

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA  
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOLOGICHE E MEDICHE  
CORSO DI DOTTORATO IN NEUROBIOLOGIA



**CDKL5 E SINDROME DI RETT: UN APPROCCIO MOLECOLARE  
PER LA DEFINIZIONE DI UNA CORRELAZIONE  
GENOTIPO/FENOTIPO**

**Coordinatore:  
Prof.ssa Daniela Parolaro**

**Docente guida:  
Prof.ssa Nicoletta Landsberger**

**Tesi di Dottorato di:  
Dott. Dionigio Antonio Prodi  
Matricola n. 710652**

*Ai miei genitori  
che mi hanno insegnato a non arrendermi mai  
e a migliorarmi continuamente*

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	pag.1
<b>INTRODUZIONE</b>	pag.3
Cenni storici	pag.3
Caratteristiche cliniche della sindrome di Rett	pag.4
Genetica della sindrome di Rett	pag.5
MeCP2 e la sindrome di Rett	pag.6
Modelli murini per MeCP2	pag.7
MeCP2 come regolatore trascrizionale	pag.8
Variabilità fenotipica della sindrome di Rett	pag.11
CDKL5: differenti geni, stessa malattia	pag.13
CDKL5 e la maturazione neuronale	pag.14
Il centrosoma e migrazione neuronale	pag.16
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag.19
Plasmidi	pag.19
Anticorpi	pag.19
Colture cellulari e trasfezioni	pag.19
Frazionamento nucleo-citoplasma	pag.20
Immunofluorescenze	pag.21
Saggio di chinasi	pag.21
Saggio di stabilità ed inibizione del proteasoma	pag.22
Sincronizzazione di cellule proliferanti	pag.22
Analisi bioinformatiche	pag.22
<b>RISULTATI</b>	pag.24
Effetti delle mutazioni puntiformi del dominio chinamico sulla localizzazione subcellulare di CDKL5	pag.25
Effetti delle mutazioni puntiformi del dominio chinamico sull'attività catalitica	pag.26
Ogni mutazione ha un effetto sull'attività molecolare della proteina: saggio di stabilità	pag.28
Predizione dell'effetto delle mutazioni sulla struttura tridimensionale e sulla funzione della proteina	pag.29
CDKL5 colocalizza con il centrosoma sia in cellule proliferanti che in colture di neuroni corticali primari in via di maturazione	pag.32
<b>DISCUSSIONE</b>	pag.40
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag.48

## RIASSUNTO

La sindrome di Rett è una grave malattia del neurosviluppo legata al cromosoma X che colpisce principalmente individui di sesso femminile. Le bambine affette da sindrome di Rett subiscono uno sviluppo postnatale apparentemente normale fino all'età di 6-18 mesi, per poi manifestare un marcato declino neurologico con decorso molto variabile. Circa il 25% delle pazienti sono affette da forme atipiche che si discostano dalla forma classica o per il fatto di essere più blande con un iter meno devastante o per un fenotipo più “aggressivo” con insorgenza precoce che può portare anche a crisi epilettiche non trattabili farmacologicamente.

La maggior parte dei casi di forma classica di Rett è causata da mutazioni nel gene *MECP2*, un repressore trascrizionale espresso maggiormente nel cervello che lega il DNA metilato e che causa la formazione di una struttura cromatinica compatta e trascrizionalmente inerte. Circa solo il 50% delle pazienti con varianti della sindrome di Rett però sono portatrici di mutazioni in questo gene. Per questa classe di fenotipi sono state descritte nel 2004 mutazioni a carico del gene *CDKL5* codificante per una serin-treonina chinasi e nel 2008 altre a carico del gene *FOXG1*, un fattore trascrizionale. La ricerca scientifica ha quindi ampliato i propri obiettivi al fine di comprendere se questi tre geni, apparentemente diversi fra loro, potessero essere accomunati da uno stesso *pathway* molecolare. A tutt'oggi però i risultati sono ancora scarsi e, a volte, contraddittori. Per quanto riguarda gli studi su *CDKL5*, un aspetto generalmente accettato risiede nel fatto che in tutti i casi l'attività catalitica di *CDKL5* appare di estrema importanza. Con questa premessa, sarebbe quindi interessante osservare con quale modalità le mutazioni a carico di *CDKL5* possano influire sulla sua funzione enzimatica.

L'obiettivo della mia ricerca è stato quello di analizzare otto mutazioni puntiformi (A40V, N71D, V132G, R178W, W195R, E203D, L220P e T288I) giacenti sul dominio catalitico di *CDKL5*. Queste mutazioni sono state riscontrate in pazienti con la variante Hanefeld. Per ogni mutazione è stata valutata la localizzazione cellulare e l'attività chinasi sul motivo TEY. Inoltre, grazie all'ausilio di strumenti bioinformatici, è stato creato un modello tridimensionale del dominio chinasi di *CDKL5* ed è stato possibile predire l'influenza che ogni mutazione ha sulla struttura della proteina.

L'analisi di localizzazione subcellulare ci ha permesso di concludere che in generale le mutazioni a carico del dominio catalitico non influenzano in maniera significativa la distribuzione di CDKL5 all'interno della cellula, a differenza delle mutazioni troncanti sulla coda carbossiterminale, precedentemente analizzate nel nostro laboratorio. Ciononostante per le mutazioni W195R e E203D si è osservato un accumulo della proteina nel compartimento citoplasmatico. E' stata inoltre osservata la perdita della tipica organizzazione in dots di CDKL5. Le analisi bioinformatiche collocano questi due residui nell'  $\alpha$ -elica F del sottodominio IX del dominio chinasi della proteina. A quest'elica, comune alle MAP chinasi, era già stata precedentemente attribuita una cruciale importanza nell'orchestrazione dell'attività chinasi. E' quindi possibile che una sua precisa conformazione spaziale sia necessaria per una corretta interazione con le altre proteine e per una altrettanto corretta distribuzione della proteina all'interno della cellula.

L'analisi dell'attività catalitica invece ha permesso di evidenziare che le mutazioni in esame possono portare a perdita totale di fosforilazione (A40V), a una sua diminuzione (V132G, R178W, W195R, E203D, L220P e T288I) oppure a nessun effetto evidente (N71D). Per questa mutazione perciò è stato proposto un saggio di stabilità che ha evidenziato un'emivita minore rispetto alla forma canonica, dando un'ulteriore prova di come i livelli di CDKL5 probabilmente debbano essere finemente regolati per una sua corretta funzionalità neuronale.

Nell'ultimo periodo del mio dottorato ho avuto inoltre la possibilità di valutare un ipotetico ruolo di CDKL5 nella maturazione neuronale, in quanto è stata osservata la sua presenza a livello dei centrosomi in cellule proliferanti fissate in metafase. E' ormai associato il ruolo del centrosoma nelle tre fasi della maturazione neuronale e perciò ho approfondito questo aspetto verificando la colocalizzazione di CDKL5 nel centrosoma anche in colture di neuroni corticali in via di maturazione. Questa scoperta non chiarisce con certezza quale sia lo specifico ruolo di CDKL5 in questo fenomeno ma offre sicuramente una nuova chiave di lettura per stabilire quale meccanismo neuronale venga a mancare nelle pazienti portatrici di difetti in questo gene.

## INTRODUZIONE

### Cenni storici

La sindrome di Rett è una malattia postnatale del neurosviluppo che colpisce prevalentemente le bambine. Con un'incidenza di 1:10000, è considerata la seconda causa al mondo di ritardo mentale dopo la sindrome di Down. Questa malattia è stata descritta per la prima volta dal pediatra austriaco Andreas Rett (Rett,1966). Dopo aver rivolto la propria attenzione a una bambina disabile che batteva sistematicamente le mani nella sala d'attesa di una clinica pediatrica dove lavorava, il dott. Rett dedicò tutto l'anno successivo alla ricerca di altri pazienti che condividessero le stesse caratteristiche comportamentali e analoghi sintomi neurologici. Individuò altre 22 bambine dalla cui analisi del fenotipo arrivò a delineare una nuova sindrome che oggi porta il suo nome, sebbene questa fu accettata dalla comunità medica solo nel 1983, quando altri 35 casi furono diagnosticati in Inghilterra ad opera del Dott. Bengt Hagberg.

Nel 1999 fu scoperta la causa genetica della sindrome di Rett e fu associata ad un membro della famiglia delle *methyl-CpG-binding proteins*, il gene *MeCP2* (Amir et al, 1999). La sorprendente scoperta che una malattia neurologica come la Sindrome di Rett fosse associata ad un gene coinvolto nella metilazione del DNA aveva aperto nuove prospettive alla neurobiologia e contribuito a considerarla strettamente unita all'epigenetica. Ben presto divenne però evidente che le mutazioni in *MeCP2* non fossero le uniche responsabili della Sindrome di Rett. Infatti, recentemente sono stati scoperti due geni addizionali, *CDKL5* (Tao et al, 2004) e *FOXG1* (Ariani et al, 2008), una serin-treonina chinasi e un fattore trascrizionale, che hanno mostrato mutazioni in pazienti che soffrivano di forme atipiche di Rett. Sebbene le mutazioni finora riscontrate in *CDKL5* e *FOXG1* siano meno rappresentate nel pool mutazionale della sindrome di Rett rispetto a quelle che interessano *MECP2*, esse portano inevitabilmente alla supposizione che questi tre differenti geni che portano a simili sintomi neurologici possano appartenere allo stesso *pathway* molecolare. Attualmente le ricerche sulla sindrome di Rett sono volte a dimostrare la veridicità di questa ipotesi per comprendere meglio l'eziopatogenesi di questa devastante malattia del neurosviluppo.

## **Caratteristiche cliniche della Sindrome di Rett**

Dal punto di vista clinico, la sindrome di Rett può essere divisa in due stadi. Sebbene non ci sia una netta separazione fra di essi, le bambine Rett sembrano svilupparsi normalmente fino ai primi 6-18 mesi di vita e raggiungere importanti capacità comprese quella di stare in piedi, camminare e alcune di loro riescono a raggiungere la capacità di dire qualche parola. Questo stadio è seguito da un arresto dello sviluppo caratterizzato dalla decelerazione della crescita della testa che porta a microcefalia, accompagnata da perdita di peso, ritardo generale nella crescita e una significativa ipotonia muscolare che costringe i pazienti ad assumere una postura scorretta. (Chahrour et al, 2007). Il periodo di stallo dello sviluppo è seguito da una rapida regressione durante la quale diventano evidenti il ritardo mentale e caratteristiche autistiche compresa la perdita delle capacità lessicali acquisite, compromissione delle capacità sociali, scarsa risposta agli stimoli ambientali e perdita dell'espressione facciale (Nomura, 2005). Man mano che la malattia progredisce, i pazienti perdono l'uso intenzionale delle mani e appaiono i caratteristici movimenti stereotipati come il battere delle mani o il mimare il gesto di lavarle o portarle alla bocca (Nomura, 2005). Anomalie del respiro caratterizzano l'inizio delle disfunzioni del sistema autonomo e sono caratterizzate da intense iperventilazioni durante la veglia interrotte da episodi di apnee con violente espulsioni di aria e saliva (Hagberg, 2002). Sebbene non sia comune a tutti i pazienti, un'altra caratteristica spesso associata al fenotipo Rett è il manifestarsi di crisi epilettiche più o meno trattabili (Jian et al, 2006). Queste crisi tendono a diventare meno violente durante l'età adulta (Chahrour et al, 2007). Dopo lo stadio di regressione, la malattia entra in uno stadio stazionario caratterizzato da rigidità muscolare, osteopenia, scoliosi, cifosi, ansia e problemi del sonno. Le disfunzioni del sistema autonomo diventano evidenti ed includono dilatamento delle pupille, disturbi gastrointestinali, costipazione, disfunzione orofaringea, tachicardia e sudorazione anormale (Glaze, 2005). Il deterioramento del sistema motorio forza molti pazienti all'uso della sedia a rotelle durante l'adolescenza e con il progredire degli anni nel paziente si sviluppa un fenotipo simile al Parkinson (Hagberg, 2005). Alla fine le condizioni diventano stazionarie e qualche paziente può sopravvivere anche fino alla sesta o settima decade di vita in una condizione fisica devastante (Chahrour et al, 2007).

