, ist die Blockierung anderer Proteine, die RNAs binden, wie z.B. microRNAs. In dem Fall also, dass eine mikroRNA an Ihre mRNA bindet und zu deren Abbau führt, könnten Sie, anstatt diese mikroRNA binden zu lassen, ein ASO genau dort platzieren, wo es binden will. So schirmen Sie Ihre RNA vor dieser mikroRNA ab und schützen sie vor dem Abbau.

How do we manipulate RNA?

Antisense Oligonucleotides (ASOs)



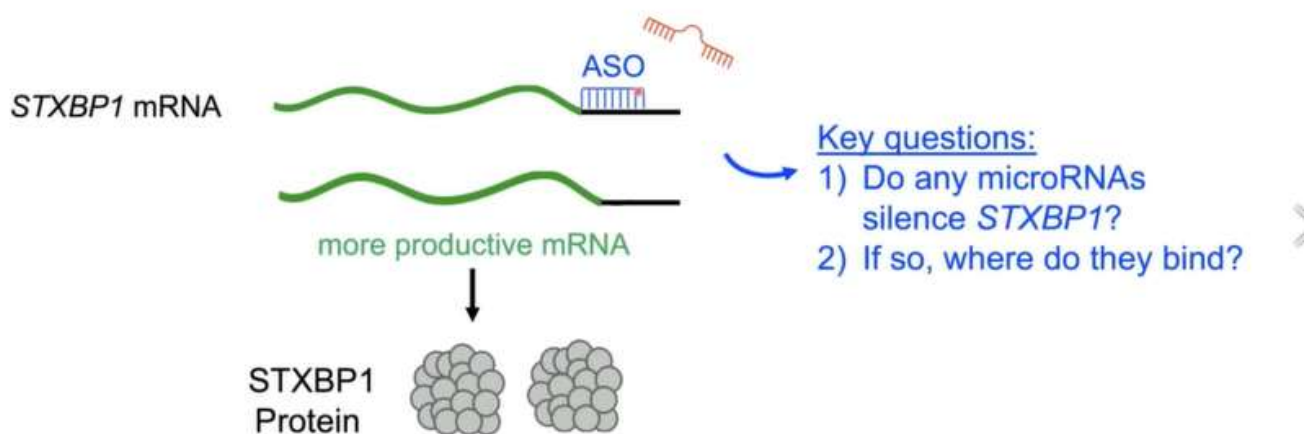
ASOs: small, synthetic pieces of RNA (or DNA) designed to target and manipulate RNA



In unserer Gruppe arbeiten wir also sowohl an der Spleißschaltung als auch an der Blockierung von ASOs für STXBP1. Aber diese dritte Option, diese Leiter, ist die am weitesten entfernte. Deshalb werde ich hier etwas ausführlicher darauf eingehen. Okay. Das war also unsere ziemlich einfache ursprüngliche Idee. Wenn eine bestimmte Menge der STXBP1-RNA normalerweise von mikroRNAs abgebaut wird. Und wenn wir diesen Bruch durch das Anlegen eines blockierenden ASOs irgendwie beseitigen können, dann haben wir produktivere RNA und mehr Protein.



Can we use an ASO to treat STXBP1 disorders?



Es gibt wirklich zwei grundlegende Fragen, die Sie beantworten müssen, um zu entscheiden, ob dies funktionieren könnte. Die erste ist, ob die ASO in der Realität wissenschaftlich fundiert ist? Gibt es tatsächlich mikroRNAs in unseren menschlichen Gehirnen, die typischerweise STXBP1 zum Schweigen bringen? Und wenn ja, müssen wir genau wissen, wo sie STXBP1 binden, damit wir eine ASO entwickeln können, die darauf sitzt und es blockiert.

Es stellt sich also heraus, dass mikroRNAs tatsächlich viele verschiedene Gene zum Schweigen bringen, die an Störungen der Neuroentwicklung beteiligt sind. Und so haben unsere Partner in der Davidson-Gruppe die RNA-Sequenzen von Zehntausenden von Genen im menschlichen Kortex, im menschlichen Gehirn, kartiert, um alle Gene zu identifizieren, an die mikroRNAs binden und zum Schweigen bringen können. Sie fanden heraus, dass es im menschlichen Gehirn über 3000 Gene gibt, die normalerweise durch mikroRNAs zum Schweigen gebracht werden. In Ihrem Gehirn geschieht dies gerade jetzt. Deshalb habe ich diese Liste mit den 155 Genen abgeglichen, von denen man glaubt, dass sie aufgrund des Verlusts der Genfunktion Störungen der Entwicklung des Nervensystems verursachen. Und etwa die Hälfte dieser Gene wird wahrscheinlich durch mikroRNAs im menschlichen Gehirn aktiv stillgelegt. Dazu gehört auch STXBP1. Das bedeutet, dass bei

diesen etwa 70 seltenen Krankheiten die Entfernung dieses MikroRNA-Bruchs aus dem betreffenden Gen eine nützliche Methode sein könnte, um die Gen- und Proteinexpression bei Bedarf zu steigern.



MicroRNAs in Neuro-Developmental Disorders



Neuron
NeuroResource

Transcriptome-wide Discovery of microRNA Binding Sites in Human Brain

Ryan L. Boudreau,¹ Peng Jiang,¹ Brian L. Gilmore,¹ Ryan M. Spengler,⁴ Rebecca Tirabassi,⁵ Jay A. Nelson,⁵ Christopher A. Ross,⁶ Yi Xing,^{1,7,*} and Beverly L. Davidson^{1,2,3,4,*}

- Surveyed human brains (cortex) and found >3,000 genes that are silenced by microRNAs
- At least 70 of 155 genes believed to cause NDD due to haploinsufficiency are silenced by microRNAs (including *STXBP1*)

In Ordnung, dann werde ich jetzt zu den Daten springen. Ich denke, das ist wahrscheinlich für diese Gruppe am relevantesten, um es kurz zu machen: Wir haben eine bestimmte mikroRNA namens miR-218 verfeinert, für die wir und andere gute Beweise für die Stummschaltung von *STXBP1* haben. Wenn wir die menschliche neuronale Zelllinie nehmen und sie mit einem Inhibitor dieser mikroRNA behandeln, also diesen Bruch entfernen, so erhalten wir am Ende etwa eine zweifache Erhöhung der Menge des *STXBP1*-Proteins in diesen Zellen, die hier im Panel A quantifiziert wird.

Inhibition of microRNA-218 increases *STXBP1* protein

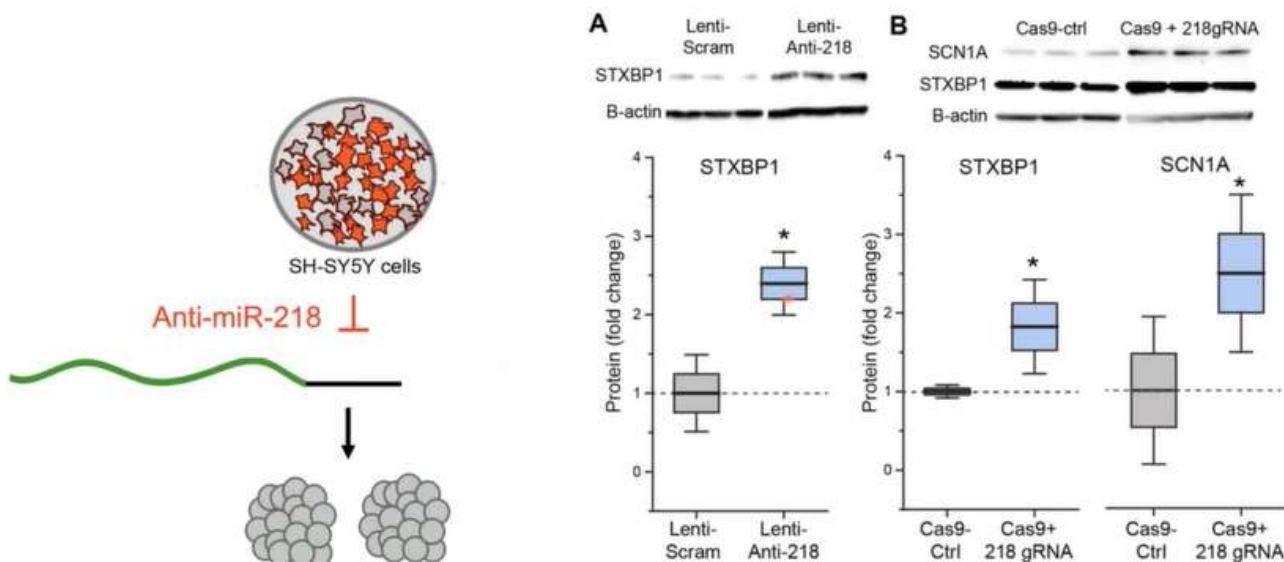
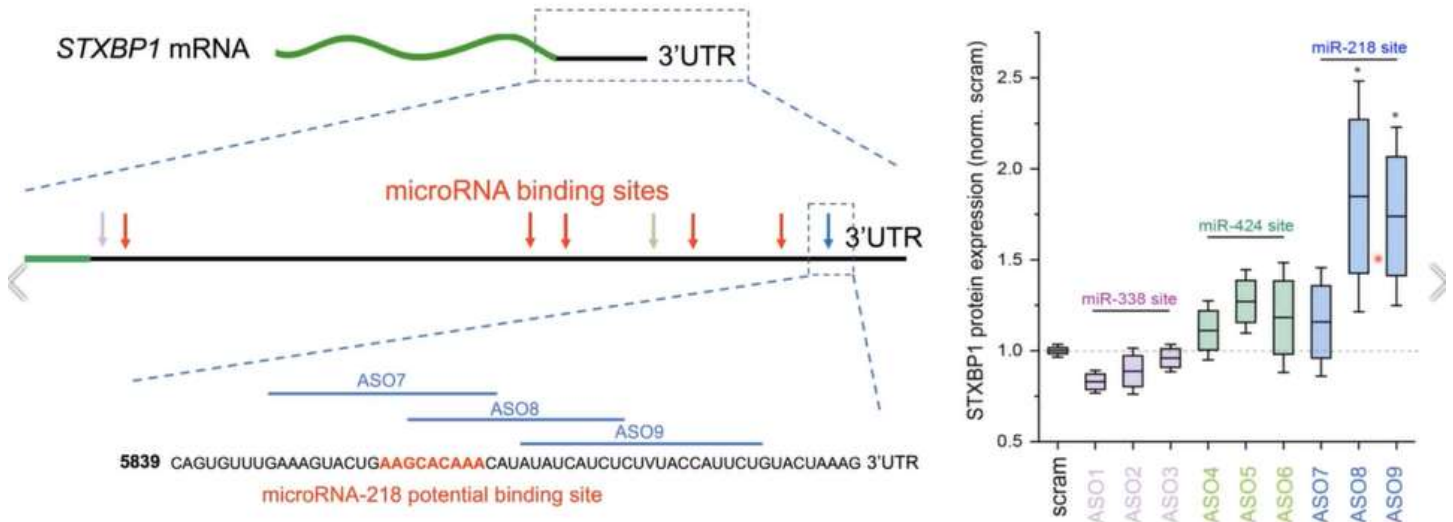


