

## Štúdia CDKL5 UK

**Ponúka vynikajúci prehľad, ktorý bol aktualizovaný a odráža výsledky najnovších výskumov poruchy CDKL5 vo svete. Veľkú vďaka si zaslúži Dr. David Millar z Cardiff University, ktorý aktuálne pracuje na projekte pre CDKL5 UK a skúma molekulárne defekty v géne CDKL5 (Molecular Defects in the CDKL5 gene).**

### Úvod

CDKL5 je serín-treonínová kináza, ktorej nedostatok zapríčiňuje variant Rettovho syndrómu s včasným nástupom. CDKL5 je implikovaný vo viacerých rôznych procesoch vrátane alternatívneho splicingu (spájania, sceľovania), neurónovej morfogénézy a dendritickej arborizácie a metabolizmu energie. Tento článok prináša prehľad súčasných poznatkov o molekulárnych defektoch, ktoré umožňujú vznik tohto závažného a oslabujúceho ochorenia.

### Klinický obraz

Tak ako u klasického Rettovho syndrómu (RTT; OMIM 312750) niekoľko rôznych variantných foriem RTT vrátane variantu so skorým nástupom epileptických záchvatov popísal najprv Hanefeld v r. 1985 (Hanefeld 1985). Následne Kalscheuer et al. (2003) zistil, že mutácie génovej molekuly podobnej kináze závislej od cyklínu (CDKL5) (Montini et al. 1998) spôsobili závažné na X chromozóm viazané infantilné spazmy a mentálnu retardáciu. Následne boli zistené mutácie na tom istom géne u pacientov s klinickými prejavmi podobnými Rettovmu syndrómu (RTT). V literatúre bolo doteraz uvedených viac ako 100 prípadov CDKL5. Vzhľadom na to, že ide o poruchu viazanú na X chromozóme, väčšina prípadov sú dievčatá, ale približne 10% prípadov sú aj chlapci. Klinický fenotyp sa javí výraznejšie u chlapcov (Fehr et al. 2015). Zistili sa viaceré konzistentné klinické prejavy: (i) normálny prenatálny priebeh; (ii) dráždivosť a malátnosť v perinatálnom období; (iii) skorý nástup epilepsie vo veku mladšom ako 5 mesiacov; (iv) Rettovi podobné prejavy ako spomalený rast hlavy, stereotypie, nedostatočné alebo absentujúce dobrovoľné používanie rúk, poruchy spánku; (v) závažná mentálna retardácia so slabým očným kontaktom a praktickou absenciou reči (Bahi- Buisson a Bienvenu 2012). Skorý nástup krčv pozorovaný u tejto formy RTT (variant Rettovho syndrómu so skorým nástupom krčv alebo ESV RTT) sa vyvíja v troch štádiách, menovite (1) raná epilepsia, za ňou nasledujú (2) infantilné spazmy a nakoniec (3) multifokálna a refraktórna myoklonická epilepsia (Bahi- Buisson et al. 2008). Klinický fenotyp pozorovaný u pacientov s mutáciami CDKL5 nedávno prepracovali viacerí autori (Bahi- Buisson a Bienvenu 2012; Fehr et al. 2012; Kilstrup-Nielsen et al. 2012). Fehr et al. (2012) ukázali, že významný počet pacientov s mutáciami génu CDKL5 má klinický fenotyp, ktorý nespĺňa najnovšie kritériá pre ESV RTT (Neul et al. 2010). Títo autori uvádzajú, že pacienti s poruchou CDKL5 by sa mali považovať za pacientov iných ako pacienti s Rettovým syndrómom, a nie za ďalší variant Rettovho syndrómu. Ďalšie významné zistenie u pacientov s poruchou CDKL5 s potvrdenými mutáciami génu CDKL5 je, že majú zvýšené hladiny 4-hydroxynonenal proteinových aduktov (marker oxidačného stresu) v periférálnych krvných lymfocytoch (Pecorelli et al. 2011). Toto zistenie bolo pozorované aj u pacientov s MECP2 génovými mutáciami,

ale nie u pacientov s mutáciami FOXG1 (Pecorelli et al. 2011), čo ukazuje, že oxidačný stres, možný výsledok mitochondriálnej dysfunkcie, môže zohrávať úlohu v patogenéze poruchy CDKL5. Pecorelli et al. (2015) následne ukázal perturbovanú cholesterolovú homeostázu a znížené hladiny vysokodensitného lipoproteínového receptora SRB1. Navyše zistili aj to, že jeden z hlavných ochranných mechanizmov proti oxidačnému stresu, aktivácia transkripčného faktoru NFE2L2, je postihnutá. CDKL5 deficientné fibroblasty znížili úroveň bazálnych proteínov NFE2L2 a aj redukovali odpoveď NFE2L2 na oxidačný stres (Pecorelli et al. 2015).

Leoncini et al. (2015) preukázali, že v prípade klasického Rettovho syndrómu ako aj u poruchy CDKL5 je disregulácia cytokínu. Ukázali, že cytokínová dysregulácia bola proporcionálna klinickej závažnosti, zápalovému stavu redoxovej nerovnováhe. Autori uvádzajú, že tak klasický RTT ako aj porucha CDKL5 sa spája so subklinickou imunitnou disreguláciou spôsobenou defektným zápalovým regulačným signalizačným systémom. Pozorované cytokínové zmeny boli čiastočne korigované omega-3 PUFAs (Leoncini et al. 2015).

U pacientov s poruchou CDKL5 sa skúmala aj funkcia štítnej žľazy. Stagi et al. (2015) ukázal, že pacienti mali aj vyššie hodnoty voľných T4 ako kontrolná skupina. Klinická významnosť týchto výsledkov však v súčasnosti nie je jasná.

Odhliadnuc od závažných neurologických prejavov spojených s poruchou CDKL5 boli u pacientov zistené aj viaceré iné fyziologické nedostatky. Signifikantnosť týchto nedostatkov v súčasnosti nie je jasná, ale je dôležité brať do úvahy skutočnosť, že dopady poruchy CDKL5 na iné fyziologické systémy môže mať dopad na zdravie pacienta.