Data la complessità del quadro clinico della sindrome di Rett, al momento non è

ancora stata sviluppata una cura efficiente e i trattamenti di supporto si basano su un approccio multidisciplinare. Come trattamenti farmacologici vengono utilizzati anticonvulsivi come la carbamazepina o l'acido valproico, la levocarnitina per migliorare l'aprassia delle mani, naltrexone per stabilizzare i problemi respiratori e la levodopa per alleviare la rigidità muscolare. Oltre alle cure farmacologiche, i pazienti Rett necessitano di terapia fisica per migliorare l'equilibrio e la flessibilità muscolare, terapie di linguaggio per stimolare le loro capacità comunicative e relazionali. Inoltre una dieta controllata è necessaria per migliorare i vari disturbi gastrointestinali (*Rett Syndrome Research Foundation official website*)

### **Genetica della sindrome di Rett**

Dal momento che la maggior parte dei pazienti Rett sono femmine, è stato proposto che la malattia fosse legata al cromosoma X con conseguenze fatali nei maschi emizigoti. Ciononostante più del 95% delle pazienti Rett sono casi sporadici causati da mutazioni *de novo* e ha reso molto difficile il mappaggio del *locus* putativo. Nel 1998 una famiglia brasiliana che mostrava più di una figlia affetta ha reso possibile un'analisi genetica che ha portato all'identificazione della regione genomica Xq28 come candidata a contenere geni responsabili per la sindrome di Rett (Sirianni et al, 1998). Questo studio confermò l'ipotesi che la malattia fosse legata al cromosoma X. L'analisi dell'inattivazione del cromosoma X aveva mostrato che la mamma aveva una modalità di inattivazione sbilanciata, con un X normale attivo nel 95% delle cellule, ma nessuna delle figlie sane o malate mostrava la stessa modalità (Sirianni et al, 1998). Proprio grazie al fenomeno della compensazione da dosaggio, si verifica una grande variabilità fenotipiche tanto che alcune mutazioni che nelle bambine sono compatibili con la vita, possono portare alla morte degli individui di sesso maschile entro il secondo anno di vita (Bienvenu et al, 2006; Schule et al, 2008).

Un anno più tardi, nel 1999, uno screening genetico dei geni candidati nella sindrome di Rett aveva rilevato mutazioni a carico del gene *MECP2* nella regione Xq28 (Amir et al, 1999). Le mutazioni su questo gene sono responsabili di più del 90% dei classici casi di Rett classica ed includono mutazioni missenso, nonsense, delezioni e frameshift.



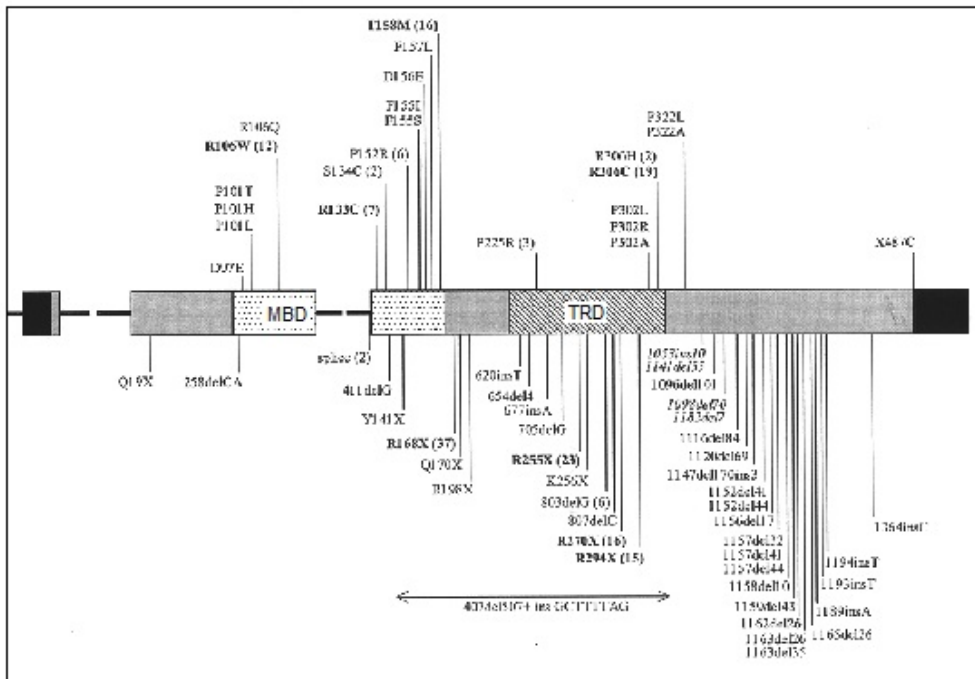


Fig.1. Rappresentazione schematica di MeCP2 in cui è possibile visualizzare alcune delle mutazioni finora note. Nella parte superiore sono indicate tutte le mutazioni missenso mentre nella parte inferiore sono presenti le mutazioni non senso, delezioni e inserzioni.

### MeCP2 e la sindrome di Rett

MeCP2 è stata scoperta nel 1992 (Meehan, 1992). Appartiene alle *methyl-CpG-binding proteins*, un'eterogenea famiglia di proteine che condividono la capacità di legare il DNA metilato attraverso un *methyl binding domain* (MBD) (Hendrich et al, 1998). Esse condividono un altro dominio funzionale altamente conservato che serve come segnale di localizzazione nucleare (NLS), identificato sperimentalmente nel gene di ratto (Nan et al, 1996). Una terza regione comune a tutti i membri di questa famiglia è rappresentata dal dominio di repressione trascrizionale (TRD), che ha la capacità di reclutare altre proteine e complessi per poter espletare la propria funzione. Il dominio carbossiterminale della proteina è necessario per facilitare il legame al DNA e condensare la cromatina e contiene anche una ripetizione di proline coinvolte nel legame ai fattori di splicing (Buschdorf et al, 2004).

MeCP2 viene espressa in un'ampia varietà di tessuti, ma appare particolarmente abbondante nel cervello (Guy et al, 2010). Un saggio quantitativo normalizzato utilizzando proteine citoplasmatiche ha suggerito che essa è presente ad alti livelli anche nei polmoni e nella milza (Shahbazian et al, 2002b). La quantificazione diretta nel cervello di topo adulto ha stimato circa 16 milioni di molecole di

MeCP2 per ogni nucleo nei neuroni contro una quantità di 60 ordini inferiore nel fegato (Skene et al, 2010). I livelli neuronali di MeCP2 sono comunque relativamente bassi alla nascita ma, nel topo è stato visto che vengono massivamente incrementati durante le prime tre settimane di vita fino a raggiungere un plateau (Kishi et al, 2004; Skene et al, 2010)

Nel corso degli ultimi anni sono state riportate numerose mutazioni associate alla Rett. In attesa di trovare una correlazione tra genotipo e fenotipo, è emerso un quadro generale: mutazioni che portano ad un'interruzione di MeCP2 nel suo dominio C-terminale sono caratteristiche di pazienti con una patologia meno devastante, mentre mutazioni missenso nella porzione N-terminale portano a fenotipi più gravi (Charman et al, 2005).

### **Modelli murini per MeCP2**

Nel 2001 sono stati pubblicati i primi topi privi di MeCP2 (Chen et al, 2001, Guy et al, 2001). Entrambi i modelli sono stati sviluppati utilizzando la tecnologia Cre-loxP per evitare possibili letalità embrionali e per creare dei modelli knock-out condizionali. I topi maschi emizigoti privi di MeCP2 riassumono molte caratteristiche della sindrome di Rett: sono normali alla nascita ma successivamente sviluppano movimenti scoordinati e irregolarità nella respirazione tra le tre e le otto settimane di vita (Chen et al, 2001; Guy et al, 2001); per poi morire approssimativamente alla decima settimana. Inoltre, delezioni condizionali del gene *Mecp2* in neuroni postmitotici riassumono le stesse caratteristiche dei topi generalmente privi di MeCP2, suggerendo che l'espressione di questa proteina è necessaria per il corretto funzionamento dei neuroni maturi. E' interessante osservare come anche i topi transgenici che overesprimono MeCP2 sviluppano un fenotipo molto simile alla sindrome di Rett (Collins et al, 2004). Questo dato insieme alle osservazioni delle duplicazioni dell'intero locus di MeCP2 trovato in pazienti con la sindrome di Rett (Ariani et al, 2004; Meins et al, 2005) indica che i livelli di MeCP2 devono essere finemente regolati per permettere un corretto sviluppo neuronale.

## **MeCP2 come regolatore trascrizionale**

Per capire la patogenesi della sindrome di Rett devono essere prese in considerazione sia la funzione che la localizzazione della proteina. Si pensava che MeCP2, in quanto membro delle methyl-CpG-binding proteins agisse come un repressore della trascrizione dipendente dalla metilazione del DNA. Infatti, studi di immunofluorescenza hanno mostrato che MeCP2 è localizzata nel nucleo delle linee cellulari di topo dove colocalizza con l'eterocromatina mostrando una colorazione a puntini (Nan, 1996). L'attività di repressore trascrizionale di MeCP2 è stata per la prima volta suggerita da esperimenti in vitro che mostravano che MeCP2 è capace di legare ed inibire la trascrizione di promotori metilati ma non di quelli non metilati (Nan, 1997). Tuttavia, sebbene fosse abbastanza chiaro che MeCP2 agisse come repressore trascrizionale, non si capiva ancora come potesse espletare la loro funzione. Nel 1998 si scoprì che il dominio TRD di MeCP2 è fondamentale per l'attività di repressione trascrizionale: infatti MeCP2 è capace di interagire tramite questo dominio con un complesso co-repressorio contenente mSin3A, e l'istone deacetilasi HDAC 1, 2 e 3 (Nan, 1998; Jones, 1998).

In aggiunta a mSin3A e le HDAC, MeCP2 può anche interagire con altre proteine connesse con la modificazione della cromatina e il silenziamento genico. Tra queste possiamo ricordare Brahma (BRM), un componente catalitico del complesso di rimodellamento cromatinico SWI/SNF coinvolto nella repressione dei geni metilati, che è stato trovato associato ad MeCP2 (Harikrishnan et al, 2005). Il silenziamento di BRM causa derepressione dei geni target di MeCP2, dimostrando che BRM è necessario per la repressione mediata da MeCP2 (Harikrishnan et al, 2005). Inoltre MeCP2 è anche associata alla metilazione istonica: MeCP2 può interagire con una metiltrasferasi capace di modificare Lys9 dell'istone H3 (Fuks et al, 2002). Questi dati dimostrano che MeCP2 è un repressore trascrizionale che, principalmente attraverso il dominio TRD recluta proteine e complessi su promotori metilati capaci di reprimere la trascrizione.

