

## Poster P.08.44

### DELINEATING THE MOLECULAR PATHWAY AND PATHOGENIC MECHANISM UNDERLYING AUTOSOMAL DOMINANT LATERAL TEMPORAL EPILEPSY (ADLTE)

Dazzo E.<sup>[1]</sup>, Baldassari S.<sup>[2]</sup>, Fruscione F.<sup>[2]</sup>, Sterlini B.<sup>[3]</sup>, Corradi A.<sup>[4]</sup>, Romei A.<sup>[4]</sup>, Benfenati F.<sup>[4]</sup>, Zara F.<sup>[2]</sup>, **Nobile C.\*<sup>[1]</sup>**

<sup>[1]</sup>CNR-Neuroscience Institute ~ Padova ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute G. Gaslini ~ Genova ~ Italy, <sup>[3]</sup>University of Genoa ~ Genova ~ Italy, <sup>[4]</sup>Istituto Italiano di Tecnologia ~ Genova ~ Italy

Autosomal dominant lateral temporal epilepsy (ADLTE; OMIM 600512) is a genetically heterogeneous focal epileptic syndrome clinically characterized by seizures with prominent auditory symptoms (1). We previously identified mutations causing ADLTE in the brain-expressed LGI1 and Reelin genes, both encoding secreted proteins. Altogether, these genes are mutated in about 50% of families (2). As part of this Telethon project, we recently identified the third ADLTE-causing gene, MICAL-1, which encodes a cytoplasmic protein that modulates actin cytoskeleton dynamics, suggesting dysregulation of actin cytoskeleton remodeling in neurons as a likely pathogenic mechanism underlying ADLTE (3). There is no biochemical or functional evidence in the literature linking Lgi1 and Reelin proteins or signaling pathways. We found evidence that Lgi1 and Reelin directly interact in different cell lines overexpressing Lgi1, or an Lgi1-glycophosphatidylinositol fusion protein, by double immunofluorescence and co-immunoprecipitation experiments. Moreover, we found that Lgi1 interacts with the N- and C-terminal Reelin regions but not with the central region containing the binding sites for the canonical Reelin receptors ApoER2 and VLDLR. Thus, Lgi1 and Reelin may act together to regulate the molecular pathway underlying ADLTE.

To study the effects of Reelin mutations, we developed a cell-based secretion test, which showed that ADLTE-causing mutations abolish or strongly reduce secretion of Reelin in heterologous cells. Moreover, we found evidence that this loss-of-function effect results from impaired trafficking of mutant proteins through the Golgi apparatus and protein degradation due to activation of the autophagy pathway, as shown by accumulation of autophagy markers p62 and LC3 in the cells. These results provide evidence for a common mechanism to the various Reelin mutations, implying retention of misfolded mutant proteins at the endoplasmic reticulum followed by their rapid degradation.

We also aim to study the effect of LGI1 mutations on neuronal morphology and maturation by studying the phenotype of human neurons (iN) differentiated from induced pluripotent stem cells of 3 patients (4,5,6) at different days of differentiation (DIV):7,14,21,35,45. A non-significant reduction of LGI1 cellular expression in iNs lysates was observed in the late time-points by Western Blot (WB), whereas a reduction of the secreted protein was observed in the medium by ELISA at 35-45DIV for mutant genotypes. Morphological Sholl analysis showed a slight retardation in the dendritic organization and smaller soma size were observed at 7-14DIV, that were rescued at later DIV. We also counted pre- and post-synaptic boutons by immunofluorescence (IF)(7) and found no significant alterations in patients compared to the controls. Normal expression of synaptic proteins was also detected by WB. Our data showed no morphological abnormalities underlying LGI1 mutations.

L'epilessia temporale laterale autosomica dominante (ADLTE; OMIM 600512) è una sindrome epilettica familiare caratterizzata clinicamente da crisi epilettiche con sintomi uditivi (1). In precedenza, il nostro gruppo identificò mutazioni che causano l'ADLTE in due geni espressi nel cervello, LGI1 e Reelin, che codificano per proteine secrete. Complessivamente, questi due geni sono mutati in circa il 50% delle famiglie (2). Come parte di questo progetto Telethon, abbiamo di recente identificato il terzo

gene causativo dell'ADLTE, MICAL-1, che codifica per una proteina implicata nella regolazione del citoscheletro cellulare, suggerendo il malfunzionamento del rimodellamento del citoscheletro nei neuroni come probabile meccanismo patogenetico dell'ADLTE (3).