Fig.3: Inhibition of miR-218 via antagomiR (A) or Cas9-mediated excision (B) potently upregulates *STXBP1* and *SCN1A* in human neuronal cells. All box plots depict 25-75% CI, with mean line +/- 1SD, *p<0.05

Als komplementärer Ansatz können wir CRISPR auch verwenden, um diese mikroRNA aus diesen neuronalen Zellen tatsächlich herauszuschneiden. Und wieder sehen wir ein ähnliches Ergebnis, wenn Sie einen Anstieg des *STXBP1*-Proteins haben, und Sie können auch diesen Anstieg des *SCN1A*-Proteins sehen, das wiederum die genetische Grundlage für das Dravet-Syndrom ist, von dem wir glauben, dass es ein weiteres Ziel dieses miR-218 ist. Aber dies verdeutlicht auch das Problem einer nur breiten Hemmung von miR-218. Jede mikroRNA kann Hunderte von verschiedenen Zielgenen regulieren. Wenn wir sie also hemmen, könnten wir alle diese Gene hochregulieren, was wir nicht wollen, da dies unvorhergesehene Folgen haben könnte. Wir wollen nur *STXBP1* erhöhen. Um das zu erreichen, müssen wir wirklich wissen, wo diese

mikroRNA hinter STXBP1 liegt, damit wir ein ASO auf STXBP1 legen können, um es zu blockieren. Und in diesem Fall kann diese mikroRNA mit den anderen Aufgaben, die sie in der Zelle hat, weitermachen, aber hoffentlich lässt sie STXBP1 in Ruhe. Wir haben also tatsächlich eine Reihe verschiedener potenzieller mikroRNA-Bindungsstellen auf dem STXBP1 identifiziert, und die vielversprechendste liegt in dieser letzten Schwanzregion der mRNA, die als die drei primären UTR (3' UTR) bekannt ist. Und wenn wir diese Region vergrößern, können diese Pfeile unten im Bild eine Reihe verschiedener potenzieller mikroRNA-Bindungsstellen bezeichnen. Wir können nur diese letzte Region weiter einzoomen. Wir können uns die tatsächliche Nukleotidsequenz ansehen, um herauszufinden, wo diese miR-218 binden könnte. Wir haben also etwa neun verschiedene ASOs generiert und sie an drei dieser verschiedenen potenziellen Bindungsstellen platziert, um herauszufinden, was am wirksamsten zur Erhöhung von STXBP1 beiträgt.

ASOs increase STXBP1 protein



We need to screen 100s of ASOs to find the right one!



Wenn Sie sich das Diagramm rechts im Bild oben ansehen, sehen Sie, dass einige ASOS überhaupt nicht zur Erhöhung der Expression beitragen, diese in violetter Farbe im Bild oben, andere funktionieren ein wenig und wieder andere noch besser. Es hat uns also viel Zeit und Mühe gekostet, nur diese neun verschiedenen ASOs zu screenen. Die Realität sieht jedoch so aus, dass wir Hunderte dieser verschiedenen ASOs in unterschiedlichen Konzentrationen und mit unterschiedlichen chemischen Substanzen untersuchen müssen, wenn wir ein optimales ASO finden wollen, das unserer Meinung nach die besten Chancen hat, unseren Kindern zu helfen, und das hat lange gedauert, bis mein Labor Pleite gegangen ist, weil es unsere ganze Zeit in Anspruch genommen hat. Ich freue mich daher sehr, Ihnen mitteilen zu können, dass wir **eine Partnerschaft mit Ionis Pharmaceuticals eingegangen sind, dem wirklich führenden Unternehmen auf dem Gebiet der RNA-Therapeutika, und dass sie derzeit diese ASOs für uns auf STXBP1 screenen, was sie viel besser und schneller als wir tun können.** Der andere Grund, warum ich mich über die Partnerschaft mit Ionis freue, ist, dass sie wirklich das erste Unternehmen sind, das ein ASO zur Behandlung einer Erkrankung des ZNS auf den Markt gebracht hat. Und das gibt uns einen Fahrplan, den wir versuchen können zu befolgen. Einige von Ihnen haben vielleicht schon von Nusinersen gehört, das jetzt unter dem Namen **Spinraza auf den Markt gebracht wird, ein ASO, das von Ionis zur Behandlung von spinalen Muskelatrophie entwickelt wurde.**

ASO success stories: Nusinersin



- Spinal Muscular Atrophy (SMA) – devastating neuromuscular disorder caused by insufficient SMN protein
- Nusinersin (ASO) modulates splicing of *SMN* gene, increasing SMN protein, improving motor function and extending the lifespan of affected patients

SMA ist also diese verheerende Krankheit und sie kann eine tödliche neuromuskuläre Störung sein, die durch unzureichendes SMN-Protein verursacht wird. Nusinersen ist ein ASO, das das Spleißen des SMN-Gens moduliert und dadurch das SMN-Protein erhöht. Und es hat sich jetzt gezeigt, dass dies die motorischen Funktionen verbessert und die Lebensspanne der betroffenen Patienten entscheidend verlängert. Es wird inzwischen weltweit bei über 10.000 Menschen eingesetzt. Damit haben wir also wirklich einen Fahrplan, den wir für STXBP1 ausprobieren und befolgen können. Deshalb möchte ich überlegen, wie eine ASO-Therapie für unsere Kinder aussehen könnte.

Was könnten die Vor- und Nachteile sein? Eines der Pros einer ASO ist also, dass sie klein sind. Wenn wir uns zum Beispiel die Länge der STXBP1-Kodierungssequenz ansehen, die hier im Bild unten grün dargestellt ist, dann ist es das, was wir brauchen, um in eine Zelle für eine Genersatztherapie zu gelangen. Im Vergleich dazu ist dieser kleine blaue Punkt die relative Größe einer ASO im Maßstab. Dies hilft also den ASOs, leicht in die Zellen zu gelangen. Er hilft bei der Bio-Verteilung. Es braucht also keine virale Verpackung, wie bei einer Gen-Ersatztherapie. **Und für systemische Anwendungen können diese winzig kleinen ASOs in Flaschen abgefüllt und als Pille eingenommen werden, wo sie im ganzen Körper verteilt werden.**



What would an ASO therapy look like?

STXBP1 coding sequence (1,700 bp)

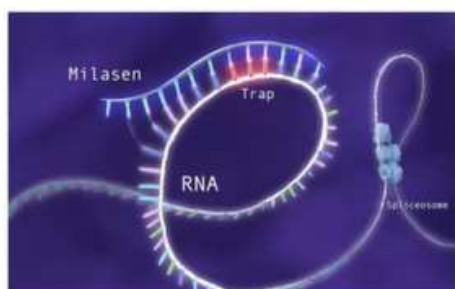
ASO (20 bp)

Pros

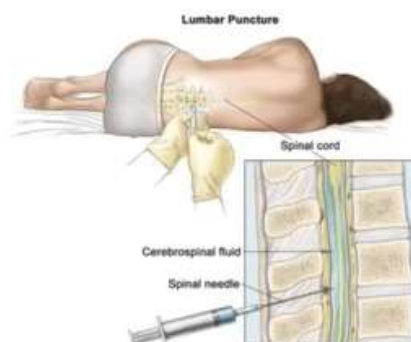
- Safety and Specificity
- Clinical efficacy
- Low cost and rapid development are possible

Cons

- Intrathecal injections
- Will it be enough?
- Will it work for all variants?