Anche se MeCP2 è virtualmente capace di legare qualsiasi promotore metilato, il fatto che mutazioni in MeCP2 possano causare una malattia neurologica come la sindrome di Rett suggerisce che MeCP2 possa funzionare anche in altri modi finora sottovalutati. Un recente studio mirato alla stima della quantità di questa proteina nei neuroni, ha gettato nuove prospettive sul suo probabile ruolo nel cervello. La quantificazione in nuclei isolati da neuroni ha rilevato la presenza di

tante molecole di MeCP2 ( $1,6 \times 10^7$ ) quanti i nucleosomi ( $3 \times 10^7$ ) e residui di CpG metilati ( $5 \times 10^7$ ). Ciò significa che MeCP2 è sufficientemente abbondante per coprire tutto il cromosoma (Guy et al, 2010). La distribuzione su tutto il genoma di MeCP2 ha delle conseguenze sulla generale struttura cromatinica. Era già stato osservato che in assenza di MeCP2 l'acetilazione istonica viene notevolmente incrementata (Shahbazian et al, 2002a). Uno studio sull'acetilazione istonica condotto parallelamente su nuclei di neuroni e di cellule gliali ha mostrato che l'iperacetilazione data dalla carenza di MeCP2 interessa esclusivamente le cellule neuronali, mentre i livelli di acetilazione istonica nelle cellule gliali non vengono influenzati dalla presenza o dall'assenza di MeCP2. Queste scoperte suggeriscono che MeCP2 nei neuroni incida profondamente sui livelli di acetilazione dell'intero complesso cromatinico. Alcuni corepressori mediano il silenziamento, almeno in parte, tramite associazione con le istone deacetilasi (HDACs). MeCP2 potrebbe quindi reprimere l'acetilazione istonica (Guy et al, 2010). Quest'idea è supportata dal fatto che la repressione mediata da MeCP2 sia sensibile alla tricostatina A, un inibitore delle HDAC.

A supporto dell'idea che MeCP2 non sia un semplice repressore trascrizionale contribuisce l'osservazione che il profilo di trascrizione di tessuto cerebrale di topi knock-out per MeCP2 non rileva cambi di espressione nella maggior parte dei geni (Tudor et al, 2002). Ciò ha portato gli scienziati ad analizzare geni candidati target di MeCP2, la cui deregolazione potrebbe giustificare i sintomi neurologici della sindrome di Rett. Finora sono stati trovati diversi geni candidati come target di MeCP2, alcuni dei quali sono stati confermati mentre altri portano a risultati contrastanti nei diversi laboratori.

Uno dei più interessanti geni target confermati è BDNF (Chen et al, 2003; Martinowich et al, 2003). BDNF è coinvolto nella plasticità neuronale adulta (Poo, 2001), nella sopravvivenza neuronale (Ghosh et al, 1994) e nello sviluppo neuronale (Bonni et al, 1999; Cohen-Cory et al, 2010) e questo risulta in linea con l'insorgenza della sindrome di Rett. Saggi di ChIP hanno dimostrato che MeCP2 si associa con il promotore III della BDNF murina nei neuroni corticali in coltura e media la sua repressione trascrizionale (Chen et al, 2003; Martinowich et al, 2003). E' stato dimostrato che in risposta alla depolarizzazione della membrana, MeCP2 è fosforilata sulla serina 421 e non lega il promotore di BDNF permettendo la sua trascrizione (Chen et al, 2003; Martinowich et al, 2003; Zhou

et al, 2006). In linea con ciò, è stato dimostrato che i livelli basali di trascrizione di *Bdnf* sono raddoppiati in assenza di MeCP2, ma dopo la depolarizzazione della membrana essi non vengono influenzati (Chen et al, 2003).

Inoltre i mutanti di MeCP2 dovrebbero esprimere alti livelli di BDNF quando tutti i neuroni sono silenziati. Al contrario studi in vivo hanno dimostrato che i livelli di BDNF sono diminuiti di circa il 70% nei topi mancanti di MeCP2 se comparati coi fratelli sani (Chang et al, 2006). Una ragione di questa discrepanza potrebbe essere che i livelli di BDNF dipendano dall'attività neuronale e la mancanza di MeCP2 possa causare una riduzione dell'attività neuronale che indirettamente causa un decremento nei livelli di proteina BDNF (Chang et al, 2006).

Sono stati condotti altri studi volti alla valutazione dei cambi di livelli di espressione nei modelli murini mancanti di MeCP2 osservando sia i trascritti genici che i microRNA, ma in generale non hanno rilevato sostanziali differenze di espressione e spesso i dati sono risultati contrastanti e non riproducibili. Non è ancora chiaro se ciò sia dovuto ad una proteina incapace di regolare l'espressione di singoli geni o a problemi legati all'affidabilità delle metodologie usate (Guy et al, 2010).

Dando una visione globale alle varie osservazioni, si può comunque dedurre che MeCP2 è capace di regolare la trascrizione in maniera dipendente dall'attività. Dal momento che la trascrizione dipendente dall'attività gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e plasticità sinaptica, MeCP2 potrebbe essere coinvolta nella regolazione della maturazione sinaptica.

MeCP2 influenza molti processi che prendono parte allo sviluppo neuronale e la maturazione neuronale, come lo sviluppo dell'arborizzazione dendritica, la crescita delle spine e la plasticità sinaptica. Infatti i cervelli dei pazienti Rett pesano meno rispetto a quelli di controlli sani della stessa età e peso (Armstrong, 2001) e da studi su tessuti post mortem di cervelli di pazienti Rett si è dimostrato che ciò deriva dal fatto che i neuroni mostrano una minor complessità nell'arborizzazione dendritica, spine meno numerose e più piccole senza segni di degenerazione, atrofia o difetti di migrazione neuronale (Armstrong et al, 1995 e 1998). In accordo con queste osservazioni, l'overespressione di mutanti MeCP2 in neuroni ippocampali causa una marcata riduzione nella densità delle spine mature (Chapleau et al, 2009) e gli stessi effetti sono stati osservati silenziando MeCP2 attraverso shRNA.

I topi mancanti di MeCP2 riassumono le caratteristiche delle pazienti Rett: nelle sezioni di ippocampo, corteccia e cervelletto di questi topi, i corpi cellulari e i nuclei dei neuroni sono più piccoli, più densamente impaccati e meno complessi rispetto ai neuroni normali (Chen et al, 2001; Kishi et al, 2004). Inoltre i topi senza MeCP2 mostrano anche una corteccia più sottile rispetto a quella dei topi di controllo (Kishi et al, 2004) e un cervello ridotto in misura e peso (Chen et al, 2001). Queste scoperte, insieme ai risultati sopra menzionati, supportano l'ipotesi che un difetto di MeCP2 non scateni un processo neurodegenerativo ma influenzi la maturazione neuronale e la differenziazione terminale.

L'ipotesi che la sindrome di Rett non fosse una malattia neurodegenerativa fu confermata nel 2007 quando il gruppo del Dott. Bird sviluppò un modello murino reversibile di sindrome di Rett. Questo topo ha il gene di MeCP2 silenziato attraverso un'inserzione di una cassetta LoxP-Stop\_LoxP che può essere condizionalmente excisa da un transgene Cre tamoxifene-inducibile (Guy et al, 2007). Quando viene somministrato tamoxifene al topo, la ricombinazione porta alla delezione del codone di stop e quindi la produzione di MeCP2 a livelli fisiologici può essere ripristinata. La conseguenza è che i sintomi Rett scompaiono e i topi guariscono (Guy et al, 2007). Questo lavoro rappresenta una grande svolta nella ricerca nella sindrome di Rett perchè dimostra che il fenotipo è reversibile e conferma MeCP2 come principale regolatore dello sviluppo neuronale.

### **Variabilità fenotipica della sindrome di Rett**

Col procedere della ricerca sulla sindrome di Rett appariva sempre più chiaro che la malattia può manifestarsi in forme atipiche che differiscono dalla forma clinica classica (Hagberg, 2002). Queste includono varianti caratterizzate da un fenotipo più blando e meno grave e altre che invece sono più invalidanti. La forma “a frusta”, ad esempio, è una variante meno devastante: ha un'età tardiva di insorgenza, la maggior parte delle capacità motorie sono preservate così come, a volte, le capacità lessicali. Un'altra forma benigna è la variante con preservazione del linguaggio (PSV), dove i pazienti possono dire qualche parola e hanno una circonferenza del capo normale (Zappella et al, 2001). Le varianti più gravi includono la congenita e la variante Hanefeld. Nella forma congenita si perde il normale periodo di sviluppo e i sintomi si manifestano subito dopo la nascita. La

variante Hanefeld invece, è una forma di Rett con insorgenza e crisi epilettiche prima dei sei mesi di età (Hanefeld, 1985). Questa variabilità può essere dovuta alla tipologia e localizzazione di mutazioni nel gene *Mecp2*, alle particolari combinazioni alleliche dell'individuo o alla presenza di mutazioni in altri geni. Comunque una delle maggiori risorse della variabilità fenotipica nelle femmine è la modalità di inattivazione del cromosoma X (XCI). Infatti nel cervello dei topi eterozigoti con mutazioni in *Mecp2* avvengono inattivazioni asimmetriche e la variabilità fenotipica correla col grado di asimmetria (Young et al, 2004). Inoltre, il fatto che mutazioni in MeCP2 sono state riscontrate nel 90% dei casi classici di Rett e solo nel 47-50% dei casi atipici, indica che mutazioni in altri geni potrebbero giustificare le forme atipiche della sindrome di Rett. Infatti sono stati trovati altri due geni mutati nelle bambine con sindrome di Rett: *FOXG1* è mutato in alcune bambine che soffrono della variante congenita (Ariani et al, 2008) ed è un fattore di trascrizione cruciale per il corretto sviluppo del telencefalo (Hebert et al, 2008); *CDKL5* invece è mutata in pazienti che soffrono della variante Hanefeld (Scala et al, 2005) e codifica per una serin-treonina chinasi non ancora ben caratterizzata (Montini et al, 1998).

### **CDKL5: geni differenti, stessa malattia.**

CDKL5 è una serin-treonin chinasi che è stata identificata per la prima volta nel 1998 da Montini et al. Il gene è stato isolato e localizzato in posizione Xp22 tramite clonaggio posizionale. L'analisi della sua sequenza nella porzione N-terminale ha rilevato alta omologia con molti geni codificanti per serin-treonin chinasi e perciò fu chiamata STK9 (Montini et al, 1998). Il gene fu poi rinominato CDKL5 (*Cyclin Dependent Kinase Like 5*) in quanto il suo dominio chinasico condivide alta omologia con le CDK (*Cyclin Dependent Kinases*) che regolano il ciclo cellulare (Montini et al, 1998). Nel 2004 sono state riportate per la prima volta mutazioni nel gene CDKL5 in bambine a cui era stata diagnosticata una forma atipica di Rett e che soffrivano di crisi epilettiche intrattabili dalle prime settimane di età (Weaving et al, 2004; Tao et al, 2004). Da allora, gli screening genetici di CDKL5 in pazienti Rett hanno rilevato altre mutazioni comprese delezioni, inversioni e mutazioni missenso.

Tutte queste mutazioni sono state trovate in pazienti che presentavano la variante Hanefeld e altre forme di ritardo mentale e che soffrivano di crisi epilettiche prima dei tre mesi di età (Evans et al, 2005; Scala et al, 2005; Archer et al, 2006; Artuso et al, 2010).

