

Poster P.09.53

ROLE OF INTRACELLULAR CHLORIDE ACCUMULATION IN DOWN SYNDROME PHYSIOPATHOLOGY IN MICE

RUOLO DELLA ACCUMULAZIONE DI CLORO INTRACELLULARE NELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DI DOWN.

Savardi A.^[1], Alberti M.^[1], Ziogas I.^[1], Bolla M.^[1], Parrini M.^[1], Narducci R.^[1], Colombi I.^[1], Portioli C.^[1], Ronzitti G.^[2], Mingozi F.^[2], Borgogno M.^[3], La Sala G.^[3], Ortega Martínez J.A.^[3], De Vivo M.^[3], Contestabile A.^[1], Cancedda L.^[1]

^[1]Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Brain Development and Disease Laboratory ~ Genova ~ Italy, ^[2]Genethon ~ Evry ~ France, ^[3]Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Molecular Modeling & Drug Discovery Laboratory ~ Genova ~ Italy

The Ts65Dn mouse model of Down (DS) reproduces the disabilities of the human syndrome and it presents learning and memory deficits, synaptic dysfunctions, brain development alterations and increased susceptibility to seizures. Increased expression of the chloride importer NKCC1 in adult Ts65Dn mice, leads to an imbalance of excitation and inhibition in the brain. Interestingly, cognitive functions as well as synaptic plasticity are restored by treatment with the NKCC1 inhibitor (and FDA-approved diuretic) bumetanide.

However, bumetanide's effect on cognition and synaptic plasticity in Ts65Dn mice may be also mediated by targets other than NKCC1. Thus, we developed a knock-down approach to normalize NKCC1 expression in trisomic animals. NKCC1 specific down-regulation by RNA interference restored GABAAR-mediated inhibition and rescued behavioral performance in learning and memory tests in adult DS mice.

In parallel, we investigated the molecular mechanisms responsible for NKCC1 upregulation in Ts65Dn mice. We found that NKCC1 upregulation in trisomic neurons does not derive from higher mRNA transcription or decreased protein turnover. NKCC1 upregulation in trisomic neurons derives from a diminished translational repression exerted on the 3' untranslated region (3'UTR) of the gene. This region is site of action of diverse microRNAs (miRs). By applying a combination of bioinformatic prediction tools and gene-expression screening, we identified diverse miR candidates able to interact with NKCC1 3'UTR and repress NKCC1 expression. Upregulation of these same miRs normalizes NKCC1 levels and intracellular chloride concentration in trisomic neurons.

As NKCC1 plays a major role in physiological brain development, we also assessed possible long-term effects of an early treatment with bumetanide or NKCC1 downregulation during postnatal development on learning and memory deficits in Ts65Dn mice. We found that both approaches rescued cognitive deficits and increased susceptibility to seizures in adult Ts65Dn mice.

Finally, since chronic bumetanide treatment is burdened by diuretic side effects caused by the antagonization of the kidney importer isoform NKCC2, we also synthesized and tested a new compound with high NKCC1 specificity. We found that our new drug candidate is able to restore aberrant intracellular chloride concentration in DS neurons in vitro, and to recover the cognitive deficits in adult Ts65Dn mice, without diuretic effect or over toxicity upon chronic treatment.

Altogether, our findings indicate that targeting aberrant Cl homeostasis in Down syndrome may be a valuable tool to design innovative therapeutic approaches.

Il modello murino della sindrome di Down (SD) Ts65Dn riproduce le principali disfunzioni della patologia umana presentando alterazioni di apprendimento e memoria, alterazioni dello sviluppo

cerebrale ed aumentata suscettibilità a crisi epilettiche. Precedentemente abbiamo riscontrato che in topi Ts65Dn adulti vi è un aumento di espressione di NKCC1, un trasportatore di cloro espresso nel cervello, che determina un sbilanciamento tra eccitazione ed inibizione. Inoltre, abbiamo osservato che il trattamento con bumetanide, un diuretico inibitore di NKCC1, determina un ripristino delle funzioni cognitive nei topi Ts65Dn. Tuttavia, l'effetto di bumetanide potrebbe essere mediato dall'attività del farmaco anche su altri target, in quanto la diretta attività in vivo su NKCC1 non è stata dimostrata. Per verificare ciò, abbiamo sviluppato un approccio di riduzione dell'espressione di NKCC1 dimostrando che la specifica riduzione di NKCC1 determina un recupero dell'alterata eccitabilità cerebrale e delle prestazioni cognitive dei topi Ts65Dn adulti, indicando NKCC1 come target efficace per la SD. In parallelo, abbiamo investigato il meccanismo molecolare responsabile dell'aumento di espressione di NKCC1 in topi Ts65Dn. Abbiamo trovato che l'aumento di NKCC1 in neuroni trisomici deriva da una diminuita repressione della trasduzione di NKCC1 che avviene in una regione del gene chiamata 3'UTR ad opera di microRNA. Abbiamo identificato diversi microRNA candidati che potrebbero interagire con la regione UTR di NKCC1 e reprimerne l'espressione. L'aumento di espressione di questi microRNA risulta in una riduzione di NKCC1 e della concentrazione di cloro in neuroni trisomici, confermando la nostra ipotesi.

Inoltre, visto che NKCC1 gioca un ruolo fondamentale nel fisiologico sviluppo del cervello, abbiamo investigato l'effetto a lungo termine del trattamento di bumetanide o della riduzione di NKCC1 effettuati durante il primo periodo postnatale nei topi Ts65Dn. Abbiamo osservato che entrambi gli approcci determinano un recupero dei deficit cognitivi e della suscettibilità alle crisi epilettiche nei topi adulti, indicando che il trattamento durante lo sviluppo determina un effetto che persiste nell'adulto. Infine, visto che il trattamento cronico con bumetanide causa un effetto avverso rappresentato dall'eccessiva diuresi, dovuto alla sua attività sul trasportatore NKCC2 espresso a livello renale, abbiamo sintetizzato un nuovo composto chimico con un'alta specificità per NKCC1. Abbiamo dimostrato che il nuovo composto è in grado di determinare un recupero dell'alterata concentrazione di cloro nei neuroni trisomici e dei deficit cognitivi nei topi Ts65Dn, senza presentare alcun effetto diuretico o tossico dopo trattamento cronico.

In conclusione, i nostri risultati indicano che nella SD un'azione diretta al ripristino dell'omeostasi del cloro neuronale possa rappresentare una preziosa strategia terapeutica per la creazione di terapie specifiche e innovative.

S. Naskar et al. "The development of synaptic transmission is time-locked to early social behaviors in rats". *Nat Commun.* 2019

J.Szczurkowska et al. "NEGR1 and FGFR2 cooperatively regulate cortical development and core behaviours related to autism disorders in mice". *Brain.* 2018

A.W. Cwetsch et al. "In vivo methods for acute modulation of gene expression in the central nervous system". *Prog Neurobiol.* 2018

S. Sulis Sato et al. "Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017

A.Contestabile et al. "The GABAergic Hypothesis for Cognitive Disabilities in Down Syndrome". *Front Cell Neurosci.* 2017

Sindrome di Down

Coordinator: Laura Cancedda

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

TCP15021

Disease Name:

Down Syndrome

Keywords:

Down Syndrome, Chloride accumulation, NKCC1