(Elena Hartley/Boston Children's Hospital)

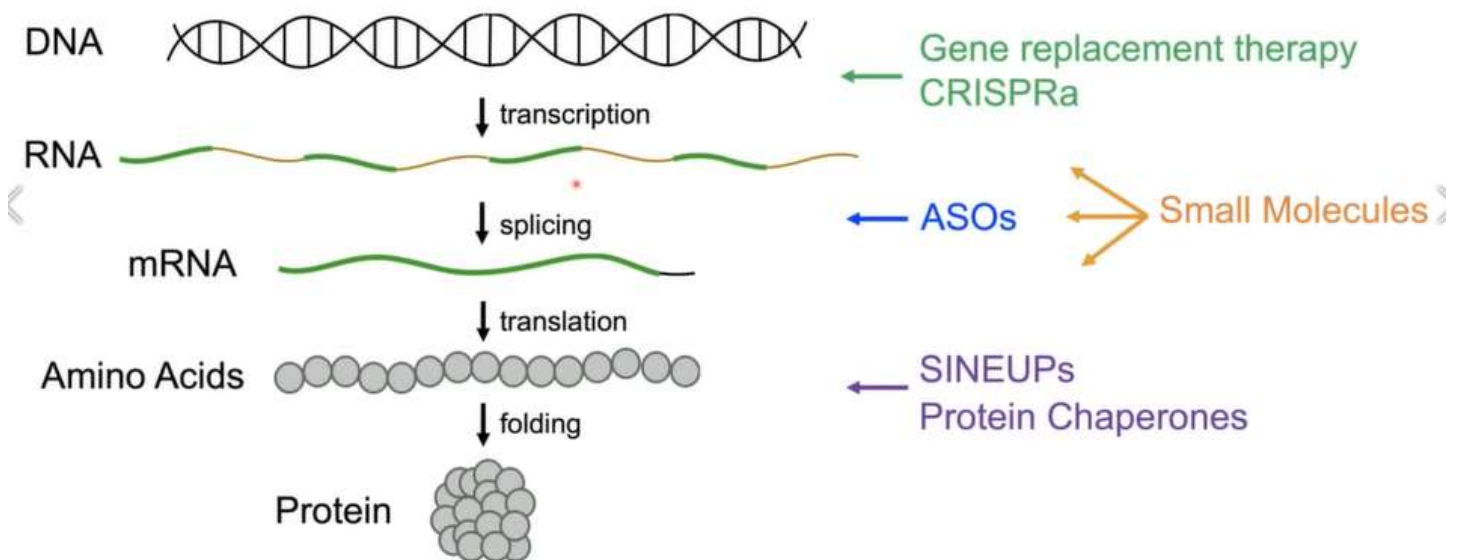


Aber für unsere Zwecke müssen sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ins Gehirn gelangen. Und das ist eine Herausforderung. Deshalb werden ASOs bei Erkrankungen des ZNS wie SMA stattdessen durch intrathekale Injektionen verabreicht. Oder durch eine Lumbalpunktion, die wahrscheinlich die meisten Eltern im Publikum mit Ihren Kindern schon einmal durchgemacht haben, und das ist nichts, was Ihnen Freude bereitet. Bei Spinraza werden diese Injektionen etwa dreimal im Jahr wiederholt. Und da die ASO-Chemie immer besser wird, halten diese Verbindungen länger im Gehirn, Sie kommen vielleicht mit weniger Injektionen aus, aber diese Injektionen sind immer noch ein Nachteil. Eine andere wichtige Frage für die ASO lautet: Wird es genug sein? Wird es uns eine genügend starke Erhöhung des STXBP1-Signals bringen, um therapeutisch wirksam zu sein, und, was wichtig ist, wird es bei allen verschiedenen Varianten von STXBP1-Erkrankungen funktionieren? Das Positive an den ASOs ist, dass sie bisher in der Klinik relativ wirksam und relativ sicher waren. **Und diese Sicherheit wird durch die Tatsache, dass es einen Aus-Schalter für die ASOs gibt**, noch verstärkt. Wenn Ihr Kind eine unerwünschte Wirkung hat, kann die Behandlung abgebrochen werden, was sich von einer DNA-basierten Intervention unterscheidet. Und der andere große Pro, und offen gesagt, der Hauptgrund, warum ich mich überhaupt mit ASOs beschäftigt habe, ist ihr Potenzial für eine rasche Entwicklung im klinischen Einsatz.

Einige von Ihnen haben vielleicht schon von Milasen gehört, einer ASO, die für einen einzelnen Patienten entwickelt wurde, und N von 1, die von ihrer Gründung bis zur Anwendung in etwa einem Jahr ging. Ich möchte darauf hinweisen, dass unsere Priorität nicht ein N von 1 ist, sondern dass Lucy, wenn sie ihre Wahl äußern könnte, sich etwas wünschen würde, das nicht nur ihr, sondern allen ihren STX-Kollegen helfen würde. Und so wird dieser Prozess etwas mehr Zeit in Anspruch nehmen, aber dieses Potenzial für eine rasche Übersetzung und dieses Potenzial für Sicherheit, Wirksamkeit und Spezifität ist es, was mich an ASOs so begeistert hat.

Ich schließe mit dieser zusammenfassenden Folie unten im Bild, und was ich für Sie mit nach Hause nehme, ist, dass es wirklich eine aufregende Zeit für die STXBP1-Forschung ist.

Take home message: An exciting time for STXBP1 therapeutic development



Die Landschaft der sich entwickelnden Therapien hat sich dramatisch entwickelt, sogar seit ich sie zum ersten Mal befragt habe, erst vor zwei Jahren, als Lucy geboren wurde. Es gibt eine Menge Fortschritte an vielen verschiedenen Fronten, darunter DNA-basierte Therapien, RNA-Therapeutika, Interventionen auf Proteinebene und sogar kleine Moleküle, auf die ich mich heute nicht konzentriert habe und die all diese verschiedenen Wege beeinflussen können. Auch wenn also COVID uns alle verlangsamt hat, und ich weiß, dass das Tempo der Wissenschaft für Eltern, auch für mich selbst, ärgerlich langsam sein kann. Ich glaube, sowohl Charlene als auch ich haben uns darüber gewissermaßen gewundert, dass selbst in den letzten sechs Monaten wie viele neue Entwicklungen parallel voranschreiten, und es hat wirklich dieses Gefühl, dass die Flut alle Schiffe anhebt. **Für mich als Wissenschaftler ist das also irgendwie aufregend. Es gibt mir als Elternteil Hoffnung.** Und ich glaube nicht, dass dies eine törichte Hoffnung ist. Ich glaube, es ist eine Hoffnung, die auf wirklich wissenschaftlich fundierten Erwartungen beruht. Um also nicht zu philosophisch zu werden, aber da ich glaube, dass Hoffnung vielleicht unsere beste Eigenschaft als Menschen ist, hoffe ich, dass die Menschen etwas von dieser Hoffnung aus dieser Präsentation mitnehmen und auf Ihre eigene Weise darauf aufbauen. Ich weiß, dass wir noch einen langen Weg vor uns haben. Es ist definitiv nicht an der Zeit, sich auszuruhen, es ist an der Zeit, dass wir uns alle gegenseitig pushen und hochheben, was diese Gemeinschaft meiner Meinung nach wirklich fantastisch macht. Ich danke Ihnen also für Ihre Zeit. Ich übergebe jetzt an Ganna, und am Ende beantworte ich gerne alle Ihre Fragen.



SINEUPs: a novel genetic therapy approach for STXPB1

G. Balagura
M.D., PhD candidate

Laboratory of Neurogenetics and Neuroscience

Pediatric Neurology and Muscular Diseases Unit

University of Genoa – "G. Gaslini" Institute



Ganna:
Hallo zusammen. Und danke Ben, für diese spannende Präsentation. Ich werde etwas tiefer auf diesen anderen Ansatz eingehen, wieder auf der Übersetzungsebene, diese SINEUPs. Aber lassen Sie mich zuerst ein wenig von uns erzählen.



Who we are and where



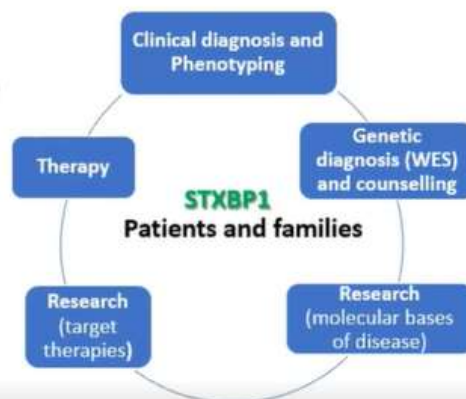
University of Genoa
«G. Gaslini» Institute



Laboratory of Neurogenetics



Prof. Federico Zara
Genetist
Focus on neurogenetics



Paediatric Neurology Unit



Prof. Pasquale Striano
Neurologist
Focus on genetic epilepsies

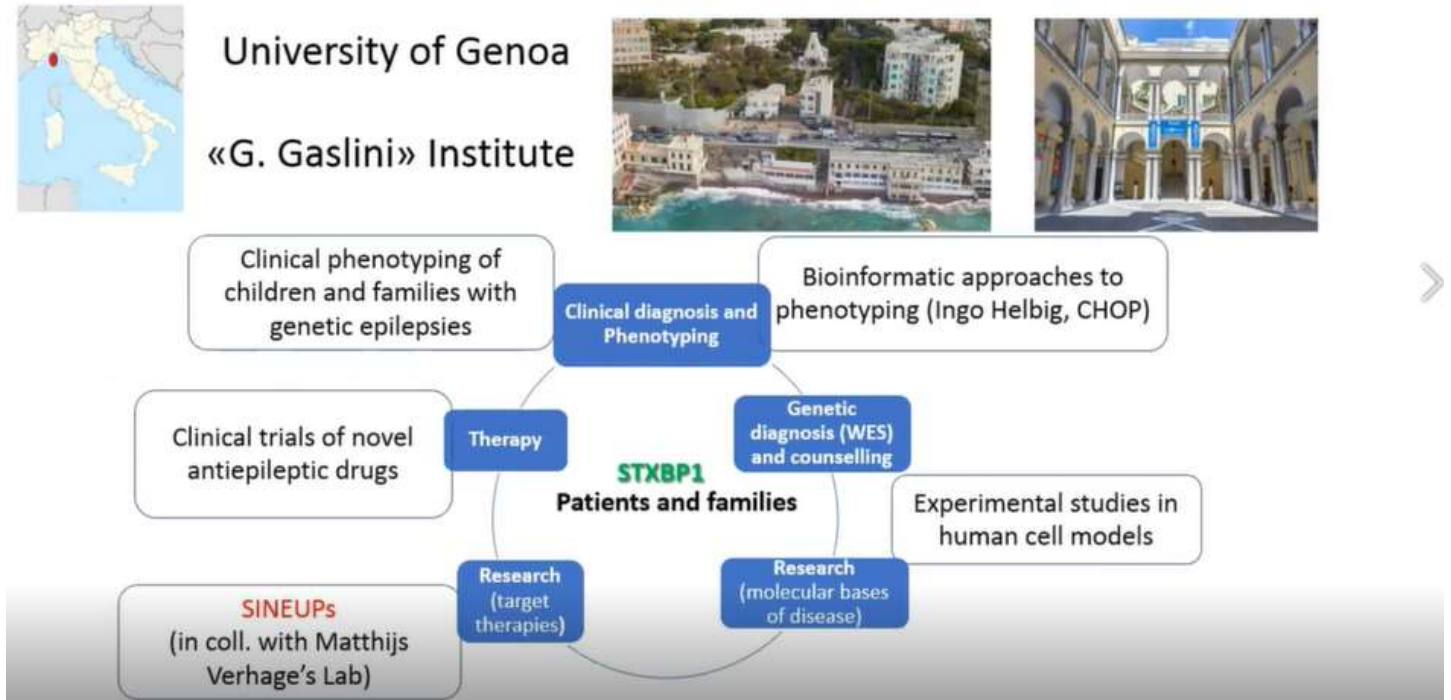
Ich möchte ein wenig Hintergrundinformationen darüber geben, wer ich bin und wer wir als Forschungsgruppe sind. Ich komme aus einer Stadt in Norditalien namens Genua. Es ist eine sehr schöne Stadt an der Küste. Ich habe dort mein Medizinstudium abgeschlossen und war dann Arzt, und ich habe mich entschieden, diesen Dokortitel in Kinderneurologie und Neurowissenschaften zu machen, weil ich mich schon immer sehr leidenschaftlich für die Forschung und insbesondere für die Neurogenetik interessiert habe. Und was ich über unsere Gruppe sagen kann, ist, dass unsere größte Stärke meiner Meinung nach die Synergie zwischen unserem Genetiklabor und unserer klinischen Einheit unter dem Vorsitz von Federico Zara und Pasquale Striano ist.