Il gene di CDKL5 consiste di 23 esoni, i cui primi 3 non sono tradotti (chiamati 1, 1a e 1b) mentre nell'esone 2 è presente l'ATG (Kalscheuer et al, 2003). Questo gene genera due diversi trascritti: l'isoforma I contiene l'esone 1 ed è espresso ad alti livelli in tutte le cellule, mentre l'isoforma II contiene gli esoni 1a e 1b e la sua espressione è alta solo nel cervello fetale e adulto e nei testicoli ed è assente nelle altre linee cellulari (Kalscheuer et al, 2003). Recentemente sono state ritrovate due nuovi varianti di splicing: la prima è dovuta ad una inserzione di 123 bp tra l'esone 16 e l'esone 17 che porta ad una proteina con 41 amminoacidi aggiuntivi, la cui espressione è stata riscontrata sia nel cervello di topo che in quello umano (Rademacher et al, 2010, Fichou et al, 2011); la seconda invece termina con l'introne 18 e codifica una proteina di 107 kDa che appare più stabile rispetto alla forma canonica di 115 kDa (Williamson et al, 2011). La regione N-terminale contiene il dominio catalitico che consiste in un sito di legame per l'ATP e un dominio altamente conservato tipico del serin-treonin chinasi che mostra altissima omologia con le MAP chinasi e con le proteine CDK (Montini et al, 1998). Per quanto riguarda la coda C-



terminale non si hanno molte informazioni considerato il fatto che non mostra nessuna analogia con altre proteine se non per una piccola porzione (aa 836-845; LKSLRKLLHL) che condivide con la sequenza consenso NES (*nuclear export signal*; Rusconi et al, 2008). Ciononostante, le conoscenze finora acquisite portano a considerarla come parte regolatoria della sua attività. Infatti nel nostro laboratorio è stato dimostrato che alcune mutazioni in CDKL5 che portano alla prematura interruzione nella sintesi della proteina sono responsabili di un suo accumulo nel compartimento nucleare e ad un incremento dell'attività catalitica.

### **CDKL5 e la maturazione neuronale**

Dal momento che mutazioni in *MECP2* e *CDKL5* portano a simili fenotipi, si è ipotizzato un loro coinvolgimento in uno stesso percorso molecolare. Infatti, saggi di immunoprecipitazione hanno dimostrato che CDKL5 ed MeCP2 possono interagire sia in vitro che in vivo attraverso il loro dominio C-terminale (Mari et al, 2005). In aggiunta i saggi di fosforilazione hanno mostrato che CDKL5 è capace di autofosforilarsi e di mediare in vitro la fosforilazione di MeCP2 (Mari et al, 2005). Queste scoperte indicano che CDKL5 lavora a monte di MeCP2 influenzando la sua fosforilazione che è cruciale per la regolazione delle sue attività.

Le due proteine inoltre mostrano un simile profilo d'espressione: CDKL5 come MeCP2 mostra bassi livelli durante l'embriogenesi per aumentare a E16.5 e durante gli stadi postnatali, raggiungendo un picco stabile a P14 (Rusconi et al, 2008). Tuttavia CDKL5 raggiunge il picco più tardi nello sviluppo rispetto ad MeCP2: infatti mentre MeCP2 è indotta durante l'embriogenesi durante la maturazione dei neuroni, i livelli di CDKL5 sono molto bassi durante l'embriogenesi e sono fortemente rilevabili negli stadi postnatali (Mari et al, 2005). I due geni mostrano anche differenti livelli d'espressione in specifiche aree del cervello: mentre MeCP2 è più abbondante nel cervelletto, CDKL5 è molto espressa nell'ippocampo, corteccia e striato. Questi dati suggeriscono che CDKL5 può esercitare le sue funzioni indipendentemente da MeCP2. Inoltre, mentre MeCP2 risulta quasi esclusivamente nucleare, saggi di immunofluorescenza e western blot hanno mostrato che CDKL5 endogena è equamente distribuita tra il nucleo e il citoplasma (Rusconi et al, 2008). Inoltre, la distribuzione subcellulare di CDKL5 appare regolata durante

l'embriogenesi: infatti risulta più citoplasmatica durante le fasi tardive dell'embriogenesi e le prime fasi postnatali, mentre diviene più nucleare da P14 in poi (Rusconi, 2008), indicando un accumulo nel nucleo che correla con la maturazione neuronale e, forse, suggerisce la capacità di svolgere ruoli diversi nei neuroni a seconda della fase di sviluppo. Lo spostamento di CDKL5 tra il nucleo e il citoplasma è regolato dalla sua coda C-terminale: infatti l'overespressione in cellule HeLa del mutante sintetico  $\Delta 832$  di CDKL5 che perde una porzione della coda C terminale mostra un accumulo di proteina nella frazione citoplasmatica (Rusconi et al, 2008). Queste osservazioni suggeriscono che CDKL5, al di là di un suo coinvolgimento nella fosforilazione di MeCP2, gioca altri importanti ruoli nei neuroni in maniera indipendente da MeCP2. In accordo con ciò è stata dimostrata la capacità della proteina di interagire con la DNA metil-transferasi I (Kameshita et al, 2008); inoltre, è interessante notare che CDKL5 ha una distinta colorazione a punti (dots) sia nel nucleo che nel citoplasma (Rusconi et al, 2008). I dots nucleari di CDKL5 colocalizzano con SC35 e Sm (Ricciardi et al, 2009): questi sono fattori di splicing che si accumulano in strutture subnucleari conosciute come “macchioline nucleari” (Lamond et al, 2003).

Poco è ancora conosciuto sulla frazione citoplasmatica di CDKL5. Tuttavia recentemente è stato dimostrato che CDKL5 gioca un ruolo nello sviluppo dell'arborizzazione neuronale (Chen et al, 2010). Infatti neuroni corticali primari trasfettati con shRNA contro CDKL5 mostra un marcato decremento nella lunghezza sia dei dendriti che degli assoni, incidendo anche sulla complessità dell'arborizzazione dendritica (Chen et al, 2010). Al contrario l'overespressione di CDKL5 incrementa la lunghezza totale dei dendriti (Chen et al, 2010). Simili effetti sono stati visti in vivo utilizzando l'elettroporazione in utero, indicando che CDKL5 regola la morfogenesi neuronale sia in vitro che in vivo (Chen et al, 2010). Curiosamente, CDKL5 è capace di interagire con Rac1, una Rho GTPasi coinvolta nella regolazione dell'actina citoscheletrica e la morfogenesi neuronale. Inoltre, cambi nei livelli di Rac1 sono capaci di mimare gli effetti di CDKL5 sulla morfogenesi neuronale: la co-espressione di Rac1 e dello shRNA di CDKL5 previene l'inibizione della crescita dendritica, mentre la coespressione di CDKL5 e un dominante negativo di Rac1 abolisce l'incremento di crescita dei dendriti (Chen et al, 2010).

I dati finora ottenuti sulla struttura e funzione di CDKL5 portano sicuramente ad ipotizzare che questa proteina sia dotata di una notevole versatilità e che abbia ruoli diversi nel nucleo e nel citoplasma, ma è indubbio che servano ulteriori approfondimenti per dettagliare meglio le sue funzioni e il suo coinvolgimento nell'eziopatogenesi della sindrome di Rett.

### **Centrosoma e migrazione neuronale**

Durante l'ultimo periodo del mio dottorato sono emersi dei dati che suggeriscono un'inaspettata interazione di CDKL5 con il centrosoma. Ho considerato quindi opportuno approfondire questo aspetto per poter attribuire a questa interazione un ruolo chiave nell'insorgenza della sindrome di Rett.

Il centrosoma fu descritto per la prima volta nei primi anni del 1900 da Theodor Boveri (Boveri, 1901). Può essere riconosciuto al microscopio come una piccola struttura densamente colorata adiacente al nucleo delle cellule eucarioti composta da due centrioli circondati da una matrice proteica amorfa chiamata materiale pericentriolare (Badano et al, 2005). Si tratta di un organello altamente organizzato la cui principale funzione è legata all'organizzazione dei microtubuli. Per espletare questa funzione il centrosoma si avvale della cooperazione di diverse proteine che partecipano nella nucleazione ( $\gamma$ -tubulina, pericentrina, polo chinasi, aurora chinasi), nell'ancoraggio (nineina, centriolina, dinactina) e rilascio (catanina) dei microtubuli dal centrosoma (Nigg et al, 2004).

La maggior parte delle ricerche rivolte allo studio del centrosoma sono state finora focalizzate sulla sua funzione come regolatore dei microtubuli e della divisione cellulare. Infatti durante l'interfase i microtubuli si organizzano in maniera tale da radiare dal centrosoma fungendo da ponteggio per dirigere il passaggio di vescicole ed organelli (Thyberg et al, 1999). Durante la mitosi il centrosoma media l'assemblaggio e l'organizzazione del fuso mitotico che è richiesto per la corretta segregazione cromosomica. Dato il complesso coinvolgimento nel controllo del ciclo cellulare non dovrebbe destare sorpresa un suo ruolo nella genesi dei tumori. Infatti variazioni di numero, grandezza e morfologia dei centrosomi sono stati riscontrati in diversi tipi di tumore come quello alla mammella, colon, fegato e prostata (Nigg, 2002; Nigg et al, 2004).

Oltre al suo importante ruolo nel ciclo cellulare, il centrosoma è coinvolto in diversi processi cellulari che non necessariamente sono associati alla divisione cellulare e alla segregazione cromosomica, come ad esempio l'organizzazione spaziale degli organelli cellulari e dell'apparato del Golgi (Rios et al, 2004). Non dovrebbe quindi sorprendere che una recente analisi proteomica del centrosoma abbia rilevato che un certo numero di proteine ad esse correlate possano generare, se mutate, malattie genetiche che poco hanno a che fare col ciclo cellulare come la sindrome di Alstrom o la sindrome oro-digito-facciale (Andersen et al, 2003).

E' stato attribuito un importante ruolo del centrosoma nei processi di migrazione neuronale (Hatten et al, 2002). Durante questo fenomeno si possono individuare tre stadi: un'estensione, una traslocazione nucleare (nucleocinesi) e una ritrazione finale. Durante la prima fase è stato suggerito un ruolo fondamentale del centrosoma nella determinazione della direzione di migrazione posizionandosi davanti al nucleo ed emanando microtubuli nella direzione di allungamento (Gotlieb et al, 1981). Una volta stabilita la direzione, il centrosoma coopera con altre proteine per creare una struttura simile ad una gabbia di microtubuli attorno al nucleo allo scopo di tenerlo nella posizione corretta durante il movimento della cellula (Hatten et al, 2002; Rivas et al, 1995). Nello specifico, DCX e LIS1, due proteine trovate mutate in diversi casi di lissencefalia (Francis et al, 1999; Reiner et al, 1993) interagiscono con la dineina per stabilizzare i microtubuli attorno al nucleo (Tanaka et al, 2004; Caspi et al, 2000). Una volta che i neuroni hanno raggiunto la loro corretta destinazione, è necessario che estendano l'assone e i dendriti. In questa fase il centrosoma sembra indispensabile per l'organizzazione del citoscheletro per l'allungamento assonale e per il trasporto delle vescicole: con la cooperazione della dineina i microtubuli vengono rilasciati dal centrosoma verso l'assone. Infatti è stato dimostrato che l'overespressione della dinamitina, un inibitore della dineina, porta all'arresto della crescita degli assoni in neuroni primari in coltura (Ahmad et al, 1994, 1995).

Negli ultimi anni, la letteratura scientifica si sta inoltre arricchendo di pubblicazioni che attribuiscono al centrosoma un ruolo chiave nella maturazione neuronale e mettono in evidenza come mutazioni a carico di geni codificanti per proteine centrosomali portino a malattie del neurosviluppo come la lissencefalia e microcefalia, disturbi psichiatrici come la schizofrenia o sindromi con sintomi

neurologici come la sindrome di Bardet-Biedl e la sindrome di Joubert (Kuijper et al, 2011). E' stato inoltre dimostrato con un recentissimo lavoro che l'isoforma  $\beta$  di CamKII interagisce direttamente col centrosoma regolando cataliticamente la transizione dalla crescita alla retrazione del dendrite (Puram et al, 2011).