### **Štruktúra a expresia génu**

Po identifikácii ľudského génu CDKL5 (Montini et al. 1998) bolo identifikovaných niekoľko rôznych izoforiem a spojovacích variant. Gén CDKL5 je vytvorený z 24 exónov, pričom prvé tri z nich (exóny 1, 1a, 1b) nie sú translátované; zostávajúcich 21 exónov obsahuje kódovaciu sekvenciu. Boli zistené dva spojovacie varianty s odlišnými 5' netranslátovanými regiónmi: izoforma I obsahuje exón 1 a je prepisovaná v širšom rozsahu tkanív, zatiaľ čo izoforma II, ktorá obsahuje exóny 1a a 1b, je vyjadrená len v teste a fetálnom mozgu (Kalscheuer et al. 2003; Williamson et al. 2012). Originálny CDKL5 prepis (transkript) generuje proteín 1030 amino kyselín (CDKL5115; 115kDa), ktorý je vyjadrený v teste. Dva ďalšie nedávno identifikované prepisy sú podľa všetkého relevantné pre mozgovú funkciu CDKL5 (Fichou et al. 2011; Rademacher et al. 2011; Williamson et al. 2012). Za prvé, alternatívne spojovaná izoforma umožňuje vznik nového zarámovaného exónu (in-frame exon) (exon 16b) báz 123 medzi exónmi 16 a 17 (Fichou et al. 2011; Rademacher et al. 2011). Nie je jasné, či tento variant spôsobuje nejaké zmeny funkcie proteínu CDKL5, ale Fichou et al. (2011) dokázal, že množstvo transkriptu exónu s obsahom 16b (CDKL5-16b) sa pohybovalo v závislosti na analyzovanej oblasti mozgu a že tento transkript je špecifický pre mozog. Za druhé, Williamson et al. (2012) zistili, že najväčší transkript CDKL5 mRNA vyjadrený v mozgu obsahoval len 18 exónov. Ukázalo sa, že exón 18 bol rozšírený o 170 báz vrátane terminačného kodónu. Autori preukázali, že tento nový 107kDa (CDKL5107) proteín a CDKL5115 majú rovnaké funkčné vlastnosti (Williamson et al. 2012). Williamson et al. (2012) nevedeli identifikovať 3' netranslátovanú oblasť (3' UTR) variantu 107kDa, ale Montini et al

(1998) ukázal, pomocou metódy „Northern blotting“, že veľkosť v mozgu vyjadreného transkriptu CDKL5 bola približne 9500 báz tak u človeka ako aj u myši, zatiaľ čo v myšom testes sa našiel abundantný transkript báz ~3500. To ukazuje, že referenčná sekvencia CDKL5 (~3400 báz) predstavuje izoformu špecifickú pre testes a že ešte treba identifikovať v mozgu vyjadrený transkript v plnej dĺžke.

Štúdia Williamsona et al. (2012) ukazuje, že jediné tkanivo, ktoré vyjadruje CDKL5 izoformu II a CDKL5115 je testes. Dokázali, že všetky ostatné tkanivá vrátane fetálneho mozgu vyjadrujú CDKL5 izoformu I a CDKL5107. Keďže CDKL5107 pozostáva z len 18 exónov, uvažuje sa, že skrínovanie na funkčné mutácie v exónoch 19-21 génu CDKL5 možno nie je aktuálne (Diebold et al. 2013). Doposiaľ nebolo identifikované preukázané ochorenie, ktoré by spôsobovalo mutácie na exónoch 19-21.

Expresia CDKL5 vo vyvíjajúcom sa mozgu myši je nízka v embryonickom dni 16.5 (E16.5), ale odvtedy až do postnatálneho dňa 14 (P14) sa expresia zvyšuje a potom pomaly klesá v priebehu postnatálneho života. Expresia CDKL5 je osobitne vysoká v prednom mozgu v porovnaní s ostatnými oblasťami mozgu (Wang et al. 2012). Prítomnosť ostrovčeka CpG prekrývajúceho exón 1 génu CDKL5 naznačuje, že jeho expresia môže byť čiastočne sprostredkovaná MeCP2. Nedávna štúdia (Carouge et al. 2010) ukazuje, že u potkana zredukované hodnôt MECP2 s použitím siRNA spôsobuje zvýšenie expresie CDKL5. Iné štúdie však uvádzajú, že expresia CDKL5 zostáva nezmenená v lymfoblastových bukových líniách od pacientov s klasickým RTT (Mari et al. 2005) a v mozgoch MECP2 deficientných myši (Weaving et al. 2004), čo naznačuje, že na úrovni transkripcie nedochádza k interakcii medzi CDKL5 a MECP2.

### **Funkcia**

CDKL5 je serín/treoninová kináza z rodiny kináz CMGC. Charakterizuje ju katalytická doména (amino kyseliny 13-297), ktorá obsahuje ATP-viažujúcu oblasť (amino kyseliny 13-43), aktívnu lokalitu serín/treonine proteín kinázy (amino kyseliny 131-143) a Thr – X – Tyr (TEY) motív u amino kyselín 169-171. Putatívne signály pre nukleárny import a export sú lokalizované v C-terminal doméne proteínu. Má schopnosť fosforylovať niekoľko proteínov a – čo je dôležité – autofosforylovať svoj TEY motív.

### **Lokalizácia**

Zdá sa, že funkcia CDKL5 je aspoň čiastočne regulovaná prostredníctvom svojej subcelulárnej lokalizácie ako aj jej syntézy a degradácie. V prípade mozgu sa myši CDKL5 nachádza predovšetkým v cytoplazmovom kompartmente, ale po P14 sa začína akumulovať v jadre, kde sa dá detegovať približne 40% celkového CDKL5. Zdá sa však, že táto translokácia nastáva len v určitých oblastiach mozgu: v mozočku približne 80% CDKL5 zostáva v cytoplazmovej forme, ale v kortexe je CDKL5 rovnomerne distribuované medzi cytoplazmové a jadrové kompartmenty (Rusconi et al. 2008). Exogénne CDKL5 sa presúva medzi jadrovými a cytoplazmovými kompartmentmi v kultivovaných ne-neurónových bunkách; do toho vstupuje C-terminus proteínu a receptor CRM1 jadrového exportu. Ale tento mechanizmus nemusí platiť pre neurónové bunky, vzhľadom na to, že v odpočívajúcich hypokampových neurónoch translokácia myšieho CDKL5 z jadra do cytoplazmy sa zdá byť regulovaná špecifickými stimulmi.

Napríklad glutamátová liečba indukuje nukleárny export CDKL5, čo vedie k jeho akumulácii v cytoplazme (Rusconi et al. 2011). Williamson et al. (2012) preukázali, že izoforma CDKL5107 má podobnú subcelulárnu lokalizáciu ako CDKL5115, ale nie je jasné, či izoforma CDKL5-E16b má podobný lokalizačný vzorec.