Finora, non sono state riportate interazioni biochimiche o funzionali tra Lgi1 e Reelin. Abbiamo trovato evidenze che Lgi1 e Reelin interagiscono direttamente in diverse linee cellulari che esprimono Lgi1 mediante esperimenti di doppia immunofluorescenza e co-immunoprecipitazione. Inoltre, abbiamo trovato che Lgi1 interagisce con le regioni N- e C-terminale di Reelin, ma non con la regione centrale che contiene i siti di legame per i recettori canonici di Reelin, ApoER2 e VLDLR. Questi risultati indicano che Lgi1 e Reelin potrebbero agire insieme per regolare il meccanismo molecolare alla base dell'ADLTE.

Per studiare gli effetti delle mutazioni in Reelin, abbiamo messo a punto un test di secrezione da cellule in coltura, il quale ha dimostrato che mutazioni responsabili dell'ADLTE aboliscono o riducono fortemente la secrezione di Reelin in cellule eterologhe. Inoltre, abbiamo trovato che questa perdita di funzione è il risultato di un blocco del traffico delle proteine mutate lungo la via secretoria e della conseguente degradazione delle proteine mutate dovuta alla attivazione del meccanismo della autofagia. Questi risultati dimostrano l'esistenza di un meccanismo comune alle varie mutazioni di Reelin, che implica la rapida degradazione delle proteine mutate strutturalmente anomale.

Abbiamo analizzato l'effetto delle mutazioni di LGI1 sulla morfologia e la maturazione neuronale studiando il fenotipo dei neuroni umani (iN) differenziati dalle cellule staminali pluripotenti indotte di 3 pazienti (4,5,6), a diversi giorni di differenziamento (DIV): 7,14,21,35,45. È stata osservata una riduzione non significativa dell'espressione cellulare di LGI1 su lisati di iNs nei pazienti mediante Western Blot (WB) mentre è stata osservata una riduzione della proteina secreta a 35-45DIV, mediante ELISA. L'analisi morfologica Sholl ha mostrato un leggero ritardo nell'organizzazione dendritica e nelle dimensioni del soma a 7-14DIV, recuperata tuttavia nei DIV successivi. Inoltre non abbiamo riscontrato alterazioni significative nel numero di bottoni pre- e post-sinaptici nei pazienti rispetto ai controlli mediante immunofluorescenza (IF) (7) e nell'espressione di numerose proteine sinaptiche mediante WB.

1) Michelucci R, Nobile C. Autosomal Dominant Epilepsy with Auditory Features. 2007 Apr 20 [Updated 2019 Jan 10]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1537/>

2) Michelucci R, Pulitano P, Di Bonaventura C, Binelli S, Luisi C, Pasini E, Striano S, Striano P, Coppola G, La Neve A, Giallonardo AT, Mecarelli O, Serioli E, Dazzo E, Fanciulli M, Nobile C. The clinical phenotype of autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy related to reelin mutations. *Epilepsy and Behavior* 68:103-107, 2017.

3) Dazzo E, Rehberg K, Michelucci R, Passarelli D, Boniver C, Vianello Dri V, Striano P, Striano S, Pasterkamp RJ, Nobile C. Mutations in MICAL-1 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Annals of Neurology* 83:483-493, 2018.

4) Striano P, Busolin G, Santulli L, Leonardi E, Coppola A, Vitiello L, Rigon L, Michelucci R, Tosatto SC, Striano S, Nobile C. Familial temporal lobe epilepsy with psychic auras associated with a novel LGI1 mutation. *Neurology*. 76:1173-1176, 2011.

5) Di Bonaventura C, Operto FF, Busolin G, Egeo G, D'Aniello A, Vitello L, Smaniotta G, Furlan S, Diani E, Michelucci R, Giallonardo AT, Coppola G, Nobile C. Low penetrance and effect on protein secretion of LGI1 mutations causing autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Epilepsia*. 52:1258-1264, 2011.

6) Pizzuti A, Flex E, Di Bonaventura C, Dottorini T, Egeo G, Manfredi M, Dallapiccola B, Giallonardo AT. Epilepsy with auditory features: a LGI1 gene mutation suggests a loss-of-function mechanism.

Ann Neurol. 53: 396-399, 2003 . Erratum in: Ann Neurol. 54:137, 2003.

7) Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA. The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. Proc Natl Acad Sci U S A. 112: E4129-4137, 2015.

Epilessia temporale laterale autosomica dominante

Coordinator: Carlo Nobile

Partner: Federico Zara

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

**Telethon Project (nr):**

GGP15229

**Disease Name:**

Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy

**Keywords:**

Temporal lobe epilepsy, Reelin, iPSC