Alla luce di questi dati quindi i miei risultati, inizialmente considerati “inaspettati”, potrebbero costituire un punto di partenza per chiarire il ruolo di CDKL5 all'interno dei neuroni e il suo coinvolgimento diretto nella patologia in esame.

## MATERIALI E METODI

### Plasmidi

L'intero cDNA di CDKL5 umana composto da 3090 pb è stato creato tramite PCR e clonato nel vettore pEGFP-C1 (Clontech) usando i siti BspEI e BamHI, generando una proteina fusa alla GFP (GFP-CDKL5). Successivamente è stato introdotto un secondo sito BamHI a valle del sito BspEI, per permettere l'excisione del intero cDNA con quest'enzima.

Le mutazioni puntiformi A40V, N71D, V132G, R178W, W195R, E203D, L220P e T288I sono state ottenute tramite mutagenesi utilizzando il QuickChange®Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Successivamente i vari mutanti di CDKL5 sono stati clonati nel vettore pCS2-MT tramite il sito di clonaggio BamHI ottenendo una proteina fusa al tag 6xMyc (6Myc-CDKL5).

Tutti i costrutti generati con PCR sono stati poi analizzati tramite analisi di sequenza per verificare la presenza della corretta mutazione.

### Anticorpi

Per l'analisi di CDKL5 è stato creato un anticorpo policlonale in coniglio (Covance Research Products) che riconosce gli amminoacidi 301-751. (Bertani et al, 2006)

Negli esperimenti di western blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-Myc monoclonale diluito 1:1000 (clone 9E10 prodotto da ibridoma di topo), anti-tubulina monoclonale da topo diluito 1:10000 (Sigma), anti-MeCP2 policlonale da coniglio diluito 1:1000 (Sigma), anti-phospho42-44 MAPK policlonale da coniglio 1:500 (Cell Signalling).

Per gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati usati i seguenti anticorpi: anti  $\gamma$ -tubulina 1:1000 (Sigma) e anti-Pericentrina 1:100 (BD Transduction Laboratories).

### Colture cellulari e trasfezioni

Le cellule HeLa sono state fatte crescere a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) con aggiunta di siero fetale bovino al 10%, 2 mM di L-Glutamina e 100 U/ml di Penicillina/Streptomicina.

Le colture di neuroni primari corticali sono state preparate dissezionando i cervelli di embrioni di topo a 18 giorni dalla fecondazione (E18). Dopo essere state rimosse, le cortecce sono state centrifugate a 800 g, lavate due volte in HBSS (GIBCO) e disgregate dopo un'incubazione in 0,25% di tripsina (Sigma) a 37°C. Le cellule in sospensione sono poi state piastrate su vetrini trattati con poli-D-lisina con una densità di 20000/30000 cellule/cm<sup>2</sup> e mantenute in terreno Neurobasal (Gibco) con aggiunta di B27 (Gibco) e L-Glutamina (2 mM). Dopo 3 giorni è stato aggiunto ARA-C (Sigma) ad una concentrazione finale di 2 µM per bloccare la proliferazione delle cellule gliali.

La trasfezione delle cellule HeLa è stata effettuata tramite elettroporazione utilizzando il Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories). Le cellule sono state fatte crescere in piastre da 10 cm di diametro fino ad una confluenza di circa il 70%, poste in sospensione tramite trattamento con tripsina 1x per 5 minuti a 37°C, centrifugate ad 800 g per 2 minuti, risospese in un tampone di elettroporazione (Hepes 21 mM; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7 mM; D-Glucosio 6 mM; pH 7.15) ed aggiunti 20 µg di DNA. Dopo il trasferimento nelle cuvette (Gene Pulser 0.4 cm, Bio-Rad Laboratories) sono state sottoposte ad elettroporazione con i seguenti parametri: voltaggio 260V, capacità 850 µF e resistenza all'infinito. Le cellule sono state poi raccolte e piastrate in nuove piastre da 10 cm di diametro contenenti il terreno D-MEM completo.

In alternativa la trasfezione è stata condotta usando la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

### **Frazionamento nucleo-citoplasma**

Le cellule HeLa sono state raccolte dopo 24 h dalla trasfezione. Dopo un lavaggio con PBS freddo sono state incubate 30 minuti a 4°C con un tampone di lisi ipotonico (Hepes pH 7.5 10 mM; KCl 10 mM; NP40 0.2%; EDTA 0.1 mM; Glicerolo 10%; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM; NaF 5 mM), quindi centrifugate a 16000 g per 20 minuti a 4°C. Il surnatante, costituente la frazione citoplasmatica è stato sottoposto ad un'ulteriore centrifugazione alle stesse condizioni per eliminare ogni traccia di componente nucleare. Il pellet composto dai nuclei è stato incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con un tampone di lisi (Hepes pH 7.5 20 mM; NaCl 420 mM; EDTA 0.1 mM; Glicerolo 20%; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM;

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM; NaF 5 mM. Il surnatante ottenuto dopo una centrifugazione a 16000 g per 30 minuti, costituiva la frazione nucleare.

### **Immunofluorescenze**

Le cellule HeLa sono state piastrate direttamente su vetrino e trasfettate con la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Dopo 16 ore dalla trasfezione sono state quindi fissate in paraformaldeide al 4% (PFA); i nuclei sono stati poi colorati con DAPI (Sigma) e il segnale specifico della GFP è stato analizzato con un microscopio a fluorescenza Olympus BX51.

I neuroni corticali sono stati fissati a diversi giorni di crescita in vitro con PFA al 4%. Dopo 10 minuti di permeabilizzazione (Hepes 20 mM pH 7.4; sucrosio 300 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; Triton X-100 0.2%; NaCl 50 mM) e 30 minuti di saturazione dei siti aspecifici con siero (FBS) al 5% in PBS, i neuroni sono stati incubati una notte a 4°C con l'anticorpo primario diluito in FBS al 5% e Triton X-100 allo 0.1%. Il giorno successivo sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS e le cellule sono state incubate per un'ora con l'anticorpo secondario (Alexa Fluor 555 per il primario da coniglio e Alexa Fluor 488 per quello da topo, Invitrogen). Infine i nuclei sono stati colorati con DAPI e gli specifici segnali sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza.

### **Saggio di chinasi**

Per l'analisi dell'attività chinasi di CDKL5, sono state immunoprecipitate 6xMyc-CDKL5 e i suoi mutanti dopo essere state espresse in cellule HeLa ed incubate con  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-ATP.

In breve, circa 2,5x10<sup>6</sup> cellule sottoposte a trasfezione sono state lavate in PBS 1X freddo e lisate con un buffer di lisi contenente Tris-HCl pH 8.0 50 mM; NaCl 250 mM; NP40 0,1%; glicerolo 10%; EDTA 2 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; NaF 5 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM) e un cocktail di inibitori delle proteasi (PIC, Sigma).

Il lisato cellulare totale è stato pretrattato per 1 ora con 20  $\mu$ l di resina mouse-IgG-Agarose (Sigma) al 100% a 4°C e successivamente incubato 2 ore a 4°C con 40  $\mu$ l resina anti-Myc (Sigma). Gli immunocomplessi sono stati poi centrifugati e lavati 4 volte con un buffer di lisi contenente NaCl 400 mM e il pellet equilibrato nel buffer di chinasi (Hepes pH 7,4 25 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200  $\mu$ M). Insieme al 20  $\mu$ l di buffer di chinasi sono stati aggiunti 5  $\mu$ Ci di  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-ATP



e 50  $\mu$ M ATP marcato freddo. I campioni sono stati incubati 30 minuti a 30°C. Gli immunocomplessi sono stati poi sottoposti ad un SDS-PAGE, le proteine trasferite ad una membrana di nitrocellulose e visualizzate tramite autoradiografia attraverso PhosphoImager (GE Healthcare). La quantificazione di Myc-CDKL5, necessaria per normalizzare l'attività catalitica, è stata determinata mediante western blot incubando il filtro con anti-Myc.

### **Saggio di stabilità ed inibizione del proteasoma**

Dopo 16 ore dalla trasfezione, le cellule HeLa sono state trattate con cicloesimide (50  $\mu$ g/ml) per 3 e per 6 ore per bloccare la nuova sintesi proteica oppure con MG132 (50  $\mu$ M), un inibitore del proteasoma, per 6 ore. Le cellule trattate e quelle di controllo sono state quindi lisate e raccolte in Laemmli buffer e sottoposte ad analisi di immunoblotting.

### **Sincronizzazione di cellule proliferanti**

Per necessità sperimentali, abbiamo scelto di bloccare il ciclo cellulare in metafase.

Le cellule HeLa sono state piastrate direttamente su vetrino. Inizialmente sono state trattate con una soluzione di timidina 2mM (Sigma) per 24 ore. Alle fine di questo trattamento tutte le cellule si trovavano in fase S. Dopo un lavaggio con PBS 1X ed un *recovery* di 3 ore con terreno DMEM completo, è stato effettuato un trattamento con solo nocodazolo 100 ng/ml (Sigma) per bloccare tutte le cellule in metafase. Dopo 12 ore le cellule sono state quindi lavate, fissate e sottoposte ad immunofluorescenza.

### **Analisi bioinformatiche**

La sequenza della proteina è stata ricavata dal database di NCBI (accession number NP\_001674) e il Kinbase database è stato utilizzato per ottenere le sequenze omologhe.

Il modello tridimensionale del dominio chinasi di CDKL5 è stato costruito utilizzando l'Homer modelling server (URL: <http://protein.bio.unipd.it/>) basandosi sulla struttura di CDK2 (PDB code: 2 bkza), selezionata sulla base dell'identità di sequenza (38,4%). Il modello finale è stato poi sottoposto a correzione tenendo in considerazione la minimizzazione energetica col software GROMACS prima di

calcolare la superficie elettrostatica col software APBS. Infine, la conservazione posizione-specifica per ogni amminoacido è stata calcolata col software CONSURF.

## RISULTATI

Il legame tra CDKL5 e la sindrome di Rett è stato stabilito nel 2004/2005 con l'identificazione di diverse mutazioni in questo gene in pazienti con la variante Hanefeld (Weaving et al., 2004; Evans et al., 2005). Ad oggi sono state descritte circa 90 mutazioni patogeniche diverse. E' interessante osservare (Fig.2) come mentre le mutazioni non senso e quelle troncanti possano essere localizzate ovunque nella proteina, la quasi totalità delle mutazioni missenso riscontrate cadono nel dominio catalitico. Fa eccezione solamente la mutazione N399T la cui patogenicità resta comunque dubbia perché non sono state fornite informazioni di sequenza su entrambi i genitori. Da alcuni anni il laboratorio in cui ho svolto la mia attività di ricerca collabora con il gruppo diretto dalla Dr.ssa Murgia allo scopo di definire se sia possibile per il gene CDKL5 tracciare una correlazione genotipo-fenotipo. Pertanto, la mia attività si è rivolta alla caratterizzazione molecolare di otto mutazioni puntiformi (A40V, N71D, V132G, R178W, W195R, E203D, T288I, L220P) a carico del dominio catalitico rilevate dall'analisi di sequenza del gene CDKL5 in otto pazienti affetti dalla la variante Hanefeld della sindrome di Rett. (Rosas-Vargas et al., 2008, Elia et al., 2008; Artuso et al., 2010). I diversi mutanti sono stati ottenuti mediante mutagenesi puntiforme utilizzando il QuickChange®Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Successivamente, dopo il sequenziamento dell'intero cDNA, essi sono stati subclonati in opportuni vettori d'espressione: per l'analisi della localizzazione subcellulare è stato utilizzato il vettore pEGFP-C1 che produce una proteina fusa alla GFP e quindi direttamente analizzabile al microscopio a fluorescenza, mentre per i saggi biochimici per la valutazione dell'attività catalitica ci siamo avvalsi del tag Myc (6Myc) del vettore PCS2-MT

Parallelamente a un'analisi di tipo molecolare, è stato utilizzato un approccio di tipo bioinformatico per predire variazioni di struttura e funzione della proteina mutata, grazie alla preziosa collaborazione con il prof Tosatto (Università di Padova).

