

Poster P.08.48

SOLVING THE PUZZLE OF PROTOCADHERIN-19 MOSAICISM TO UNDERSTAND THE PATHOPHYSIOLOGY OF PCDH19 FEMALE EPILEPSY (PCDH19-FE)

Mazzoleni S.^[1], Lamers D.^[2], Murru L.^[3], Passafaro M.^[3], Ratto G.M.^[2], Bassani S.*^[3]

^[1]CNR, Institute of Neuroscience and Biometra Dept., University of Milan ~ Milano ~ Italy, ^[2]NEST, Scuola Normale Superiore and Istituto Nanoscienze CNR ~ Pisa ~ Italy, ^[3]CNR, Institute of Neuroscience ~ Milano ~ Italy

Mutations in the X-linked gene PCDH19 cause early infantile epileptic encephalopathy-9 (EIEE9), a neurodevelopmental disorder characterized by clusters of seizures with onset in infancy, intellectual disability and autistic features (Dibbens et al. 2008; Kolc et al., 2018). The peculiarity of EIEE9 is that it affects females with PCDH19 heterozygous mutations while it spares males, with the exception of somatic mosaic males (de Lange et al. 2017). Therefore, a cell-interference model has been proposed (Depienne et al. 2009), according to which the coexistence of PCDH19-positive and PCDH19-negative neurons would scramble cell-cell communication and neuronal network functioning.

To validate this hypothesis and investigate EIEE9 underpinning mechanisms, we exploited two models of PCDH19 mosaicism by using the PCDH19 floxed mouse generated in the laboratory: the Cre recombinase was delivered either locally in the cortex of postnatal mice, by injection of adeno-associated vectors (AAVs), or in the whole brain, by crossing PCDH19 floxed mice with hSyn1-Cre mice to prevent PCDH19 expression from the embryonic development.

In vivo electrophysiological studies in anesthetized mice show that a PCDH19 mosaic patch in the visual cortex is associated with the disruption of slow wave activity (SWA) and causes transient episodes of hyperexcitability and hypersynchronous activity. Combined local field potential (LFP) recordings and two-photon calcium imaging suggest that some mosaic mice display an increased calcium activity likely to be associated to the transient hyperexcitability.

The mosaic expression of PCDH19 in the progeny of PCDH19 floxed X hSyn1-Cre is visible not only in heterozygous females, as expected, but also in hemizygous males, most likely as a result of the incomplete enzymatic action of the Cre recombinase, and this will allow the comparison of PCDH19 mosaic effects between genders. Interestingly, mosaic KO females display a transient growth delay between the 3rd and 4th postnatal week, suggesting a potential critical time-window in which to reconfirm brain hyperexcitability in this model. With this regard, the surface expression of the alpha1 subunit of GABAA receptor, which mediates fast inhibitory transmission, is reduced in the brain of KO mosaic mice. Furthermore, preliminary data on hippocampal slices from adult mosaic KO females indicate that long-term potentiation (LTP) is impaired. Ongoing and future experiments aim at elucidating both the causes of the hyperexcitability in PCDH19 mosaic models and the consequences of this phenotype on circuit functioning and mice behavior.

STUDIO DEL RUOLO DEL MOSAICISMO NELLA PATOFISIOLOGIA DELL'EPILESSIA FEMMINILE PCDH19-DIPENDENTE

Mutazioni nel gene del cromosoma X PCDH19 causano una sindrome del neurosviluppo nota come encefalopatia epilettica infantile precoce-9 (EIEE9), caratterizzata da epilessia, deficit cognitivi e disturbi dello spettro autistico (Dibbens et al. 2008; Kolc et al., 2018).

La patologia colpisce esclusivamente le bambine con un allele di PCDH19 mutato, mentre risparmia i maschi portatori, ad eccezione di rari casi di bambini con un mosaicismi somatico di PCDH19 a causa di mutazioni post-zigotiche (de Lange et al. 2017). Per questo è stato ipotizzato un meccanismo

di "interferenza cellulare" (Depienne et al. 2009), secondo il quale l'elemento scatenante della patologia sarebbe la co-esistenza nel cervello di due popolazioni eterogenee di cellule, alcune esprimenti la forma selvatica di PCDH19, altre la forma mutata. Questo mosaicismo comprometterebbe la comunicazione tra le cellule e il funzionamento dei circuiti cerebrali.

Per validare questa ipotesi abbiamo sfruttato un modello di topo transgenico generato nel laboratorio nel quale è possibile spegnere, tramite l'enzima ricombinasi Cre, l'espressione del gene PCDH19 in aree specifiche del cervello e a tempi diversi dello sviluppo.

Abbiamo osservato come sia sufficiente riprodurre in fase post-natale un mosaico di PCDH19 in un'area circoscritta della corteccia cerebrale per compromettere la normale attività elettrica del cervello e osservare fenomeni di ipereccitabilità e ipersincronizzazione dei neuroni, caratteristiche associate con la maggior suscettibilità a crisi epilettiche.

Abbiamo inoltre studiato topi caratterizzati da un mosaico di PCDH19 fin dallo sviluppo embrionale ed esteso all'intero cervello. Questi topi mostrano un rallentamento transitorio della crescita in fase postnatale, che ipotizziamo corrisponda ad una finestra critica in cui riconfermare e approfondire gli effetti del mosaicismo sull'ipereccitabilità neuronale. In età adulta, i topi mostrano difetti di plasticità sinaptica tipicamente associati a disturbi di apprendimento e memoria.

Le prime analisi biochimiche suggeriscono inoltre che, alla base del fenotipo di ipereccitabilità osservato, vi sia un difetto nella trasmissione GABAergica, in quanto il recettore per il neurotrasmettitore GABA di tipo A (GABA_AR) risulta meno espresso sulla superficie delle cellule cerebrali dei topi mosaico, rispetto ai topi selvatici.

Con i prossimi esperimenti approfondiremo la caratterizzazione dei modelli murini, cercando di scoprire le cause e conseguenze dell'ipereccitabilità dei topi mosaico per PCDH19.

1) de Lange, I.M., Rump, P., Neuteboom, R.F., Augustijn, P.B., Hodges, K., Kistemaker, A.I., Brouwer, O.F., Mancini, G.M.S., Newman, H.A., Vos, Y.J., et al. (2017). Male patients affected by mosaic PCDH19 mutations: five new cases. *Neurogenetics* 18, 147-153.

2) Depienne, C., Bouteiller, D., Keren, B., Cheuret, E., Poirier, K., Trouillard, O., Benyahia, B., Quelin, C., Carpentier, W., Julia, S., et al. (2009). Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females. *PLoS Genet* 5, e1000381.

3) Dibbens, L.M., Tarpey, P.S., Hynes, K., Bayly, M.A., Scheffer, I.E., Smith, R., Bomar, J., Sutton, E., Vandeleur, L., Shoubridge, C., et al. (2008). X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment. *Nat Genet* 40, 776-781.

4) Kolc, K.L., Sadleir, L.G., Scheffer, I.E., Ivancevic, A., Roberts, R., Pham, D.H., and Gecz, J. (2018). A systematic review and meta-analysis of 271 PCDH19-variant individuals identifies psychiatric comorbidities, and association of seizure onset and disease severity. *Mol Psychiatry*.

Encefalopatia epilettica infantile precoce 9 (EIEE9)

Coordinator: Silvia Bassani

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2018

Telethon Project (nr):

GGP17260

Disease Name:

Epileptic Encephalopathy Early Infantile 9 (EIEE9)

Keywords:

PCDH19, Epilepsy, Cognitive impairment