### **Modely založené na bunke**

Lokalita CDKL5 v rámci bunky sa javí ako dôležitá pre jej funkciu. CDKL5 má schopnosť fosforylovať sa a jadro dokáže fosforylovať DNA metyl transferázu I (DNMT1; Kameshita et al. 2008) a existujú určité dôkazy, že dokáže fosforylovať MECP2 in vitro (Mari et al. 2005; Bertani et al. 2006; Williamson et al. 2012). Navyše, kinázová aktivita CDKL5 je spojená s počtom RNA splicingových faktorov, ktoré sú uložené v jadrových škvrnách ("speckles") (Ricciardi et al. 2009), kde CDKL5 môže plniť významnú úlohu pri fosforylácii SR domény v splicingových faktoroch bohatých na serín (SR). Fosforylácia týchto splicingových faktorov je nevyhnutná na ich uvoľnenie z jadrových škvŕn a ich nasmerovanie na miesta, kde dochádza k splicingu ešte pred mRNA. Ricciardi et al. (2009) uvádzajú, že CDKL5 pôsobí na demontáž jadrových škvŕn následnú redistribúciu niektorých z týchto so škvŕnami spojených splicing faktorov. Tieto výsledky naznačujú, že CDKL5 môže hrať úlohu pri kontrole génovej expresie prostredníctvom fosforylácie DNMT1 a zmeny CpG metylácie, ktorá môže ovplyvniť transkripciu početných génov. Navyše, zmena mechanizmu distribúcie splicing faktora v rámci jadra môže viesť k alternatívnemu splicingu rôznych RNA a k vzniku podmnožiny proteínov, ktoré majú trochu zmenené funkcie. Rosas Vargas et al. (2008) skúmali efekt na bunkovú distribúciu v prípade dvoch mutácií s odlišným zmyslom (p.Ala40Val a p.Leu220Pro), ktoré sa spájajú so závažnou infantílnou encefalopatiou. Obe tieto mutácie sú lokalizované v rámci katalytickej domény CDKL5, a preto sa dá u nich predpokladať, že majú vplyv na fosforyláciu. V oboch prípadoch proteíny nedokázali prejsť do jadra, čo naznačuje, že stav fosforylácie CDKL5 môže regulovať jeho schopnosť preniknúť do jadra.

Zdá sa, že aj v prípade cytoplazmy plní CDKL5 celú škálu funkcií. CDKL5 ovplyvňuje neurónovú morfogenézu a dendritickú arborizáciu prostredníctvom preusporiadania cytoskeletu. Ko-lokalizuje s F-actinom a interaguje s Rac-1, Rho GTPázou, ktorá podporuje formovanie a/alebo dozrievanie trŕňov tým, že pretvára aktinový cytoskelet (Chen et al. 2010). Predpokladá sa, že CDKL5 pôsobí smerom hore Rac -1 s cieľom ovplyvniť neurónovú morfogenézu. Od mozgu odvodený neurotrofný faktor (BDNF), ktorý prechodne fosforyluje CDKL5, je tiež potrebný na aktiváciu Rac-1. Keď CDKL5 absentuje, BDNF neaktivuje Rac-1 (Chen et al. 2010). Ricciardi et al. (2012) preukázali, že CDKL5 lokalizuje takmer výlučne pri post synaptickej denzite (PSD) excitatórnych synapsií tak in vivo ako aj in vitro. Navyše, tá istá skupina preukázala, že v iPSC-odvodených neurónoch od pacientov s CDKL5 mutácie vykazovali aberantné dendritické trne. Vyčerpanie CDKL5 u hipokampových neurónov u potkana naznačuje, že CDKL5 je potrebný na zabezpečenie správneho počtu dobre tvarovaných trŕňov. Tieto morfologické zmeny boli spojené s redukciami počtu excitatórnych synapsií a významným poklesom spontánnych miniatúrnych excitatórnych postsynaptických prúdoch (mEPSCs). Nebol pozorovaný významný efekt na hustotu inhibičných synapsií ani žiadne významné zmeny v miniatúrnych postsynaptických prúdoch (Ricciardi et al. 2012). Ukázalo sa, že CDKL5 interagoval a fosforylátoval Netrin G1 receptor (NGL-1), synaptickou molekulou na adhéziu bunky,

ktorá hrá dôležitú úlohu pri včasnom vytváraní synapsií a následnom dozrievaní. NGL-1 sa viaže na PSD95, proteín, ktorý hrá významnú úlohu pri učení a pamätaní si a tieto väzby sa stabilizujú fosforyláciou NGL-1 na Ser631 pomocou CDKL5. Táto stabilizácia interakcie NGL-1/PSD95 zabezpečuje zacielenie na PSD95 na tvorbu nových dendritických protrúzií (Riciardi et al. 2012). CDKL5 sa tiež viaže priamo na PSD95 (Zhu et al. 2013; Zhang et al. 2014). Keď sa PSD95 palmitoyluje na svojom amino terminále CDKL5 sa naň dokáže naviazať, čo podporuje zacielenie CDKL5 na excitatórne synapsie (Zhu et al. 2013). PSD95 palmitoylácia je dynamická a reverzibilná: de-palmitoylácia sa urýchľuje aktiváciou glutamátového receptora, kdežto palmitoylácia sa zvyšuje blokovaním synaptickej aktivity (El-Husseini et al. 2002; Noritake et al. 2009; Yoshii et al. 2011). Palmitoylovaný PSD95 sa spája so synaptickou membránou a CDKL5 a slúži ako štrbinka ("slot") pre glutamátový receptor typu AMPA (AMPA) prostredníctvom interakcie s TARP/Stargazinom. Keď je stimulovaný glutamátom, dochádza k prílevu  $Ca^{2+}$  cez receptor NMDA, čo indukuje viazanie  $Ca^{2+}$ /calmodulinu k PSD95 a blokuje palmitoyláciu a umožňuje de-palmitoyláciu PSD95 (Zhang et al. 2014). To vedie k disociácii PSD95 od synaptickej membrány ako aj CDKL5, čo vedie k redukcii počtu štrbín AMPAR a redukcii AMPAR sprostredkovaného synaptického prenosu (Zhang et al. 2014). Neurónová depolarizácia s využitím potassium chloridu indukuje rýchly nárast hladín proteínu CDKL5, zväčša sprostredkovaný transláciou mimo sómy v dendritoch (La Montanara et al. 2015). U mladých neurónov je táto indukcia dlhšia, ale u zrelých neurónov je indukcia tranzitórna a vracia sa do bazálnych hodnôt v priebehu 10 minút. Či tento rozdiel v indukcii je spôsobený tým, že na rozdiel od zrelých neurónových kultúr, v nezrelých neurónových kultúrach nie sú prítomné zrelé synapsie, nie je jasné. Ukázalo sa, že prílev  $Ca^{2+}$  je nevyhnutný pre syntézu proteínu CDKL5, ktorá zas indukuje proteín fosfatáse-1 (PP1) dependentnú defosforyláciu CDKL5 a jej degradáciu. PP1 sa aktivuje stimuláciou receptora NMDA inhibovaním jeho fosforylácie pomocou CDK5 (Hou et al. 2013). Ďalší regulátor aktivity CDKL5 je ubikvitin ligáza Mind Bomb 1 (Mib1), ktorá ubikvituje CDKL5 a mení jeho lokalizáciu, hojnosť a funkčné účinky (Mertz 2015). Ukázalo sa, že Mib1 reguluje neutritové výrastky (Choe et al. 2007) a synaptickú plasticitu (Yoon et al. 2012), ale nie je jasné, či Mib1 plní nejakú úlohu pri regulovaní CDKL5 pri synaptickej aktivácii.