## **Effetti delle mutazioni puntiformi del dominio chinasicco sulla localizzazione subcellulare di CDKL5**

Come anticipato, CDKL5 mostra una tipica organizzazione a “dots” distribuita pressochè equamente tra i due compartimenti nucleare e citoplasmatico. Questo è stato osservato sia sulla proteina esogena, overespressa in coltura di cellule umane proliferanti, che su quella endogena analizzata in colture di neuroni primari di embrioni di topo (Bertani et al, 2006, Rusconi et al, 2011).

Al fine di evidenziare se le mutazioni puntiformi in esame influenzassero la distribuzione cellulare delle proteine mutate, i costrutti di CDKL5 fusi alla GFP sono stati trasfettati nelle cellule HeLa e la distribuzione delle proteine esogene seguita per immunofluorescenza. Come appare evidente dalla figura 3-A, l'analisi al microscopio non ha evidenziato sostanziali differenze nella localizzazione rispetto alla forma wt, mostrando quindi una distribuzione della proteina pressochè uguale nei due compartimenti per tutti i mutanti, fatta eccezione per le varianti W195R e E203D.

L'effetto più eclatante di queste due mutazioni è quello di far perdere alla proteina la capacità di organizzarsi in “dots”, mostrando una distribuzione diffusa che ricorda quella assunta dalla proteina GFP (Fig.4).

E' inoltre possibile notare come la componente citoplasmatica appaia predominante rispetto a quella nucleare.

Per un'accurata quantificazione della frazione citoplasmatica e nucleare, sarebbe opportuna un'analisi al microscopio confocale che permette di discriminare i due compartimenti con una risoluzione maggiore. In alternativa, abbiamo deciso di osservare la distribuzione di CDKL5 tramite western blot dopo opportuno frazionamento cellulare. Nella figura 3-B è possibile notare come i risultati dei frazionamenti siano perfettamente in linea con le osservazioni fatte col microscopio a fluorescenza. Per garantire un alto grado di purezza del frazionamento sono stati usati MeCP2 come marcatore della frazione nucleare, mentre per quella citoplasmatica è stata usata la tubulina.

## **Effetti delle mutazioni puntiformi del dominio chinasi sull'attività catalitica**

Come già anticipato nell'introduzione, *CDKL5* codifica per una chinasi e gli attuali modelli molecolari ipotizzano che questa attività sia importante per un corretto funzionamento del sistema nervoso. Infatti è stato dimostrato come l'attività catalitica di *CDKL5* sia necessaria perché la proteina mantenga la capacità di influenzare lo splicing *in vitro* e la morfologia dei "nuclear speckles" e la maturazione neuronale. Inoltre, precedenti esperimenti condotti nel laboratorio dove ho svolto la mia attività di ricerca, avevano dimostrato come la coda C-terminale avesse un ruolo regolatorio, in particolare modo inibitorio, sull'attività enzimatica di *CDKL5*. A tale riguardo è interessante sottolineare come alcuni mutanti patogenici tronchi siano quindi ipermorfici e come sia possibile ipotizzare in questa maggiore attività una delle cause patogenetiche.

In questo studio abbiamo voluto quindi verificare gli effetti che possono avere sull'attività enzimatica le mutazioni patogeniche nel dominio catalitico in studio. Per prima cosa abbiamo valutato l'attività autofosforilativa sul dominio TEY. Si tratta di un piccolo motivo di soli tre amminoacidi (treonina, glutammato e tirosina), comune a tutte le ERK e che necessita di autofosforilazione per permettere l'attivazione della proteina. Le cellule HeLa sono state trasfettate con i vari costrutti di *CDKL5* fusi al tag Myc (6Myc). L'estratto proteico è stato immunoprecipitato per poter purificare ed analizzare la proteina tramite western blot, incubando il filtro con un anticorpo che riconosce specificatamente il motivo TEY fosforilato. Dopo un lavaggio con una soluzione che permette l'eliminazione degli anticorpi primari e secondari legati alla proteina (stripping), lo stesso filtro è stato incubato con un anticorpo specifico per il tag Myc in modo da visualizzare unicamente la *CDKL5* overespressa e poter stabilire un rapporto tra proteina attivata e proteina totale (grafico 1).

I valori sono stati normalizzati considerando tale rapporto pari a 1 nella forma wt. Parallelamente è stato condotto un saggio di chinasi condotto su cellule HeLa trasfettate coi vari costrutti nella stessa maniera ma il cui pellet dell'immunoprecipitato è stato incubato con  $[\gamma\text{-}^{33}]\text{-ATP}$  e successivamente sottoposto a corsa elettroforetica su SDS-PAGE e ad autoradiografia.

Entrambe i tipi di approcci ci hanno permesso di individuare tre tipi di effetti

sull'attività chinasi:

-la mutazione causa una totale mancanza di attività enzimatica. Questo effetto è stato possibile osservarlo solo nella variante A40V.

-la mutazione causa una diminuzione dell'attività enzimatica nel maggior numero dei casi e le proteine V132G, R178W, W195R, E203D, L220P e T288I appaiono, anche se in misura diversa, ipomorfiche rispetto alla forma wt.

-la mutazione non causa nessun effetto evidente sull'attività chinasi. Questo dato è stato osservato solamente per la variante N71D.

Ciononostante è possibile notare delle discrepanze tra il saggio di chinasi e il saggio effettuato sul dominio TEY. (Fig.5). Infatti dal saggio di chinasi, appare una fosforilazione generalmente aumentata se paragonata a quella del motivo TEY tanto da far apparire il mutante V132G addirittura ipermorfico rispetto alla forma wt. Ciò può essere spiegato dal fatto che nel saggio di chinasi viene valutata la fosforilazione in toto della proteina. Recenti studi di spettrometria di massa hanno infatti rilevato che CDKL5 presenta delle serine fosforilate (Ser 306, Ser407, Ser646, Ser720, Ser761) il cui significato rimane tuttora ignoto (Daub et al, 2008). Per un'accurata valutazione dell'attività chinasi, sarebbe perciò opportuno valutare non solo l'autofosforilazione ma anche l'eterofosforilazione in vitro, aggiungendo nel saggio di chinasi MeCP2 come proteina target di CDKL5

## **Ogni mutazione ha un effetto sull'attività molecolare della proteina: saggio di stabilità**

I saggi finora analizzati hanno rilevato che le mutazioni puntiformi studiate possono produrre un effetto alterato della proteina o a livello di localizzazione o come decremento dell'attività chinasica. Per il mutante N71D non è stato possibile attribuire con questi saggi nessuna conseguenza che potesse giustificarne la patogenicità.

Dal momento che recenti risultati (Rusconi et al. 2011) dimostrano come i livelli di CDKL5 siano regolati dalla degradazione mediante proteosoma abbiamo deciso d'iniziare a valutare se il mutante N71D potesse essere caratterizzato da un'alterata vita media.

Per questo mutante è stato quindi effettuato un saggio di stabilità, trattando le cellule overesprimenti i costrutti 6Myc-CDKL5 wt o 6Myc-CDKL5N71D con l'inibitore del proteosoma MG132 e parallelamente, con l'inibitore della sintesi proteica cicloesimide. La vita media delle proteine esogene è stata analizzata per western-blot.

Dalla fig.6 è possibile notare che il mutante N71D, a differenza della forma wt che dimezza la propria quantità dopo 6 ore dal trattamento, tende a diminuire drasticamente i propri livelli già dopo 3 ore di esposizione alla cicloesimide, indicando una stabilità minore e quindi un'emivita diminuita. La sensibilità alla degradazione via proteosoma non sembra invece essere significativamente influenzata. Se effettivamente la diminuzione della persistenza di CDKL5 all'interno della cellula è in grado di scatenare una malattia neurologica come la sindrome di Rett, sarebbe opportuno valutare l'emivita anche degli altri mutanti per stabilire se possano essere caratterizzati da più di un difetto.

## **Predizione dell'effetto delle mutazioni sulla struttura tridimensionale e sulla funzione della proteina**

Grazie alla preziosa collaborazione con il prof. Tosatto, è stato possibile affrontare l'analisi degli effetti delle mutazioni sulla proteina in esame, attraverso un approccio di tipo bioinformatico.

Sulla base dell'identità di sequenza (38,4%) è stata utilizzata CDK2 come template di paragone per effettuare una predizione della struttura tridimensionale del dominio catalitico.

A livello di sequenza esso può essere diviso in 12 sottodomini più piccoli (SD, indicati da numeri romani), definiti come regioni mai interrotte da rilevanti inserzioni di amminoacidi e contenenti specifici residui conservati (Hanks, 1995). Preso nel suo complesso, nel dominio catalitico è possibile rilevare la presenza di una piccola porzione N-terminale costituita prevalentemente da foglietti  $\beta$  (SD I-SD IV) e da una porzione C-terminale composta da diverse alfa eliche (SD VI-SD XII) (Hatrack et al, 1994). Il sito di legame all'ATP (SD V) giace in una tasca tra queste due regioni che può ruotare in una conformazione “aperta” o “chiusa” a seconda del legame con l'ATP e dello stato di attivazione della stessa molecola (Cox et al, 1994; Huse et al, 2002; Sowadski et al, 1999). (Fig.7)

Da un punto di vista dell'omologia con le altre proteine affini e della loro conservazione, le varie mutazioni analizzate possono essere divise in due grandi gruppi: quelle che coinvolgono residui condivisi dalle altre chinasi (A40V, N71D, V132G, W195R e E203D) e quelle che riguardano i residui comuni alle proteine CMGC (R178W, L220P e T288I). Grazie a specifici programmi bioinformatici (GROMACS e APBS) che tengono conto dell'energia e della superficie elettrostatica di ogni amminoacido, è stato possibile anche predire l'effetto che ogni sostituzione amminoacidica poteva avere a livello della conformazione molecolare della proteina. (Tab1).

I dati mostrati mettono in evidenza come anche piccoli discostamenti dalla distanza naturale tra gli amminoacidi siano causa di compromissione nel funzionamento della proteina. E' inoltre immaginabile che i cambi di interazione possano essere origine di distorsioni nella struttura tridimensionale corretta. Infatti recentemente un elegante lavoro basato su approcci di tipo bioinformatico ha attribuito all'elica F delle MAP chinasi una particolare importanza nell'attività



fosforilativa. Infatti è stata proposta una funzione di ponte di ancoraggio per alcuni motivi idrofobici che orchestrano tutto il processo catalitico (Kornev et al, 2008). All'interno di questa  $\alpha$ -elica giacciono le mutazioni W195R e E203D che potrebbero inficiare la plasticità conformazionale ed impedire la regolazione allosterica di attivazione/inattivazione della proteina. Infatti con la mutazione W195R viene persa l'interazione con la glutammina 181, mentre con la mutazione E203D viene perso il legame semplice con la leucina 97 acquistandone uno con la lisina 225.