Und alle Patienten und Familien, die uns in unseren Kliniken begegnen, unterziehen sich natürlich einem klinischen Workout, zur Diagnose und schließlich zur Behandlung. Aber sie werden auch umgehend für genetische Tests in unser Labor überwiesen, und sie können auch Zugang zu einigen experimentellen Therapien erhalten, die wir in unserem Krankenhaus und in anderen Zentren der Welt ausprobieren, aber vor allem können sie direkt zu unserer Forschung beitragen, die wir in

unserem Labor erneut durchführen, und zwar sowohl zu den grundlegenden Mechanismen eben dieser Krankheiten als auch zu zielgerichteten Therapien. Und dies gilt auch für die STXBP1-Familien. Ich habe einige dieser Familien in Italien persönlich kennen gelernt, und es war mir eine große Freude. Und wir haben auch einige dieser Kinder diagnostiziert, und einige dieser Familien haben ebenfalls ihre Daten beigesteuert, und zwar **im Rahmen des Forschungsprojekts für Matthijs Verhage in Amsterdam.**



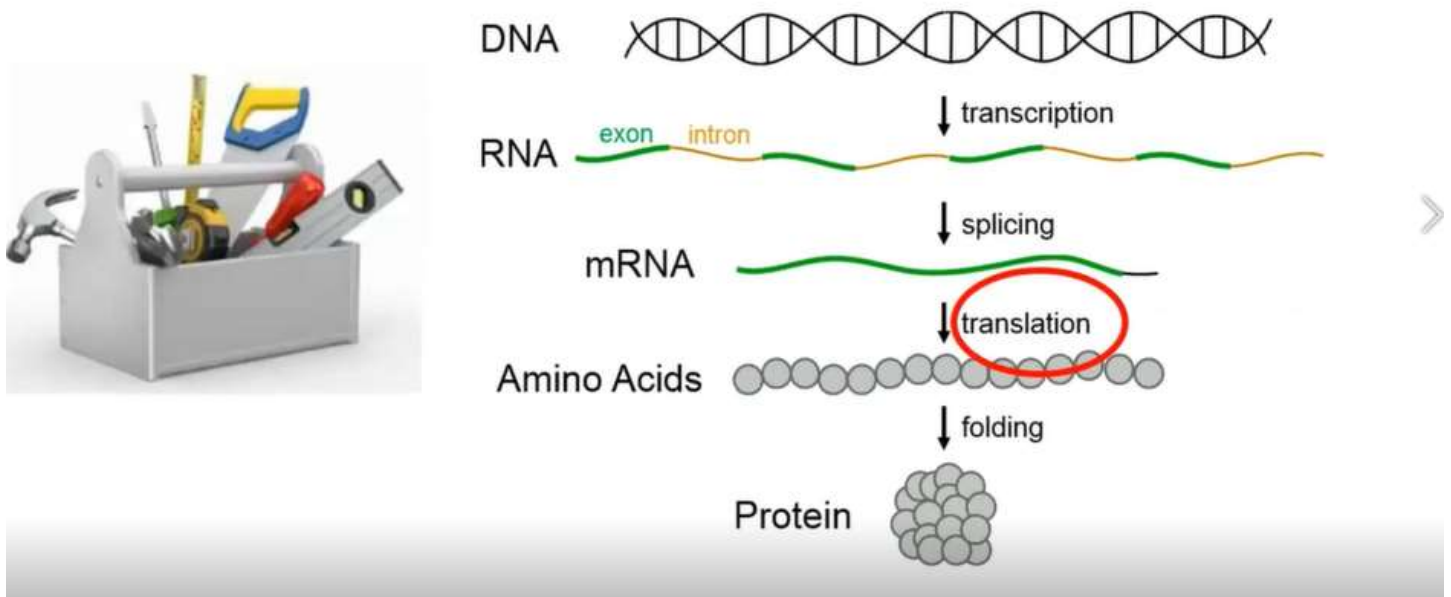
Who we are and where



Es ist also wirklich eine große gemeinschaftliche Anstrengung. Und um auf mich zurückzukommen: Während meiner Doktorarbeit hatte ich die Fähigkeit, an all diesen Schritten beteiligt zu sein. Und in letzter Zeit **habe ich mich auf diese neuartige Zieltherapie konzentriert, die SINEUPs**, über die ich jetzt mit Ihnen sprechen werde. Um also auf Bens Präsentation zurückzukommen: Wir haben wieder verschiedene Werkzeugkästen, all die verschiedenen Werkzeuge, die wir bei den verschiedenen Schritten verwenden können. Und noch einmal, das Zeug, an dem wir mit SINEUPs arbeiten, ist ein Übersetzungsschritt.



Different tools for different steps



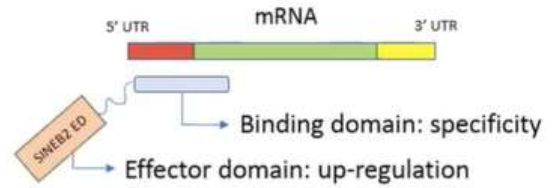
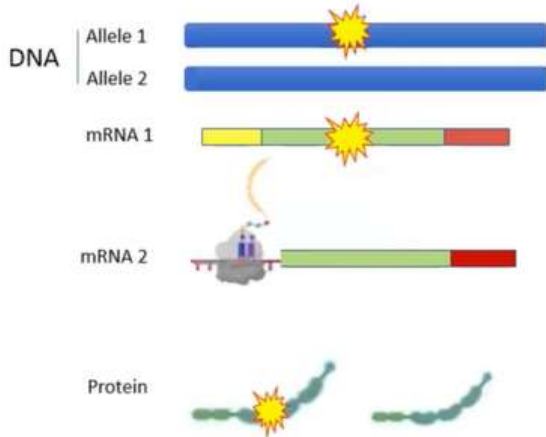
Was sind SINEUPs? SINEUPs sind Abschnitte der RNA. Wir wissen, dass nicht alle RNAs, die von der DNA transkribiert werden, zu Proteinen werden, aber diese nicht kodierenden RNAs haben eine Menge regulatorischer Funktionen, wie Ben

uns sagte, und SINEUPs sind eigentlich eine neue Klasse dieser nicht kodierenden RNAs. Dies ist eine schematische Darstellung unten im Bild, wie sie aussehen.

From junk DNA...

What are SINEUPs?

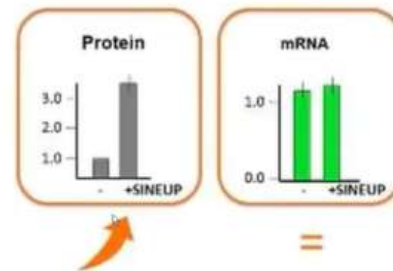
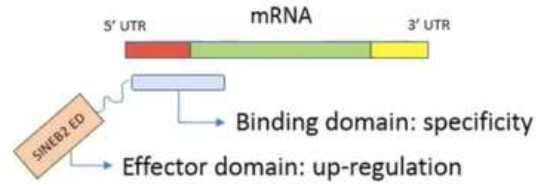
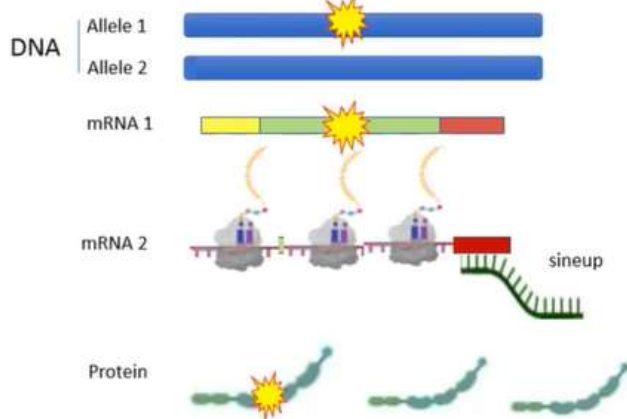
A new class of antisense long non-coding RNAs that up-regulate translation of target proteins.



From junk DNA...

What are SINEUPs?

A new class of antisense long non-coding RNAs that up-regulate translation of target proteins.