Tieto údaje implikujú, že pri sprostredkovaní synaptickej funkcie CDKL5 sú dôležité minimálne dve cesty: CDKL5 spolu s Rac-1 a BDNF formuje jednu cestu a druhá obsahuje CDKL5, PSD95 a NGL-1 komplex. Je možné, že interakcia medzi týmito dvoma cestami je sprostredkovaná Kalirinom-7. Kalirin-7 je Rho guanin nukleotidový výmenný faktor (GEF), ktorý podporuje výmenu GDP za GTP, a tak stimuluje aktivity špecifických Rho GTPáz, v tomto prípade je to Rac-1 (Mandela and Ma 2012). Kalirin-7 je asociované takmer výlučne s post-synaptickými excitatórnymi terminálmi, kde interaguje s PSD95. U Kalirin-7 deficientných myší bol 15% pokles hustoty trňov a PSD's izolované z týchto myší vykazovalo deficit v CDKL5, čo je kináza, o ktorej sa vie, že fosforyluje Kalirin-7 a hrá podstatnú úlohu pri Kalirin-7-sprostredkovanej tvorbe trňov a synaptickej funkcii (Ma et al. 2008). Cyklín dependentná kináza 5 (CDK5) je ďalší člen rodiny CMGC kinázy a bolo by zaujímavé vedieť, či aj CDKL5 dokáže fosforylovať Kalirin-7.

Identifikovaný substrát pre fosforyláciu pomocou CDKL5 bol identifikovaný ako amfifysín 1 (AMPH1), čo je multifunkčná adaptorová molekula, ktorá sa zapája do

neurotransmisie a recyklovania synaptických vezikulov prostredníctvom clathrin-sprostredkovanej endocytózy (Sekiguchi et al 2013; Katayama et al. 2015). CDKL5 fosforyluje AMPH1 výlučne na Ser 293 a táto fosforylácia je prerušená mutáciami CDKL5 katalytickej domény. Je zaujímavé, že CDK5 tiež fosforyluje AMPH1, ale na odlišných pozíciách (Ser-272, 276 a 285) ako CDKL5 (Sekiguchi et al 2013). Nie je jasné aký je vplyv fosforylácie AMPH1, ktorú uskutočňuje CDKL5 na jeho funkciu, ale Amph1 deficientná myš vykazuje závažnejšie ťažkosti s učením a epileptické záchvaty rezistentné na liečbu, čo naznačuje, že hrá úlohu pri vývoji neurónov a prenose (Di Paolo et al.2002).

Nedávna štúdia zistila, že GRID1 kódujúci Glutamát D1 receptor (GluD1) bol regulovaný nahor u MECP2- aj u CDKL5- mutovaných ľudských buniek iPS (Livide et al. 2015). GluD1 má rozsiahlu expresiu v mozgu (Hepp et al. 2015) a myši s odstránenou funkciou GluD1 vykazovali vyšší počet dendritických trňov, väčšiu excitatórnu neurotransmisiu a vyšší počet synapsií v strednom prefrontálnom kortexe (Gupta et al. 2015). Zvýšené hladiny GluD1 proteínu môžu spôsobovať pokles množstva dendritických trňov a excitatórnych synapsií a zmenenú neurotransmisiu, ako ukázal Riciardi et al. (2012).

Ukázalo sa, že CDKL5 bol regulovaný nahor vtedy, keď sa neuroblastomove bunkové línie diferencovali v prítomnosti kyseliny retinovej (Valli et al. 2012). Táto regylácia nahor má dva efekty v SH-SY5Y neuroblastomovej bunkovej línii: podpora neurónovej diferenciácie a redukcia proliferácie buniek blokovaním progresie bunkového cyklu. Ukázalo sa aj, že MYCN, transkripčný faktor prináležiaci do rodiny MYC, reguluje CDKL5 negatívne (Valli et al. 2012). MYCN je primárne vyjadrený v normálne sa vyvíjajúcich embryách a má sa za to, že je kriticky dôležitý pre mozog a ďalší neurálny vývoj, keďže podporuje rýchle delenie buniek. Valli et al. (2012) uvádza, že prechod od vývinu embryonického k postnatálnemu mozgu vedie k redukovanej expresii MYCN a zvýšenej expresii CDKL5, čo vedie k posunu od proliferácie buniek k ich diferenciácii.

Tieto štúdie naznačujú, že CDKL5 plní pri synaptickej funkcii významnú úlohu, ale presné úlohy, resp. úlohu treba ďalej objasniť. Dosposiaľ je veľmi málo informácií na aké ciele CDKL5 fosforyluje v rámci synapsie, čo bude dôležité, aby sme pochopili jeho funkciu. Tiež sa zdá, že CDKL5 môže hrať dôležitú úlohu pri proliferácii a rozvoji neurálnych buniek, i keď toto sa ukázalo len v jednej štúdii s použitím neuroblastomovej bunkovej línie.