Inoltre la mutazione N71D, che nei dati molecolari ha evidenziato una stabilità minore rispetto alla forma wt, a livello strutturale causa un cambio di interazione con la lisina 121 che da ponte idrogeno diventa un legame salino. Trattandosi di un legame più forte rispetto al ponte idrogeno, si può ipotizzare che ne derivi una struttura più rigida che blocca il dominio catalitico in una posizione tale da rendere meno efficiente lo scambio con l'ATP.

Sono comunque attualmente in corso ulteriori approfondimenti bioinformatici e saggi di mutagenesi che possano avvalorare queste ipotesi.

Mutazione	Carattere amminoacidi	Localizzazione	Effetto sulla struttura 3D
A40V	Entrambi sono amminoacidi apolari con forma molto simile, A ha un gruppo metile come gruppo laterale, V ha un gruppo isopropile.	SDII Foglietto beta 3, situato nel lobo in alto. E.' all.'interno della sequenza che costituisce la zona di legame dell'ATP (dal'aa 4 a 47).	La mutazione non produce grandi riarrangiamenti nella rete: i due legami idrogeno vengono mantenuti così come le altre 10 interazioni semplici. Si instaura una nuova interazione semplice con 92VAL. Cambia la distanza con 90GLU (da 0,18 a 3.32)
N71D	Entrambi amminoacidi polari (N -, D +), N presenta nella parte finale della catena laterale un residuo ossidrilico, D un gruppo amminico.	SDIV Loop situato tra l.'alfa elica C e il foglietto beta 4, nel lobo in alto. Vicina al sito attivo, Questa mutazione si trova all.'interfaccia tra i due subdomini.	Vengono mantenuti 7 legami semplici e il legame a idrogeno con 142LEU. Il legame idrogeno con 149LEU diventa invece un'interazione semplice (aumenta di molto la distanza). Inoltre il legame idrogeno con 121LYS viene sostituito da un legame salino.
V132G	Entrambi apolari, V presenta come residuo un gruppo isopropile mentre G ha semplicemente un idrogeno	SDIVB Loop situato fra l.'elica E e il foglietto beta 7, nel lobo in basso. La mutazione è all.'interno del sito attivo.	Vengono perse tre interazioni semplici con 190LYS, 126CYS 189GLY. Tre interazioni, 188TYR, 127HIS e 193ASP riducono di molto la loro distanza, passando da 3-4 Å a meno di 0.2. I 2 legami idrogeno e altre 5 interazioni semplici restano pressoché invariate.
R178W	R è polare (+) con catena laterale idrofilica e termina con un gruppo guanidinico (fortemente basico). W, poco polare(-), con gruppo laterale <i>Indolile</i> .	SDVIII Nel loop tra il foglietto beta 8 e l.'alfa elica senza nome (vicino alla G)	Nove legami semplici vengono mantenuti, con piccole variazioni di distanza. Il legame idrogeno con 173ALA diventa un'interazione semplice (mantiene però la stessa distanza) e quello con 175ARG diviene un legame cationico. Infine c.'è la formazione di un'interazione semplice con 170 VAL, non presente nel wild type .
W195R	R è polare (+) con catena laterale idrofilica e termina con un gruppo guanidinico (fortemente basico). W, poco polare (-), con gruppo laterale indolico.	SDIX Alfa elica F, nel lobo inferiore	Il legame cationico con 211PHE viene mantenuto anche se con un aumento drastico della distanza rispetto al wild type, il legame idrogeno con 191SER resta pressoché invariato. 15 interazioni semplici vengono mantenute ma con modificazioni rilevanti della distanza. Scompare il legame con 181GLU.
E203D	Entrambi sono aa polari (+), e in entrambi il gruppo laterale reca un carbossile, che gli conferisce il comportamento acido da cui prendono il nome. La differenza sta nel fatto che la catena laterale di E è più lunga di un carbonio rispetto a D	SDIX Alfa elica F, nel lobo inferiore	9 legami semplici vengono mantenuti (ma con qualche variazione significativa delle distanze), il legame semplice con 97LEU viene perso e l.'interazione con 210LEU diventa un legame a idrogeno, riducendo notevolmente la distanza. Infine c.'è la comparsa di un nuovo legame semplice con 198GLY.
L220P	Entrambi aa apolari, sono molto differenti: L ha un gruppo laterale isobutile, P ha un gruppo amminico <i>secondario</i> , e suo gruppo laterale si chiude sull'atomo di azoto formando una struttura ciclica.	SDX Alfa elica G, nel lobo inferiore	I sette legami semplici vengono mantenuti (con 184LEU abbiamo una riduzione di distanza da 3.05 a 0,22; e con 215SER un aumento da 0,22 a 4.43). Uno dei due legami idrogeno viene mantenuto mentre l.'altro (con 216GLU) diventa un'interazione semplice (aumenta notevolmente la distanza). Nuovo legame semplice aggiuntivo, con 225LYS
T288I	T è polare(-), il suo gruppo laterale reca un gruppo ossidrilico. I invece è apolare, il suo gruppo laterale è sec-butile.	SDXI Alfa elica I, posta nel lobo inferiore.	Sette legami semplici più un legame idrogeno rimangono invariati (di cui però quelli con 123ILE e 120ILE subiscono una notevole diminuzione di distanza). Viene perso il legame con 194MET e si instaurano nuovi legami con 197VAL e 121LYS.

Tab1. Effetti delle singole mutazioni sulla struttura tridimensionale del dominio catalitico di CDKL5

## **CDKL5 colocalizza con il centrosoma sia in cellule proliferanti che in colture di neuroni corticali primari in via di maturazione**

Durante l'analisi al microscopio a fluorescenza per la valutazione della localizzazione, è stato possibile notare che alcune cellule in fase mitotica presentavano una distribuzione anomala di CDKL5. Dalla figura 8 è infatti possibile notare come il segnale della GFP si concentri in due poli opposti nel senso di divisione. Ciò ci ha fatto supporre che CDKL5 si localizzasse sul centrosoma in questa fase del ciclo cellulare.

Per confermare quest'ipotesi abbiamo quindi effettuato un'immunofluorescenza su cellule HeLa trattate con nocodazolo, un farmaco che arresta il ciclo cellulare in metafase, in cui il centrosoma è ben visibile al microscopio. Usando quindi degli anticorpi marcati diversamente per la gamma tubulina e la CDKL5 endogena è stato così possibile confermare che le due proteine colocalizzano perfettamente (Fig.9), dando quindi sostegno alla teoria che CDKL5, almeno nelle cellule proliferanti, è coinvolta nel ciclo cellulare, con una modalità che ancora rimane sconosciuta.

Visto il ruolo del centrosoma nella maturazione neuronale, abbiamo deciso di osservare se questa colocalizzazione fosse mantenuta anche in cellule neuronali in via di maturazione.

Gli esperimenti sono stati condotti su colture di neuroni primari di topo, fissate a DIV4 e immunodecorate così da rilevare CDKL5 endogena e la centrina, un'altra proteina associata al centrosoma, in quanto è stato osservato che la gamma tubulina nei neuroni si dissocia dal centrosoma e viene ritrovata libera nel citoplasma (Stiess et al, 2010)

Come si può vedere dalla figura 10, CDKL5, oltre a localizzarsi nel soma e nei dendriti dei neuroni, si associa al centrosoma, dando quindi una forte indicazione del ruolo di CDKL5 nella maturazione neuronale, come già è stato descritto in precedenza (Chen et al, 2010). Sarebbe quindi opportuno approfondire questo discorso ed analizzare la relazione tra CDKL5 e centrosoma nei diversi stadi di maturazione neuronale e nella proliferazione cellulare ed osservare se i vari mutanti possano influire su questa interazione.

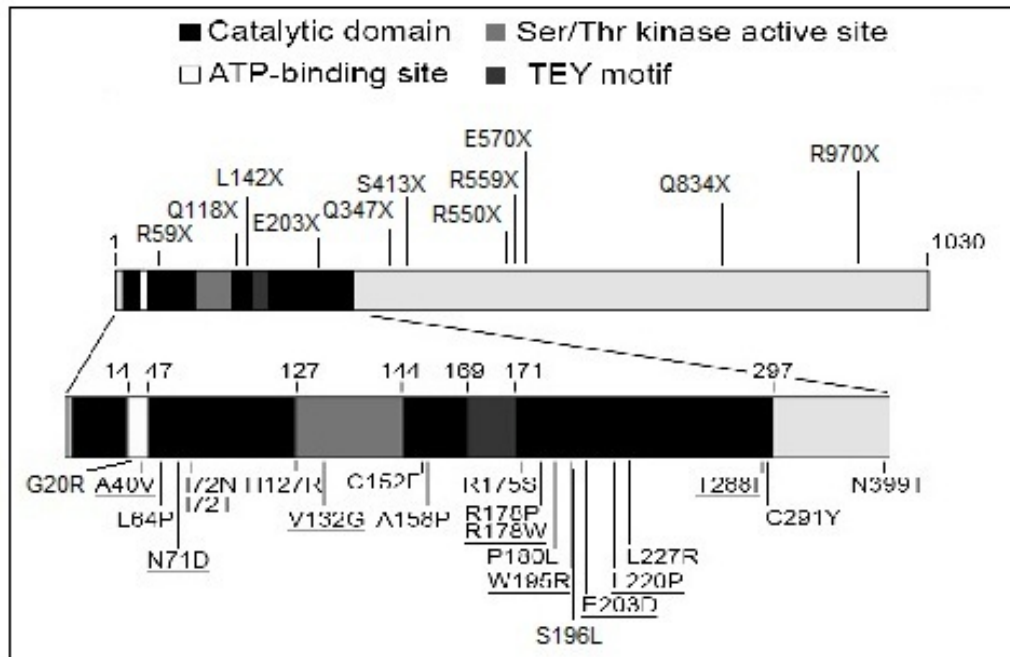


Fig.2. Rappresentazione schematica di CDKL5 dove sono indicate nella parte superiore le mutazioni non senso e nella parte inferiore quelle missenso.