Modified from Zucchelli et al., 2015

Sie haben dieses Strukturmodell, das Sie oben im Bild sehen können, es ist eine Effektor-Domäne, die tatsächlich für ihre Aktivität und die Bindungsdomäne verantwortlich ist. Und das Schöne an den SINEUPs sind diese Bindungsdomänen, denn sie sind sehr spezifisch für ein Gen, für eine Boten-RNA, und wir können sie so gestalten, dass sie im Idealfall für jede Art von Gen spezifisch sind, auf das wir abzielen wollen, und das in diesem Fall STXBP1 sein wird. Und wie es funktioniert: Es bindet also unsere Boten-RNA, die von dem gesunden Allel stammt, weil das andere Allel geschädigt ist und es keine gesunde Boten-RNA produziert. Und aus dieser gesunden RNA ähnelt sie am ehesten der Translationsmaschinerie, die bereits daran arbeitet, die aber nicht genug Protein produzieren kann, um eine normale Funktion zu haben, und im Idealfall können wir die normale Menge an Protein retten, die wir brauchen, damit die Zellen gut funktionieren. Die Kernaussage daraus ist also, dass **SINEUPs den Proteinspiegel hochregulieren können**, den Proteinspiegel sehr spezifisch erhöhen können, aber sie berühren nicht die Boten-RNA-Spiegel.

...to novel therapeutic weapon for haploinsufficiency...



Synthetic long non-coding RNAs [SINEUPs] rescue defective gene expression *in vivo*

Alessia Indrieri¹, Claudia Grimaldi², Silvia Zucchelli^{1,2}, Roberta Tammaro², Stefano Gustincich^{1,2,3} & Brunella Franco^{1,2}

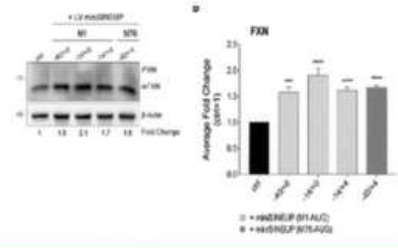
Medakafih model of microphthalmia with linear skin defects syndrome



SINEUP non-coding RNAs rescue defective frataxin expression and activity in a cellular model of Friedreich's Ataxia

Carlotta Bon^{1,2}, Riccardo Luffarelli³, Roberta Russo², Silvia Fortuni², Bianca Pierattini^{1,2}, Chiara Santulli², Cristina Fimiani², Francesca Persichetti², Diego Cotella^{2,4}, Antonello Mallamaci², Claudio Santoro⁴, Piero Carninci⁵, Stefano Espinoza¹, Roberto Testi², Silvia Zucchelli^{2,4}, Ivano Condò^{2,3,4} and Stefano Gustincich^{1,2,4}

Nucleic Acids Research, 2019, 47, doi: 10.1093/nar/gkz270



Increased protein level
Unchanged mRNA levels
Rescue of the phenotype



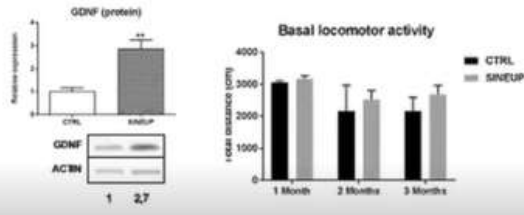
...and for neurodegenerative diseases?

Molecular Therapy
Original Article



SINEUP Non-coding RNA Targeting GDNF Rescues Motor Deficits and Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease

Stefano Espinoza¹, Margherita Scarpato¹, David Damiani¹, Francesca Managh¹, Maddalena Meres^{1,2}, Andrea Costantini¹, Omar Peruzzo¹, Piero Carninci³, Claudio Santoro⁴, Francesco Papaleo⁵, Federico Minguzzi⁶, Giuseppe Rizzuti⁷, Silvia Zucchelli⁸ and Stefano Gustincich^{1,2}



Und das ist sehr wichtig, weil es bedeutet, dass sie keine Wirkung auf die DNA haben, die unser ursprünglicher Code ist und die wir nicht wirklich berühren sollten, um unerwünschte Wirkungen zu vermeiden. SINEUPs wurden also bereits sowohl in Zellen als auch in Tiermodellen eingesetzt, und sie haben sich in einigen dieser Studien als erfolgreich erwiesen, und wo sie sich als erfolgreich erwiesen haben, haben sie wiederum den Proteingehalt erhöht. Sie veränderten die Boten-RNA-Spiegel nicht, und sie mussten auch den funktionellen Phänotyp von Mäusen oder von diesen Fischmodellen, zum Beispiel von Krankheiten, retten.

Also SINEUPs sehen tatsächlich wie ein sehr vielversprechender Ansatz aus, und zu unserem Projekt zu kommen, das ist unser Versuchsplan für STXBP1. Er gliedert sich in zwei Phasen. In der ersten Phase habe ich in Genua gearbeitet und sie abgeschlossen. Wir untersuchten diese STXBP1-SINEUPs in einer menschlichen Zelllinie ohne Gehirn. Wir hatten damit einige ermutigende Ergebnisse, und so zog ich nach Amsterdam in das Labor von Matthijs Verhage, wo ich derzeit daran arbeite, die gleichen Konstrukte an unseren Zielzellen, den Neuronen, den Gehirnzellen, zu testen.

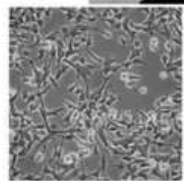
Experimental plan



1st phase: test the translational efficacy of SINEUPs in a healthy non-brain human cell line



2nd phase: test the translational efficacy and functional rescue in STXBP1+/- iPSCs-derived neurons



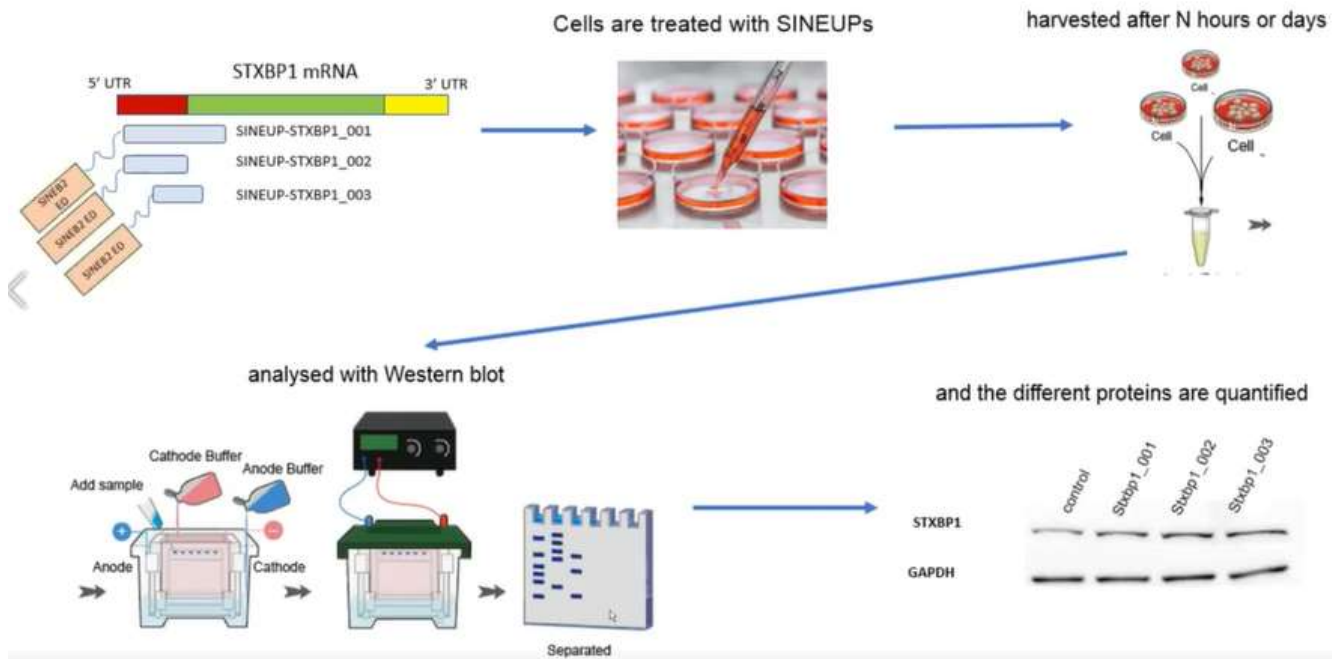
- A) SINEUP activity on STXBP1 in healthy neurons ✓
- B) SINEUP activity on STXBP1 in artificially mutated neurons (common genetic background)
- C) SINEUP activity on STXBP1 in patient-derived neurons (different genetic background)

Und auch diese zweite Phase ist wieder, in drei Phasen wie oben im Bild festgelegt. Zuerst haben wir die SINEUPs an gesunden Neuronen getestet. Jetzt gehen wir zu künstlich mutierten Neuronen über, und zwar an Neuronen, die vom Patienten stammen. Ich werde auch diese Anwendungsfälle durchgehen, aber bevor ich die Ergebnisse präsentiere, möchte

ich Ihnen ein wenig zeigen, wie diese Experimente funktionieren. Das erste, was wir also tun mussten, war, diese SINEUPs für das Ziel STXBP1 zu entwerfen.

Und wir entwarfen drei verschiedene SINEUPs, weil wir nicht wirklich vorhersagen können, welche Art von Konstrukt funktionieren kann, es ist dasselbe wie bei den Fällen von Ben. Und der Unterschied zwischen den Konstrukten ist die Länge der Bindungsdomäne. Also haben wir diese SINEUPs entworfen, wir behandeln unsere Zellen mit diesen Konstrukten, und dann ernten wir sie nach einigen Stunden oder einigen Tagen, je nach den Zellen. Also gehen im Grunde genommen alle Zellen in ein Röhrchen, aus dem wir unsere Proteine extrahieren, wir laden die Proteine in diese Maschine im Bild unten. Das klingt sehr kompliziert, die Maschine trennt unsere Proteine nach dem Gewicht. Und was wir wiederbekommen, ist dieses Bild, im Bild unten zu sehen.

