

## Poster P.07.40

### EXCITATORY/INHIBITORY UNBALANCE IN ATAXIA TELANGIECTASIA AND NEW THERAPEUTICAL INTERVENTIONS

**Focchi E.**<sup>[1]</sup>, Pizzamiglio L.<sup>[1]</sup>, Cambria C.<sup>[1]</sup>, Murru L.<sup>[2]</sup>, Passafaro M.<sup>[3]</sup>, Antonucci F.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto di neuroscienze del CNR ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>~ Italy

Ataxia Telangiectasia (A-T) is a rare genetic disorder caused by mutations in the ATM gene and characterized by ataxic movements, immune dysfunctions and genomic instability. Also cognitive disabilities are largely described in A-T patients. Even if ATM roles during cell division have been largely addressed, a large body of evidence clearly demonstrate new roles also in adult neurons, suggesting the lack of a complete understanding of its functions.

To directly address these new roles of ATM in neurons, supported by the evidence that cognitive defects occur also in presence of residual ATM activity, we took advantage of both ATM<sup>+/-</sup> and ATM<sup>-/-</sup> mouse models. Since its fundamental role in cognition we focused on the hippocampus, finding that the halving of ATM is sufficient to induce an excitatory-to-inhibitory unbalance, towards inhibition, as indicated by in vitro and in vivo electrophysiology. We also found that both ATM<sup>+/-</sup> and ATM<sup>-/-</sup> hippocampal neurons show an increased density of inhibitory synapses but, interestingly, only in ATM<sup>-/-</sup> neurons the evoked release and release probability at inhibitory synapse are potentiated. Also, both genotypes display a precocious development of the inhibitory system as indicated by the premature excitatory-to-inhibitory switch of GABA. This process is known to be triggered by the cotransporter KCC2, which we found more abundant in both genotypes. A clear link between KCC2 expression and increased ERK1/2 phosphorylation through the rapid activation of the transcription factor Egr4 was demonstrated. Indeed, by a Dual-luciferase reporter assay, we found a significantly potentiated Egr4 activation of KCC2b promoter in the ATM <sup>+/-</sup> model and increased ERK1/2 phosphorylation. Interestingly, in the ATM<sup>-/-</sup> we suggest a different mechanism based on the increased expression of the epigenetic regulator Mecp2, indicating that different transcriptional events occur, both responsible for a more inhibited system. Thus, the importance to find new therapeutic interventions for the treatment of cognitive defects in A-T. For this purpose, we tested the chronic administration of fluoxetine, since its effectiveness in downregulating hippocampal GABAergic transmission. We daily treated pregnant ATM<sup>+/-</sup> dams from gestational day 10 to delivery with 10 mg/kg fluoxetine. P40 offspring from fluoxetine-treated dams and controls (from saline-treated dams) were tested for spontaneous alternation behavioural test. We interestingly found that prenatal fluoxetine is able to prevent the cognitive impairments revealed by spontaneous alternation test at least in ATM<sup>+/-</sup> animals. We also collected indications that chronic fluoxetine could rescue cognitive disabilities by its administration in young-adult ATM<sup>-/-</sup> mice (P40-P50).

These data reveal novel roles of ATM in the mouse hippocampus and its involvement in unsuspected cellular pathways, laying the basis for a clearer comprehension of cognitive defects occurring in A-T and for new therapies.

Sbilanciamento tra eccitazione ed inibizione nell'A-T e nuovi approcci terapeutici

L'Atassia Telangectasia (A-T) è una malattia genetica rara, a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni a livello del gene ATM (A-T mutated). La malattia è caratterizzata da movimenti atassici, causati da atrofia cerebellare, instabilità genomica e disordini immunitari. Anche difetti cognitivi sono stati ampiamente descritti nei pazienti A-T.

Al fine di indagare il coinvolgimento di ATM nei disturbi cognitivi osservati nei pazienti A-T, supportati dall'evidenza che questi si verificano anche in presenza di residua attività della proteina ATM, abbiamo sfruttato sia il modello murino ATM<sup>-/-</sup> che l'ATM<sup>+/-</sup>, focalizzandoci sull'area cerebrale principalmente deputata ai processi cognitivi: l'ippocampo.

Abbiamo dimostrato che la riduzione del 50% di ATM è sufficiente a determinare uno sbilanciamento tra eccitazione e inibizione, a favore dell'inibizione, in neuroni ippocampali, in vitro e in vivo. In linea, sia i neuroni ATM<sup>-/-</sup> che l'ATM<sup>+/-</sup>, mostrano un aumento delle sinapsi inibitorie (vGAT positivi), ma solo nei neuroni ATM<sup>-/-</sup> il rilascio evocato e la probabilità di rilascio delle sinapsi inibitorie sono potenziati. Entrambi i genotipi mostrano uno sviluppo precoce del sistema inibitorio dovuto ad un anticipato "switch del GABA", determinato da un'aumentata espressione del co-trasportatore KCC2. È stato dimostrato un legame tra KCC2 e l'aumento della fosforilazione di ERK1/2 attraverso la rapida attivazione del fattore di trascrizione Egr4. A riguardo, abbiamo rilevato un aumento dell'attività di Egr4 sul promotore di KCC2 nel modello ATM<sup>+/-</sup> e un aumento della fosforilazione di ERK 1/2. Nel modello ATM<sup>-/-</sup> invece, abbiamo individuato un meccanismo di regolazione diverso che si basa sull'aumento dell'espressione del fattore di regolazione epigenetico Mecp2. Data l'importanza di identificare nuovi approcci farmacologici per il trattamento dei difetti cognitivi associati all'A-T, abbiamo testato l'efficacia del farmaco fluoxetina. È stato infatti dimostrato che la somministrazione cronica di fluoxetina è in grado di normalizzare la trasmissione GABAergica ippocampale. Abbiamo trattato femmine gravide ATM<sup>+/-</sup> dal decimo giorno di gravidanza fino al parto, come descritto in letteratura. A 40 giorni di età la prole è stata sottoposta a test comportamentali che ci hanno permesso di dimostrare come il trattamento prenatale con fluoxetina sia in grado di prevenire i difetti cognitivi osservati in animali eterozigoti di controllo. Abbiamo inoltre osservato che la fluoxetina è in grado di migliorare i difetti cognitivi anche quando somministrata in cronico direttamente nell'animale giovane adulto ATM<sup>-/-</sup>.

Nel complesso il lavoro svolto ha permesso di chiarire i meccanismi molecolari responsabile dell'aumentato tono inibitorio a livello ippocampale in animali ATM<sup>-/-</sup> che l'ATM<sup>+/-</sup>, nonché di identificare un nuovo approccio farmacologico per i difetti cognitivi nell'A-T.

Allen DM, van Praag H, Ray J et al. Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis.

Genes Dev 2001;15:554 -566.

Bianchi P, Ciani E, Guidi S, Trazzi S, Felice D, Grossi G, Fernandez M, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi

R. Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model

for Down syndrome. J Neurosci. 2010 Jun 30;30(26):8769-79.

Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends

Atassia Telangectasia

Coordinator: Flavia Antonucci

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16015

**Disease Name:**

Ataxia Telangiectasia

**Keywords:**

hippocampus, excitatory/inhibitory balance, drug repositioning