### **Myšie modely s CDKL5 deficienciou**

Fenotypové aj funkčné aspekty straty CDKL5 sa skúmali dva rôzne myšie modely CDKL5 deficiencie so stratou funkcie génu. Wang et al. (2012) generovali myš na základe mutácie špecifickej pre pacienta, ktorá má za následok vynechanie exónu 6 CDKL5 myši a výsledkom bolo predčasné ukončenie kodónu v N-terminal kinasovej doméne. Táto myš vykazuje väčšinu symptómov, ktoré sú prítomné u ľudských pacientov, s výraznejšou výnimkou v tom, že tieto myši nemajú spontánne záchvaty. To môže byť zapríčinené kmeňom myši použitej v tejto štúdii alebo to môže odrážať výrazný funkčný rozdiel medzi ľudským a myším homológom CDKL5. Wang et al. (2012) použili tento model na preskúmanie vplyvu straty CDKL5 na činnosť kinázy. Zistili, že došlo k výraznému poklesu aktivity adenosín monofosfátom aktivovanej protein kinázy (AMPK), protein kinázy A (PKA) a AKT substrátu v prednom mozgu

CDKL5-/y myši mužského pohlavia. Postihnuté boli aj iné substráty, vrátane tých pre mitogen-aktivovanú proteín kinázu (MAPK), ataxia-telangiectasia zmutovaná/ataxiatangiectasia a Rad3 súvisiace (ATM/ATR), a cyklin-dependentných kinázových (CDK) substrátov (Wang et al. 2012). Ďalšie hodnotenie cesty AKT ukázalo, že tak fosforylácia AKT na Ser473 a mechanistický Target of Rapamycin (mTOR) na Ser 2448 boli zredukované napriek normálnym hladinám celkového AKT a mTOR proteínu (Wang et al. 2012).

Druhá myš so stratou funkcie CDKL5 bola generovaná deléciou zárodočnej línie exónu 4 génu CDKL5 (Amendola et al. 2014). Behaviorálne nedostatky boli pozorované u homozygótnych myších samičiek a hemizygótnych myších samčekov so stratou funkcie CDKL5, u ktorých bolo pozorované nenormálne zakliesňovanie zadných labiek, hypolokómia a znížené sledovanie hlavou v porovnaní s myšami z divého vrhu (Amendola et al. 2014). Tieto myši tiež vykazovali nižšiu dendritickú arborizáciu a zníženú fosforyláciu AKT a ribozómového proteínu S6 (rpS6). Amendola et al. (2014) tiež samostatne a špecificky odstránili funkciu CDKL5 z GABAergických a glutamatergických neurónov a skúmali aký to malo vplyv na správanie. Zistili, že defekty so zakliesňovaním zadných labiek a defekty sledovania hlavou sa spájali s odstránením CDKL5 v glutamatergických neurónoch, zatiaľ čo defekty v hypolokómii sa spájali s odstránením funkcie v GABAergických neurónoch, čo poukazuje na to, že rôzne behaviorálne charakteristiky sa dajú lokalizovať do rôznych častí neuronálnych populácií predného mozgu (Amendola et al. 2014). Tak ako v prípade modelu Wang et al. (2012), ani v tejto štúdii sa nenašli dôkazy spontánnych záchvatov konštitutívnych ani u kondicionálnych myší so stratou funkcie génu a toto nebolo špecifické pre kmeň. Ale administrácia kyseliny kainovej myšiam bez CDKL5 ako aj divým myšiam ukázala zmeny pulznej aktivity na EEG u myší s odstránenou funkciou génu, čo môže byť užitočný poznatok pri lepšom porozumení epileptického mechanizmu u človeka s poruchou CDKL5 (Amendola et al. 2014).

Na rovnakom myšom modeli CDKL5 ako bol použitý v prípade Amendola et al. (2014), Fuchs et al (2014) skúmali neurálny vývoj v hypokampovom dentate gyrus, ku ktorému dochádza prevažne v postnatálnom období. Zistili, že nedostatočnosť CDKL5 spôsobila zvýšenú proliferáciu IPC buniek (intermediate progenitor cells), ale aj zvýšenie apoptózy nezrelých neurónov odvodených od IPC, čo naznačuje, že CDKL5 podporuje prežívanie a dozrievanie postmitotických neurónov (Fuchs et al. 2014). Zistilo sa, že bola prerušená aj signalizácia prostredníctvom AKT/GSK-3 $\beta$ . Bol zistený pokles GSK-3 $\beta$  na seríne 9, čo viedlo k zvýšenej aktivite K-3 $\beta$ . Keď bola prítomná re-expressia CDKL5, obnovila sa tak signalizácia AKT/GSK-3 $\beta$  ako aj prežívanie neurónov, čo ukazuje, že CDKL5 hrá kľúčovú úlohu pri neurogenéze a dendritickom vývoji v hypokampovom dentate gyrus (Fuchs et al. 2014). Najnovšie Fuchs et al. (2015) ukázali, že inhibítor GSK-3 $\beta$ , SB216763, tiež dokáže obnoviť prežívanie a dozrievanie neuronálnych prekursorov v hypokampe hemizygótnych myších samčekov s odstránenou funkciou CDKL5. Hipokampové dependentné pamäťové testy sa tiež zlepšili liečbou SB216763, čím sa stali podobnými tým u divých myší (Fuchs et al. 2015). Tieto dáta poukazujú na to, že inhibícia GSK-3 $\beta$  môže mať pre poruchu CDKL5 terapeutický prínos, ale bolo by užitočné určiť v prvom rade terapeutické efekty SB216763 na heterozygótové myšie samičky s deficitom CDKL5. Tiež by bolo zaujímavé zistiť, či inhibícia GSK-3 $\beta$  obnovila AKT a rpS6 fosforyláciu na normálnu úroveň.

Tieto myšie štúdie naznačujú, že CDKL5 hrá úlohu pri regulácii neurogenézy ako aj neurálnom dozrievaní a má vplyv na cesty AKT/GSK-3 $\beta$  (Fuchs et al. 2014) a mTOR (Wang et al. 2012; Amendola et al. 2014). mTOR je katalytická subjednotka dvoch odlišných komplexov nazývaných mTOR complex 1 (mTORC1) a mTORC2, ktoré sa od seba odlišujú jedinečnými aksesórnymi proteínmi, ktoré fungujú ako lešenie umožňujúce viazanie iných regulátorov a definovanie ich substrátovej špecificity (revidoval Zoncu et al. 2011). Cesty mTOR a AKT interagujú: o mTORC2 je známe, že fosforyluje AKT na Ser473, ktoré zas, keď je fosforylované, dokáže fosforylovať mTOR, čo vedie k aktivácii mTORC1 a fosforylácii rpS6. To znamená, že defekty na jednej alebo druhej ceste budú mať dopad na tú druhú, ako to vidno u oboch myších modelov s deficientnou funkciou CDKL5.