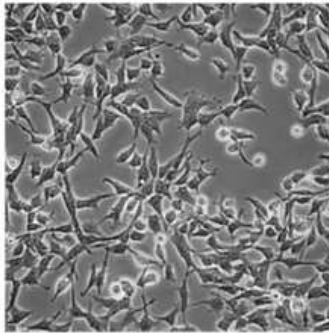
SINEUPs to target STXBP1 mRNA: experimental procedure



Und das ist ein Bild, das wir zur Quantifizierung unserer Proteinmengen verwenden. Hier sehen Sie also zum Beispiel das STXBP1-Signal in verschiedenen Behandlungsgruppen und ein Kontrollprotein, das stabil sein soll. Um also zu den Ergebnissen zu kommen, haben wir in der ersten Phase genau dies getan. Wir wählten also diese sehr häufig verwendete Zelllinie, HEK-Zellen (Menschliche embryonale Nieren), für das Screening aus, um ein erstes Screening mit unseren STXBP1-SINEUPs durchzuführen. Wir haben uns für HEK entschieden, weil diese Zellen sehr einfach zu züchten sind und weil sie sehr leicht mit anderen Verbindungen behandelt werden können. Wir haben sie also mit unseren Konstrukten behandelt und sie nach 48 Stunden geerntet und dann analysiert. Wir führten acht Experimente durch, und das sind die Ergebnisse, die wir erhielten. In dieser Grafik im Bild unten sehen Sie eine Kontrolle, das sind Zellen, die nicht mit SINEUPs getriggert werden, und dann die drei Balken, mit diesen drei verschiedenen Gruppen, die mit diesen drei verschiedenen SINEUPs behandelt wurden. Und es war tatsächlich auffällig, diesen 50%igen Anstieg in allen drei dieser Gruppen zu sehen, und zwar im Vergleich zur Kontrolle.

1st phase:

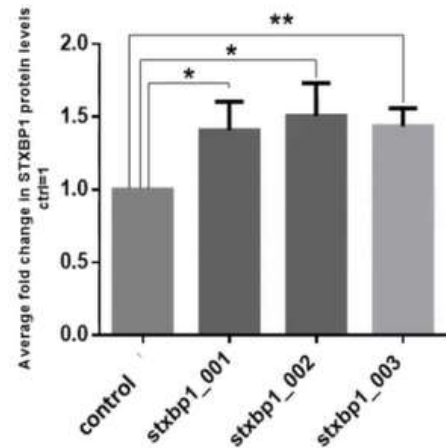
STXBP1-SINEUPs increase STXBP1 protein in healthy non-brain cells



HEK293T cells

Treated with STXBP1-SINEUPs
(plasmids)
(n = 8 experiments)

Harvested after 48 hours
and analysed



40-60% mean increase (range: 20 – 70%) in STXBP1 protein compared with - control

→ STXBP1-SINEUPs work!

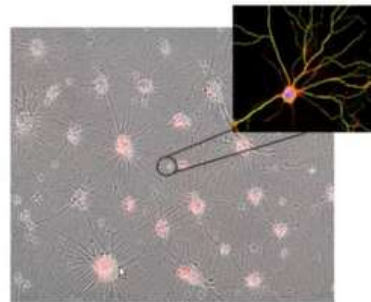
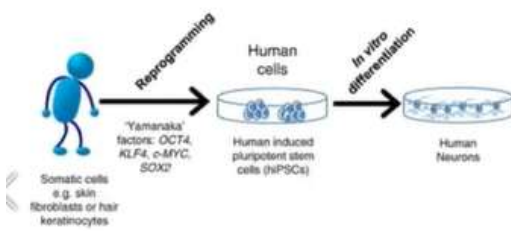
Damit hatten wir zum Beispiel den Beweis, dass STXBP1-spezifische SINEUPs funktionieren können. Angesichts dieser Ergebnisse gingen wir also zu unserer menschlichen Neuronenphase über, und diese ist noch nicht abgeschlossen. Ich werde Ihnen einige vorläufige Ergebnisse zeigen, und hier werde ich nun von Ruud Toonen, Amsterdam, koordiniert; er hilft mir wirklich. Welche Art von Neuronen werden wir verwenden? Wie kommen wir dorthin? Wahrscheinlich haben Sie in den vorangegangenen Webinaren eine sehr schöne Präsentation von Hanna und Annemiek (Amsterdam) über dieses Zellmodell gesehen.

2nd phase:

A) STXBP1-SINEUPs increase stxbp1 in healthy human neurons



Ruud Toonen
@FGA, Amsterdam



Ich werde nur noch einmal eine kleine Erklärung dazu geben. Im Grunde genommen erhalten wir also Gehirnzellen aus den induzierten pluripotenten Stammzellen, und wir erhalten diese Zellen aus Hautzellen. Mit diesem Modell können wir also im Grunde genommen menschliche Neuronen aus denselben - aus einer Person - nachbilden.

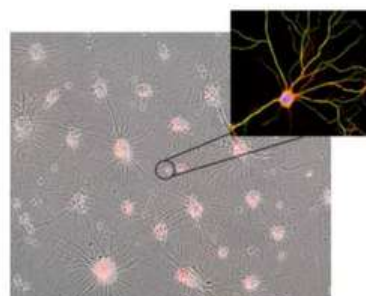
2nd phase:

A) STXBP1-SINEUPs increase stxbp1 in healthy human neurons



Ruud Toonen
@FGA, Amsterdam

Healthy human neurons
grow for 18 days
↓
Treated with STXBP1-SINEUPs
(lentivirus)¹⁴
(n=4 experiments)
↓
Harvested after 10 days (28 days-old)
and analysed



Und das gilt für gesunde Spender und auch für Patienten. Und es ist für uns ein sehr leistungsfähiges Modell, um auch zielgerichtete Therapien zu untersuchen. Damit wir auf diese menschlichen Neuronen zugreifen können, infizieren wir sie. Wir platzieren sie. Wir lassen sie für eine Weile wachsen, damit sie reifen können. Und dann, nach 18 Tagen, behandeln wir sie mit SINEUPs. In diesem Fall werden die SINEUPs in ein Virus transfiziert, weil dies für sie der einfachste Weg ist, um an die Zelle, diese Art von Zellen, heranzukommen. Wir lassen sie wachsen und ernten sie dann nach 10 Tagen. Dies ist also ein ziemlich langes Experiment. Es dauert fast einen Monat, bis wir die Behandlung für diese Zellen definitiv abgeschlossen haben. Und so sieht unsere Kultur aus.

Sie können sehen, dass die roten Punkte die Zellen sind, die tatsächlich mit diesem Virus infiziert sind. In diesem Fall haben wir also bisher diese Experimente durchgeführt, und das sind unsere Ergebnisse im Bild unten. Wir waren von diesen Ergebnissen sehr begeistert, denn wie Sie sehen können, sieht die Grafik der vorherigen sehr ähnlich. Auch hier haben wir also wieder einen Anstieg des STXBP1-Proteinspiegels um mindestens 50 %, was bestätigt, dass die früheren Ergebnisse ebenfalls gültig waren, uns aber auch sagt, dass diese STXBP1-SINEUPs wirklich auf menschliche Gehirnzellen wirken können.

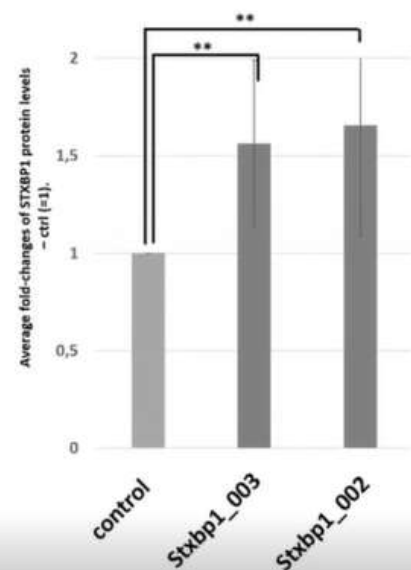
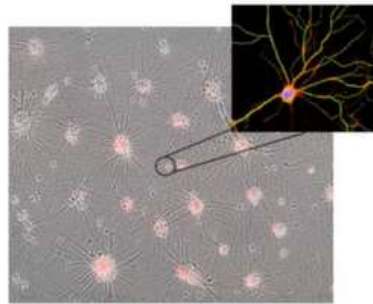


2nd phase:

A) STXBP1-SINEUPs increase stxbp1 in healthy human neurons



Ruud Toonen
@FGA, Amsterdam

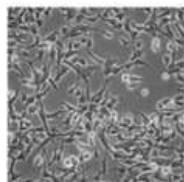


55-62% mean increase (range: 10 – 120%) in STXBP1 protein compared with - control

→ STXBP1-SINEUPs can work on human brain cells!

Und das spornt uns wirklich an, mit diesem Projekt weiterzumachen. Und vor allem, um diese Verbindungen an menschlichen Neuronen mit STXBP1-Mutationen zu testen, die so defekt im STXBP1 sind, und diese Experimente laufen jetzt, und wir erwarten einige vorläufige Ergebnisse im November, und abhängig von diesen Ergebnissen warten wir darauf, diese Verbindungen auch an von Patienten abgeleiteten Neuronen zu testen. Und wir möchten auch sehen, ob diese Erhöhung von STXBP1 tatsächlich die zellulären Phänotypen retten kann, also die funktionelle Wirkung auf die Zellen. Und ich bin wirklich hoffnungsvoll, dass wir Sie bald auf den neuesten Stand bringen können.