Aktivita mTORC1 a mTORC2 je dôležitá pre rozvoj neurónov, hrá úlohu pri smerovaní axónov, vývoji dendritov a morfogénéze dendritických trňov (Campbell and Holt 2001; Jaworski et al. 2005; Kumar et al. 2005; Tavazoie et al. 2005; Urbanska et al. 2012; Lipton and Sahin 2014). mTORC1 plní podstatnú úlohu aj u viacerých foriem synaptickej plasticity, ktoré sú za procesmi učenia a formovania pamäte (Cammalleri et al. 2003; Hou and Klann 2004; Parsons et al. 2006; Tang et al. 2002; Tischmeyer et al. 2003). Predpokladá sa, že mTORC2 sa zapája do aktínovej dynamiky prostredníctvom rodiny malej II GTPázy Rho, ktorá zahŕňa Rac-1 (Jacinto et al. 2004) a vie sa, že pôsobia ako pozitívne regulátory dendritického rastu (Murakoshi et al. 2011; Woo and Gomez 2006). Saci et al. (2011) preukázali, že expresia Rac-1, ale nie jeho GTP väzobná aktivita, reguluje komplex mTORC1 ako aj mTORC2. Preukázali, že karboxy terminál Rac-1 je dôležitý pri určovaní lokalizácie mTOR v perinukleárnej oblasti a plazmovej membráne (Saci et al. 2011). Tiež sa ukázalo, že mTOR a Rac-1 sú nevyhnutné pre axonálne vetvenie (Grider et al. 2009) a pri kontrolovaní hustoty dendritických trňov v reakcii na hormonálnu liečbu (Lee et al. 2011). Tieto výsledky naznačujú, že CDKL5 môže hrať úlohu pri regulovaní aktivity mTOR prostredníctvom svojej interakcie s Rac-1 na synapsii.

Treba poznamenať, že štúdia na samčom modeli MECP2<sup>tml.lJae</sup> myší model RTT (Chen et al. 2001) vykázala podobný pokles AKT, mTOR a rpS6 fosforylácie ako v prípade myší s odstránenou funkciou CDKL5 (Ricciardi et al. 2011), čo poukazuje na to, že deficiencia (nedostatočnosť) CDKL5 a MECP2 môže mať dopad na podobné cesty vrátane cesty mTOR. Fuchs et al. (2014) tiež zistili, že boli postihnuté podobné cesty, ale poznamenali, že u myší s nedostatočným MECP2 nie sú dôkazy zmenenej neuronovej proliferácie alebo prežívania. Tiež uvádzajú, že dendritická hypertrofia môže vysvetľovať spoločné vlastnosti u RTT a poruchy CDKL5 u človeka (Fuchs et al. 2014). Ešte treba preskúmať, či fosforylácia GSK-3 $\beta$  sa mení u myší s nedostatočným MECP2.

Obnovenie funkcie GSK-3 $\beta$  u myší s nedostatočným CDKL5 s použitím SB216763 stačilo na korigovanie kognitívnych defektov pozorovaných u týchto myší (Fuchs et al. 2015). To naznačuje, že aj keď v mozgu myší s nedostatočným CDKL5 sú dysregulované početné signalizačné cesty (Wang et al. 2012), zdá sa, že obnovenie funkcie len jednej cesty dokáže obnoviť funkciu na takmer normálnu úroveň. Dôležité je zistiť, či iné nedostatočnosti zistené v rámci poruchy CDKL5 u človeka sa obnovia na normál pri použití inhibítorov GSK-3 $\beta$ .

## Záver



Nedostatočnosť proteínu CDKL5 zapríčiňuje závažné problémy s učením a epileptické záchvaty. Ukázalo sa, že CDKL5 je multifunkčný proteín, ktorý má viaceré dopady na neuronálne bunky. Ako jedna z jeho hlavných funkcií sa javí funkcia pri vyvíjaní neurónov a synaptických štruktúr a najmä ich aktivity. To viedlo k možnosti potenciálne cielenej terapeutickej intervencie v prípade poruchy CDKL5.

**Tento prehľad bol zostavený pre CDKL5 UK v júli 2013 a aktualizovaný v auguste 2015. Je duševným vlastníctvom CDKL5 UK a autora David Millar, ktorý prednáša molekulovú genetiku človeka na Ústave lekárskej genetiky, Institute of Medical Genetics, School of Medicine, Cardiff University. Žiadosti o súhlas s kopírovaním tohto článku adresujte na CDKL5 UK cez [carolanne@cdkl5uk.org](mailto:carolanne@cdkl5uk.org)**

© CDKL5 UK August 2015

Zdroj: [www.curecdkl5.org](http://www.curecdkl5.org)

**Vyššie preložený dokument neprešiel odbornou korekciou! Nosným dokumentom je anglická verzia textu "Study CDKL5 UK", do ktorej treba nazrieť v prípade nezrovnalostí v slovenskom preklade.**

### Referencie

- Amendola E, Zhan Y, Mattucci C, Castroflorio E, Calcagno E, Fuchs C, Lonetti G, Silingardi D, Vyssotski AL, Farley D, Ciani E, Pizzorusso T, Giustetto M, Gross CT (2014). Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. PLoS One. 9: e91613.
- Bahi-Buisson N, Kaminska A, Boddaert N, Rio M, Afenjar A, Gérard M, Giuliano F, Motte J, Héron D, Morel MA, Plouin P, Richelme C, des Portes V, Dulac O, Philippe C, Chiron C, Nabbout R, Bienvenu T (2008). The three stages of epilepsy in patients with CDKL5 mutations. Epilepsia. 49: 1027-1037.
- Bahi-Buisson N, Bienvenu T (2012). CDKL5-Related Disorders: From Clinical Description to Molecular Genetics. Mol Syndromol. 2: 137-152.
- Bertani I, Rusconi L, Bolognese F, Forlani G, Conca B, De Monte L, Badaracco G, Landsberger N, Kilstrup-Nielsen C (2006). Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. J Biol Chem. 281: 32048-32056.
- Cammalleri M, Lutjens R, Berton F, King AR, Simpson C, Francesconi W, Sanna PP (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100: 14368-14373.
- Campbell DS, Holt CE (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. Neuron 32: 1013-1026.
- Carouge D, Host L, Aunis D, Zwiller J, Anglard P (2010). CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. Neurobiol Dis. 38: 414-424.
- Chen Q, Zhu YC, Yu J, Miao S, Zheng J, Xu L, Zhou Y, Li D, Zhang C, Tao J, Xiong ZQ (2010). CDKL5, a protein associated with rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling. J Neurosci. 30: 12777-12786.
- Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001). Deficiency of methyl-CpG binding

protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 27: 327–331.

Choe EA, Liao L, Zhou JY, Cheng D, Duong DM, Jin P, Tsai LH, Peng J (2007). Neuronal morphogenesis is regulated by the interplay between cyclin-dependent kinase 5 and the ubiquitin ligase mind bomb 1. *J Neurosci.* 27: 9503-9512.

Clark, DD; Sokoloff L (1999). In Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. ed. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Philadelphia: Lippincott. pp. 637–70.

Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740.

Diebold B, Delépine C, Gataullina S, Delahaye A, Nectoux J, Bienvenu T (2014). Mutations in the C-terminus of CDKL5: proceed with caution. *Eur J Hum Genet.* 22: 270-272.

Di Paolo G, Sankaranarayanan S, Wenk MR, Daniell L, Perucco E, Caldarone BJ, Flavell R, Picciotto MR, Ryan TA, Cremona O, De Camilli P (2002). Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* 33: 789-804.

El-Husseini Ael-D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll RA, Brecht DS (2002). Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell.* 108: 849-863.

Fehr S, Wilson M, Downs J, Williams S, Murgia A, Sartori S, Vecchi M, Ho G, Polli R, Psoni S, Bao X, de Klerk N, Leonard H, Christodoulou J (2012). The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet.* 21: 266-273.

Fehr S, Leonard H, Ho G, Williams S, de Klerk N, Forbes D, Christodoulou J, Downs J (2015). There is variability in the attainment of developmental milestones in the CDKL5 disorder. *J Neurodev Disord.* 7: 2.

Fichou Y, Nectoux J, Bahi-Buisson N, Chelly J, Bienvenu T (2011). An isoform of the severe encephalopathy-related CDKL5 gene, including a novel exon with extremely high sequence conservation, is specifically expressed in brain. *J Hum Genet.* 56: 52-57.

Fuchs C, Trazzi S, Torricella R, Viggiano R, De Franceschi M, Amendola E, Gross C, Calzà L, Bartesaghi R, Ciani E (2014). Loss of CDKL5 impairs survival and dendritic growth of newborn neurons by altering AKT/GSK-3 $\beta$  signaling. *Neurobiol Dis.* 70: 53-68.

Fuchs C, Rimondini R, Viggiano R, Trazzi S, De Franceschi M, Bartesaghi R, Ciani E (2015). Inhibition of GSK3 $\beta$  rescues hippocampal development and learning in a mouse model of CDKL5 disorder. *Neurobiol Dis.* 82: 298-310.

Grider MH, Park D, Spencer DM, Shine HD (2009). Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively. *J Neurosci Res.* 87: 3033-3042.

Gupta SC, Yadav R, Pavuluri R, Morley BJ, Stairs DJ, Dravid SM (2015). Essential role of GluD1 in dendritic spine development and GluN2B to GluN2A NMDAR subunit switch in the cortex and hippocampus reveals ability of GluN2B inhibition in correcting hyperconnectivity. *Neuropharmacology.* 93: 274-284.

Hanefeld F (1985). The clinical pattern of the Rett syndrome. *Brain Dev.* 7: 320–325.

Hepp R, Hay YA, Aguado C, Lujan R, Dauphinot L, Potier MC, Nomura S, Poirel O, El Mestikawy S, Lambolez B, Tricoire L (2015). Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain. *Brain Struct Funct.* 220: 2797-2815.

Hou L, Klann E (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* 24: 6352-6361.

Hou H, Sun L, Siddoway BA, Petralia RS, Yang H, Gu H, Nairn AC, Xia H (2013). Synaptic NMDA receptor stimulation activates PP1 by inhibiting its phosphorylation by Cdk5. *J Cell Biol.* 203: 521-535.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rügge MA, Hall A, Hall MN (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6: 1122-1128.

Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* 25: 11300-11312.

Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kübart S, Menzel C, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers HH, Gécz J (2003). Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 72: 1401-1411.

Kameshita I, Sekiguchi M, Hamasaki D, Sugiyama Y, Hatano N, Suetake I, Tajima S, Sueyoshi N (2008). Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 377: 1162-1167.

Katayama S, Sueyoshi N, Kameshita I (2015). Critical Determinants of Substrate Recognition by Cyclin-Dependent Kinase-like 5 (CDKL5). *Biochemistry.* 54: 2975-2987.

Kilstrup-Nielsen C, Rusconi L, La Montanara P, Ciceri D, Bergo A, Bedogni F, Landsberger N (2012). What we know and would like to know about CDKL5 and its involvement in epileptic encephalopathy. *Neural Plast.* 2012:728267.

Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* 25: 11288-11299.

La Montanara P, Rusconi L, Locarno A, Forti L, Barbiero I, Tramarin M, Chandola C, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N (2015). Synaptic synthesis, dephosphorylation, and degradation: a novel paradigm for an activity-dependent neuronal control of CDKL5. *J Biol Chem.* 290: 4512-4527.

Lee CC, Huang CC, Hsu KS (2011). Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology.* 61: 867-879.

Leoncini S, De Felice C, Signorini C, Zollo G, Cortelazzo A, Durand T, Galano JM, Guerranti R, Rossi M, Ciccoli L, Hayek J (2015). Cytokine Dysregulation in MECP2-and CDKL5-Related Rett Syndrome: Relationships with Aberrant Redox Homeostasis, Inflammation, and  $\omega$ -3 PUFAs. *Oxid Med Cell Longev.* 2015: 421624.

Lipton JO, Sahin M (2014). The neurology of mTOR. *Neuron.* 84: 275-291.

Livide G, Patriarchi T, Amenduni M, Amabile S, Yasui D, Calcagno E, Lo Rizzo C, De Falco G, Ulivieri C, Ariani F, Mari F, Mencarelli MA, Hell JW, Renieri A, Meloni I (2015). GluD1 is a common altered player in neuronal differentiation from both MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPS cells. *Eur J Hum Genet.* 23: 195-201.

Ma XM, Kiraly DD, Gaier ED, Wang Y, Kim EJ, Levine ES, Eipper BA, Mains RE (2008). Kalirin-7 is required for synaptic structure and function. *J Neurosci.* 28: 12368-12382.

Mandela P, Ma XM (2012). Kalirin, a key player in synapse formation, is implicated in human diseases. *Neural Plast.* 2012: 728161.

Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C, Ariani F, Hayek G, Balestri P, Bergo A, Badaracco G, Zappella M, Broccoli V, Renieri A, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N (2005). CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 14: 1935-1946.

Mertz J, Tan H, Pagala V, Bai B, Chen PC, Li Y, Cho JH, Shaw T, Wang X, Peng J (2015). Sequential Elution Interactome Analysis of the Mind Bomb 1 Ubiquitin Ligase Reveals a Novel Role in Dendritic Spine Outgrowth. *Mol Cell Proteomics.* 14: 1898-1910.

Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A, Franco B (1998). Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics.* 51: 427-433.