Conclusions



STXBP1-SINEUPs significantly increase STXBP1 protein levels by **50%** both in healthy non-brain cell line and in healthy human neurons



Ongoing

Phase 2B: test SINEUPs on human neurons with STXBP1 variants (STXBP1+/-)

(expected preliminary results in November 2020)

Perspectives

- Phase 2C: test SINEUPs on human neurons derived from STXBP1 patients
- Evaluate the effect of protein levels rescue on the functional phenotype

Und ich danke Ihnen vielmals für Ihre Aufmerksamkeit. Ich möchte meinen Mitarbeitern in Genua und in Amsterdam danken. Die Coronavirus-Pandemie war für uns eine sehr unerwartete und große Sache, aber wir haben wirklich weitergemacht. Und ich denke, es ist für uns eine sehr interessante Zeit für die STXBP1-Forschung. Ich denke, wir werden es schaffen.

LICE Foundation

The patients and their families

Lab. Neurogenetics and Neuroscience

Pia Rossi
Simona Baldassari
Floriana Fruscione
Michele Iacomino
Serena Baratto
Andrea Accogli
Federico Zara

Pediatric Neurology Unit

Pasquale Striano
Francesca Marchese

Italian Institute of Technology

Stefano Espinoza
Stefano Gustincich



CNCR, VU Amsterdam

Matthijs Verhage
Ruud Toonen

Ingrid Saarlös
Desiree Schut
Robert Zalm

Hanna Lammaertse
Annemiek Van Berkel

Thank you



Und ich möchte besonders den Familien danken, denn sie sind wirklich unsere treibende Kraft bei der Erforschung der Krankheit, Ihrer Krankheit. Vielen Dank.

Charlene:

Großartig. Vielen Dank, Ganna. Und ich danke dir, Ben. So, wir gehen jetzt weiter und beantworten einige Fragen. Danke für die Fragen bis jetzt. Wenn Sie eine Frage einreichen möchten, klicken Sie bitte auf die Schaltfläche F&A am unteren Rand Ihrer Zoomleiste und geben Sie Ihre Frage dort ein.

Also die erste Frage, und das könnte sowohl für Ben als auch für Ganna sein, in Bezug auf die verschiedenen Arten von Ansätzen, die Sie vorschlagen. Können beide Therapien für verschiedene Arten von Mutationen eingesetzt werden, wie z.B. Missense, Nonsense, Frameshift Mutationen, Stoppcodons, Spleißstellenmutationen. Und auch hier gibt es eine verwandte Frage: Erhöhen die ASOs das mutierte Allel oder das nicht-mutierte Allel?

Ben:

Vielleicht kann ich zuerst einen Versuch wagen. Ich denke, eine Sache, die es zu klären gilt, ist, dass unsere ASOs im Moment nicht allelspezifisch sind. **Daher ist es unser Ziel, die Proteinproduktion vom gesunden, normalen Allel stärker hochzuregulieren.** Und bei bestimmten Kindern könnte die ASO auch das mutierte Allel beeinflussen. Nun haben wir bei bestimmten Patienten wie meiner Tochter nachgesehen, und es gibt wirklich sehr wenig, weil es abgebaut ist. Es gibt nur sehr wenig mutierte RNA und kein mutiertes Protein, das wir zum Beispiel in ihren aus der STEM-Zelle stammenden Neuronen nachweisen können. Wir glauben also nicht, dass die Wirkung auf das mutierte Allel irgendeine Auswirkung auf die Behandlung haben wird. Bei anderen Patienten, vielleicht mit einer Missense Mutation, bei denen die Möglichkeit besteht, dass das mutierte Allel hochreguliert werden könnte, müsste man sich damit befassen. Im Moment wissen wir nicht, ob dieser Grad der Hochregulation bei diesen Proteinen problematisch sein könnte oder nicht. Sie können sich vorstellen, dass dies in einer Art kombinatorischer Therapie eingesetzt wird, unter idealen Bedingungen, mit einer Behandlung, die auch dazu beitragen kann, eine Fehlfaltung mutierter Proteine zu verhindern, wie bei einem 4-PB, mit einer Hochregulierung der Proteinproduktion. Aber das liegt sehr weit in der Zukunft. Ich denke sowohl für Ganna als auch für mich, dass unsere Ansätze nicht wirklich auf den Mutationstyp beschränkt sein sollten. **Wir versuchen einfach, mehr STXBP1-Protein aus dem normalen Wildtyp-Allel herauszubekommen, unabhängig davon, was mit der Mutation geschieht,** aber da gibt es Dinge, die in Betracht gezogen werden müssen.

Ganna:

Ja, dem stimme ich voll und ganz zu. Und ich möchte noch hinzufügen, dass diese verschiedenen Mutationstypen eigentlich einer der Gründe sind, warum wir wirklich viele verschiedene Ansätze für STXBP1 ausprobieren sollten, weil wir vielleicht an einen Punkt kommen würden, an dem wir einen Ansatz für eine Art von Mutation und einen anderen Ansatz für eine andere Art von Mutation angehen könnten. Es ist also wirklich wichtig, dass diese verschiedenen Ansätze jetzt insgesamt ausprobiert werden.

Ben:

Das ist ein toller Punkt, Ganna. Und weißt du, das verlangt von den Wissenschaftlern, sicherzustellen, dass sie die Therapien - idealerweise direkt in Patientenzellen - an Patienten mit einer Vielzahl verschiedener Mutationen aus dem gesamten Spektrum testen.

Wir können uns also diese verschiedenen Ansätze in diesen verschiedenen Kontexten ansehen.

Charlene:

Die nächste Frage richtet sich also an Ganna. Wie wird der Ansatz aussehen, um ein SINEUP im Gehirn durchzuführen?

Ganna:

Okay. Das ist eine sehr gute Frage. Und bis jetzt sind wir mit Viren verbunden, weil die SINEUPs nicht so groß sind, sie sind etwa 200 Nukleotide lang. Sie sind also eigentlich eine Art kleine Moleküle, aber trotzdem ist das zu viel, um wie RNA geliefert zu werden. Wir müssen sie also wirklich in Viren packen. Und das ist einschränkend, weil wir nicht wirklich wissen, wie wir diese Viren auf das Gehirn zuschneiden können. Wie viele Viren brauchen wir? Aber was ich sagen kann, ist, dass es Forschung gibt, über SINEUPs und ASOs, also versuchen sie, die Länge der effektiven Domäne und der Bindungsdomäne auf die minimale aktive Region zu verkürzen, so dass wir vielleicht einen ähnlichen Ansatz wie bei den ASOs verwenden könnten, um sie chemisch zu modifizieren und sie resistenter und kleiner zu machen. Und so dass sie im Grunde genommen ohne den Einsatz eines Virus verabreicht werden könnten.

Charlene:

Und noch eine Frage an Ganna: Exprimieren HEK-Zellen normalerweise STXBP1?

Ganna:

Nun, wir haben gesehen, dass STXBP1 und die Datenbanken normalerweise eine gewisse Expression von STXBP1 zeigen, wenn Sie wissen, wie die Protein- oder RNA-Datenbanken, dass es eine RNA-Expression und eine Proteinexpression von STXBP1 gibt. Wir verwenden sie auch, weil sie sehr handliche Zellen für diese Art von Screening sind, aber wir haben auch SINEUPs an anderen Arten von Zellen ausprobiert, und wir werden es wahrscheinlich auch in anderen Zellen versuchen, wo wir ebenfalls eine gewisse Hochregulation gesehen haben.

Charlene:

Nächste Frage. Und wir kombinieren hier ein paar Fragen. In der Präsentation des Verhage-Labors in der vergangenen Woche haben wir gesehen, dass viele andere Proteine zusätzlich zu STXBP1 höher oder niedriger als normal im STXBP1 sind. Wird also die Wirkung der heutigen Behandlungen auch bei diesen anderen Proteingehalten beurteilt werden? Gibt es Grund zu der Annahme, dass es eine Auswirkung geben könnte, und könnte sie sich auf die Wirksamkeit auswirken?

Ben:

Sicher. Also, ich denke, das ist ein sehr guter Punkt. **Wir glauben also, und so wurde es von der Verhage-Gruppe dargestellt, dass diese Veränderungen in diesen anderen Proteinen eine Reaktion auf die Veränderung von STXBP1 sind, das ist wirklich grundlegend für die Erkrankung.** Wenn man also von einer Gentherapie spricht, die das Potenzial hat, das, was wir für die Ursache des Problems halten, wirklich zu behandeln, dann ist zu erwarten, dass einige dieser anderen Proteinveränderungen dann in Kraft treten, weil man die Grundursache behebt, aber das ist keineswegs selbstverständlich. Und das könnte auch davon abhängen, wie früh Sie eingreifen. Da sich die Pathologie im Laufe der Zeit immer weiterentwickelt, wird die Behebung der Grundursache vielleicht immer noch vorteilhaft sein, immer noch eine Wirkung haben, aber vielleicht wird sie wegen einiger dieser anderen Veränderungen, die jetzt vorhanden sind, nicht so wirksam sein. Um die Frage beantworten zu können, wird man sie aber auf jeden Fall messen müssen. Bei all diesen therapeutischen Ansätzen werden wir also sowohl die Veränderung von STXBP1 als auch die übrigen Veränderungen der Zelle und ihrer Funktion vergleichen und wie diese im Vergleich zu einem normalen Neuron zu diesem Zeitpunkt aussehen, um zu sehen, wie nahe wir wirklich wieder an die Ausgangssituation herankommen. Und das bleibt noch zu bestimmen.

Ganna:

Ja. Von meiner Seite aus werden wir das tatsächlich untersuchen. SINEUPs sollen sehr spezifisch für STXBP1 sein, aber man muss wirklich alle anderen Off-Target-Effekte überprüfen, und das werden wir mittels Massenspektrometrie, einem Proteomik-Ansatz, tun, um wirklich zu untersuchen, was sich ändern kann, was wir vielleicht nicht erwartet haben.

Charlene:

Die nächste Frage bezieht sich also auf die Kosten der Behandlung, und vielleicht werde ich das an Ben weiterleiten, da es zugelassene ASOs im Gegensatz zu SINEUPs gibt.

Ben:

Ja. Also, wir können natürlich nicht genau vorhersagen, wie hoch die Kosten der Behandlung sein werden, und das hängt von den Versicherungsgesellschaften ab, das hängt von dem Land ab, in dem Sie behandelt werden. **Aber im Prinzip ist eines der Dinge, die wir an ASOs mögen, dass sie billig sein sollten.** Das sind sie, sie sind billig in der Herstellung. **Im Gegensatz zur Gentherapie, bei der man eine Menge Viren produzieren muss, die natürlich ziemlich teuer sein können.** Ich würde also sagen, dass die grundlegenden Kosten für die Herstellung und Bereitstellung einer ASO im Vergleich zu einigen der anderen Therapien, über die wir sprechen, relativ gering sind, aber die endgültigen Kosten hängen natürlich von vielen verschiedenen Faktoren ab, über die wir keine Kontrolle haben.

Ganna:

Ja. Das ist etwas, dem ich auch zustimme, und ich glaube wirklich, dass wir mit der Ausbreitung dieser neuen Therapien die Kosten für andere, sagen wir, Gene oder andere Krankheiten, die mit dieser Art von Ansatz zugänglich sind, wie ASOs oder andere Arten von Vektoren, wirklich senken können. Und wir sollten wirklich daran arbeiten, den Preis für Verabreichungssysteme zu senken, sie so weit wie möglich zu standardisieren, damit wir auch schneller vorankommen, denselben Ansatz auf wahrscheinlich eine andere Erkrankung umlenken und dann den Preis senken können.

Charlene:

Das ist großartig. Ganna, das ist eine Frage an Sie.

Was wird in Phase zwei B Ihres Projekts untersucht, das sich von den ersten beiden Phasen unterscheidet?

Ganna:

Ja, es tut mir leid. Ich habe wahrscheinlich nicht so sehr darauf hingewiesen, aber in den ersten beiden Phasen haben wir gesunde Zellen verwendet. Wo also beide Allele gesund waren und Boten-RNA produzierten. In der zweiten B-Phase werden wir einige Mutationen auf dem gleichen genetischen Hintergrund wie unsere gesunden Neuronen verwenden, so dass im Grunde genommen die einzige Variable, die wir haben, diese verschiedenen Mutationen in verschiedenen Zelllinien sind. Und wir werden sehen, ob das SINEUP bei einem haploinsuffizienten Hintergrund, der unsere Patienten und unsere Kinder nachahmt, immer noch so gut funktionieren kann.

Charlene:

Großartig. Und es gab tatsächlich auch eine Frage, die im Chat gestellt wurde. Über die verbindliche Spezifität der SINEUPs. Ist es also möglich, dass die SINEUPs, an denen Sie an diesem Ziel STXBP1 arbeiten, an zusätzliche oder andere Gene binden können?

Ganna:

Ja, es gibt die theoretische Möglichkeit. Auch hier sind wir uns theoretisch ziemlich sicher, dass sie spezifisch ist, aber wir werden sie erneut analysieren, und zwar sowohl mit bioinformatischen Werkzeugen, um diese Sequenz im Grunde genommen in das gesamte Genom zu sprengen, als auch um zu sehen, wo die anderen Stellen, wo diese andere Boten-RNAs

oder nicht-kodierende RNAs binden könnten. Und wir werden auch wieder einige sehr umfangreiche Proteomik-Screenings auf Off-Target-Effekte durchführen. Ja, es gibt also eine theoretische Möglichkeit, aber diese Ansätze sollen sehr spezifisch sein, weil wir bei STXBP1 wirklich so weit planen, wie wir wollen, aber wir können das nicht völlig ausschließen.

Charlene:

Ich weiß, dass wir ein wenig überzogen sind, aber ich wollte nur noch eine Frage stellen. Vorzeitige Stoppcodons führen zu einem abgeschnittenen Protein, das eine gewisse Funktion behalten kann, je nachdem, welche Teile der Struktur erhalten bleiben. Ist dies der Grund dafür, dass ein Patient eine schwerwiegendere Krankheit erfährt? Welche Rolle spielen die Instabilität und die veränderte Struktur des Proteins, je nachdem, wo sich die Mutation in der Domäne befindet?

Ben:

Vielleicht kann ich das kommentieren. Es ist ein sehr aufschlussreicher Kommentar. Typischerweise hat man bei vorzeitigen Abbruch-Codons mehrere Systeme in der Zelle, die normalerweise gut in der Lage sind, diese abgeschnittenen Produkte auszusortieren. Sowohl auf der RNA-Ebene als auch auf der Ebene der Proteine wird dies durch einen Prozess abgebaut, der als unsinnig vermittelter Zerfall bezeichnet wird, und diese Proteine neigen dazu, sehr instabil zu sein. Daher ist STXBP1 an sich selbst, selbst unter guten Bedingungen, ein ziemlich instabiles Protein. Wenn man also vorzeitige Abbruch-Codons hat und ein verkürztes Protein produziert, dann wird angenommen, dass diese Proteine zunehmend instabiler werden und wahrscheinlich dann von der zellulären Maschinerie abgebaut werden. Wir sind also der Meinung, dass dies erst noch wirklich fest etabliert werden muss, aber ich denke, die vorherrschende Idee ist, dass dieses Protein aus der Zelle entfernt wird. Und das wirkliche Problem ist dann einfach ein Mangel an genügend STXBP1, einem Protein, das seine Aufgabe erfüllen kann, was damit zu tun haben könnte, was unserer Meinung nach zum Ergebnis im Patienten beiträgt. Was die Frage betrifft, wo die Mutation liegt, so kann man argumentieren, dass man, wenn die Mutation ganz am Ende des Proteins liegt, vielleicht etwas macht, das fast seine volle Länge hat, aber wir wissen auch, dass es Mutationen bei Patienten gibt, die, wie Sie wissen, eine sehr schwere Störung haben, die sogar ganz am Ende des Proteins selbst liegt. Und so, und es gibt zu diesem Zeitpunkt keinen klaren Zusammenhang zwischen dem Ort, an dem diese Mutation liegt, und dem Schweregrad der klinischen Präsentation. Und das ist es, was viele Wissenschaftler zu der Annahme veranlasst, dass es nur die Tatsache ist, dass Sie das STXBP1-Protein in all diesen verschiedenen Fällen verlieren, und das ist es, was die Präsentation der Krankheit vorantreibt.

Charlene:

Ich danke Ihnen. Es gibt also ein paar Fragen zu 4-Phenylbutyrat, und wir haben Jacqueline Burre und ihr Labor sowie Zach Grinspan, die nächste Woche am 22. Ich möchte die Teilnehmer dazu ermutigen, an diesem Webinar teilzunehmen, da sie dann in der Lage sein werden, sich eingehend damit zu beschäftigen. Und es tut mir leid, aber ich kann nicht widerstehen, Ihnen noch eine weitere Frage zu stellen. Was ist der beste Weg, die Entwicklungen bei Ihren beiden Studien und bei Ganna zu verfolgen, vielleicht wollen Sie zuerst antworten und dann Ben?

Ganna:

Nun, ich denke, ich präsentiere sehr vorläufige Ergebnisse. Ich kann also nicht wirklich sagen, wie lange es dauern würde. Wir können wieder mit November rechnen. Und ich denke, wahrscheinlich wären wissenschaftliche Konferenzen der erste Ort, an dem wir sie tatsächlich öffentlich machen könnten. Aber natürlich werden wir Sie als Verbände und Eltern wirklich auf dem Laufenden halten.

Ben:

Ja, ich glaube, das ist eine sehr schwer zu beantwortende Frage. Und das ist für mich jetzt irgendwie ein seltsames Gebiet, da wir anfangen, mehr mit dem pharmazeutischen Sektor, mit dem Biotech-Sektor, mit Patentanwälten usw. zu interagieren. Es ist also nicht so einfach, alle unsere Ergebnisse so einfach darzustellen, wie wir es vielleicht gerne tun würden. Und so denke ich, wenn es signifikante, sinnvolle Aktualisierungen gibt, dann bin ich ein hoffnungsvolles Elternteil. **Ich bin ein optimistisches Elternteil. Ich denke, Hoffnung ist ein mächtiges Werkzeug. Ich möchte anderen Eltern das geben.** Wenn wir also diese Meilensteine erreicht haben, werde ich die Stiftung wissen lassen, in welcher Form auch immer, die ich aufgrund unserer Arbeitsbeziehungen offenlegen darf. Und ich denke, das ist wirklich alles, was ich dazu sinnvoll kommentieren kann. Abonnieren Sie also zu diesem Zweck unseren Newsletter.

Charlene:

Ja. Und wir versuchen definitiv, die Leute über Neuigkeiten auf dem Laufenden zu halten. Bitte abonnieren Sie also den Newsletter und gehen Sie auch auf unsere Facebook-Seite. Nun, vielen Dank, Ganna und Ben, dass ihr heute unserer STXBP1-Community vorgestellt habt, und vielen Dank an alle, die mitgemacht haben. Wir werden die Aufnahme in den nächsten Tagen auf unserer Website veröffentlichen und sie untertiteln. Das sollte also bei einigen technischen Begriffen helfen. Unsere nächste Sitzung ist an diesem Samstag, dem 19. September, um 12:00 Uhr Ost 18:00 Uhr MEZ, und Wendy Chung von Simons wird ein Update unseres STXBP1-Registers sowie Simons Searchlight vorstellen. Sie können sich für dieses und weitere Webinare auf unserer Website unter STXBP1disorders.org/webinar-series anmelden. Und verpassen Sie nicht

den Rest unserer Aktivitäten im Monat der Sensibilisierung, einschließlich unserer vierten jährlichen Veranstaltung Move to Cure. Vielen Dank an alle. Und ich wünsche Ihnen einen schönen Tag und einen schönen Abend.