Murakoshi H, Wang H, Yasuda R (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature.* 472: 100-104.

Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M, Renieri A, Huppke P, Percy AK; RettSearch Consortium (2010). Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol.* 68: 944-950.

Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht DS, Hamakubo T, Fukata M (2009). Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J Cell Biol.* 186: 147-160.

Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ (2006). Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J. Neurosci.* 26: 12977-12983.

Pecorelli A, Ciccoli L, Signorini C, Leoncini S, Giardini A, D'Esposito M, Filosa S, Hayek J, De Felice C, Valacchi G (2011). Increased levels of 4HNE-protein plasma adducts in Rett syndrome. *Clin Biochem.* 44: 368-371.

Pecorelli A, Belmonte G, Meloni I, Cervellati F, Gardi C, Sticozzi C, De Felice C, Signorini C, Cortelazzo A, Leoncini S, Ciccoli L, Renieri A, Jay Forman H, Hayek J, Valacchi G (2015). Alteration of serum lipid profile, SRB1 loss, and impaired Nrf2 activation in CDKL5 disorder. *Free Radic Biol Med.* 86: 156-165.

Rademacher N, Hambrock M, Fischer U, Moser B, Ceulemans B, Lieb W, Boor R, Stefanova I, Gillessen-Kaesbach G, Runge C, Korenke GC, Spranger S, Laccone F, Tzschach A, Kalscheuer VM (2011). Identification of a novel CDKL5 exon and pathogenic mutations in patients with severe mental retardation, early-onset seizures and Rett-like features. *Neurogenetics.* 12: 165-167.

Ricciardi S, Kilstrup-Nielsen C, Bienvenu T, Jacquette A, Landsberger N, Broccoli V (2009). CDKL5 influences RNA splicing activity by its association to the nuclear speckle molecular machinery. *Hum Mol Genet.* 18: 4590-4602.

Ricciardi S, Boggio EM, Grosso S, Lonetti G, Forlani G, Stefanelli G, Calcagno E, Morello N, Landsberger N, Biffo S, Pizzorusso T, Giustetto M, Broccoli V (2011). Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum Mol Genet.* 20: 1182-1196.

Ricciardi S, Ungaro F, Hambrock M, Rademacher N, Stefanelli G, Brambilla D, Sessa A, Magagnotti C, Bachi A, Giarda E, Verpelli C, Kilstrup-Nielsen C, Sala C, Kalscheuer VM, Broccoli V (2012). CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nat Cell Biol.* 14:911-923.

Rosas-Vargas H, Bahi-Buisson N, Philippe C, Nectoux J, Girard B, N'Guyen Morel MA, Gitiaux C, Lazaro L, Odent S, Jonveaux P, Chelly J, Bienvenu T (2008). Impairment of CDKL5 nuclear localisation as a cause for severe infantile encephalopathy. *J Med Genet.* 45: 172-178.

Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, Landsberger N (2008). CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem.* 283: 30101-30111.

Rusconi L, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N (2011). Extrasynaptic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor stimulation induces cytoplasmic translocation of the CDKL5 kinase and its proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 286: 36550-36558.

Saci A, Cantley LC, Carpenter CL (2011). Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol. Cell* 42: 50–61.

Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, Finkel T (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* 281: 27643-27652.

Sekiguchi M, Katayama S, Hatano N, Shigeri Y, Sueyoshi N, Kameshita I (2013). Identification of amphiphysin 1 as an endogenous substrate for CDKL5, a protein kinase associated with X-linked neurodevelopmental disorder. *Arch Biochem Biophys.* 535: 257-267.

Stagi S, Cavalli L, Congiu L, Scusa MF, Ferlini A, Bigoni S, Benincasa A, Rossi B, Pini G (2015). Thyroid function in Rett syndrome. *Horm Res Paediatr.* 83: 118-125.

Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 467–472.

Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat. Neurosci.* 8: 1727–1734.

Tischmeyer W, Schicknick H, Kraus M, Seidenbecher CI, Staak S, Scheich H, Gundelfinger ED (2003). Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory, *Eur. J. Neurosci.* 18: 942–950.

Urbanska M, Gozdz A, Swiech LJ, Jaworski J (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 287: 30240-30256.

Valli E, Trazzi S, Fuchs C, Erriquez D, Bartesaghi R, Perini G, Ciani E (2012). CDKL5, a novel MYCN-repressed gene, blocks cell cycle and promotes differentiation of neuronal cells. *Biochim Biophys Acta.* 1819: 1173-1185.

Wang IT, Allen M, Goffin D, Zhu X, Fairless AH, Brodtkin ES, Siegel SJ, Marsh ED, Blendy JA, Zhou Z (2012). Loss of CDKL5 disrupts kinome profile and event-related potentials leading to autistic-like phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 21516-21521.

Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans

J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Gécz J (2004). Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 75: 1079-1093.

Williamson SL, Giudici L, Kilstrup-Nielsen C, Gold W, Pelka GJ, Tam PP, Grimm A, Prodi D, Landsberger N, Christodoulou J (2012). A novel transcript of cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) has an alternative C-terminus and is the predominant transcript in brain. *Hum Genet.* 131: 187-200.

Woo S, Gomez TM (2006). Rac1 and RhoA promote neurite outgrowth through formation and stabilization of growth cone point contacts. *J. Neurosci.* 26: 1418-1428.

Yoon KJ, Lee HR, Jo YS, An K, Jung SY, Jeong MW, Kwon SK, Kim NS, Jeong HW, Ahn SH, Kim KT, Lee K, Kim E, Kim JH, Choi JS, Kaang BK, Kong YY (2012). Mind bomb-1 is an essential modulator of long-term memory and synaptic plasticity via the Notch signaling pathway. *Mol Brain* 5: 40.

Yoshii A, Murata Y, Kim J, Zhang C, Shokat KM, Constantine-Paton M (2011). TrkB and protein kinase Mζ regulate synaptic localization of PSD-95 in developing cortex. *J Neurosci.* 31: 11894-11904.

Zhang Y, Matt L, Patriarchi T, Malik ZA, Chowdhury D, Park DK, Renieri A, Ames JB, Hell JW (2014). Capping of the N-terminus of PSD-95 by calmodulin triggers its postsynaptic release. *EMBO J.* 33: 1341-1353.

Zhu YC, Li D, Wang L, Lu B, Zheng J, Zhao SL, Zeng R, Xiong ZQ (2013). Palmitoylation-dependent CDKL5-PSD-95 interaction regulates synaptic targeting of CDKL5 and dendritic spine development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 9118-9123.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011). mTOR: from growth signal intergration to cancer diadetes and ageing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 21-35.