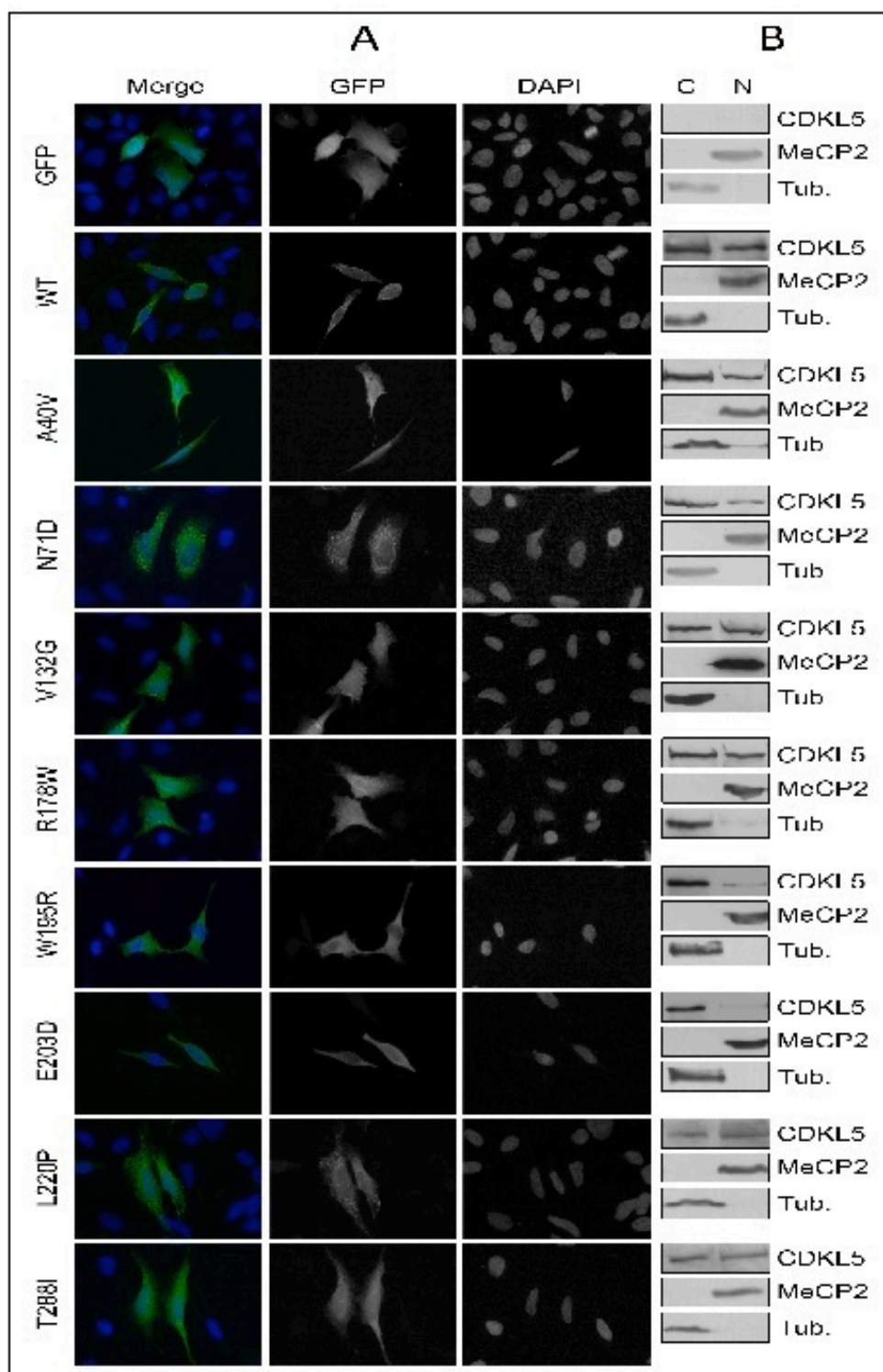


Fig.3 Analisi della localizzazioni subcellulare di CDKL5 in cellule HeLa per immunofluorescenza (A) e frazionamento cellulare (B) dove come marcatore nucleare è stato usata MeCP2 e come marcatore citoplasmatico la tubulina

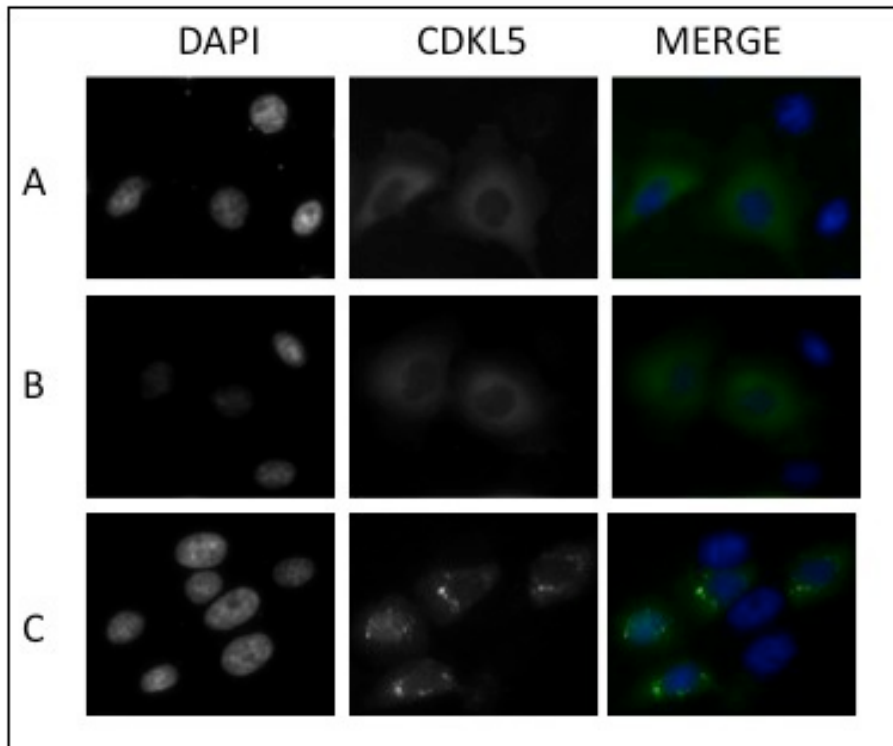


Fig.4 Immunofluorescenza su cellule HeLa che evidenzia come i mutanti W195R (A) ed E203D (B) portino alla perdita dell'organizzazione in dots tipica di CDKL5 wt (C)

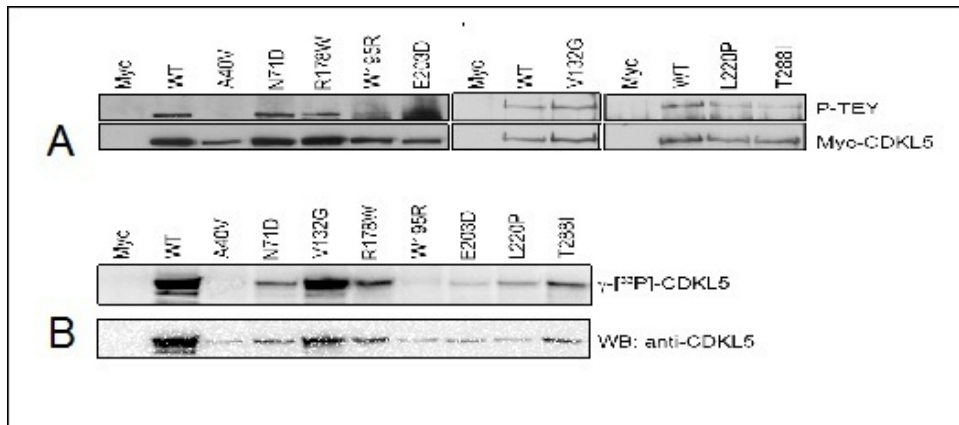


Fig. 5 Analisi della capacità autofosforilativa di CDKL5 e dei vari mutanti effettuata tramite western blot sul motivo TEY fosforilato (A) e saggio di chinasi (B)

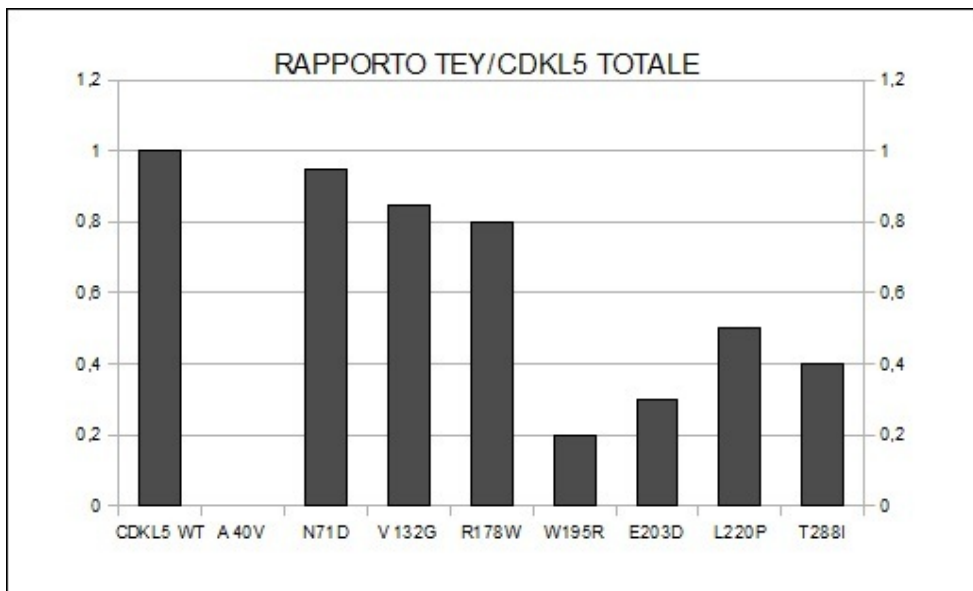


Grafico 1. Attività chinasi autofosforilativa di CDKL5 e i suoi mutanti. I valori sono stati ottenuti dal rapporto tra il dominio TEY fosforilato e la proteina totale. I valori sono stati normalizzati attribuendo alla CDKL5 wt un rapporto pari a 1.

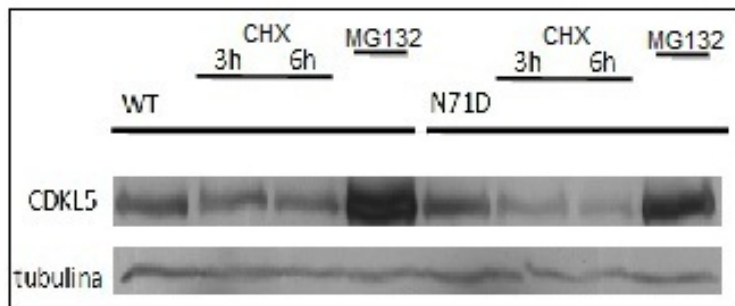


Fig.6. Saggio di stabilità per CDKL5 wt ed il suo mutante N71D che mostra i livelli di proteina dopo 3 e 6 ore di trattamento con cicloesimide (CHX) e dopo trattamento con MG132 (9 ore)

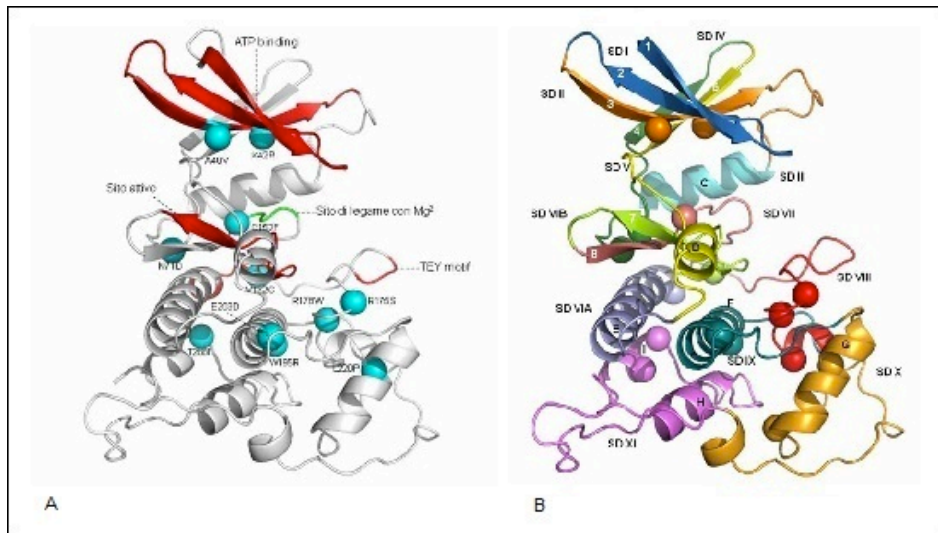


Fig.7. Predizione della struttura tridimensionale del dominio catalitico di CDKL5 dove è possibile localizzare i residui mutati da noi studiati (A) ed osservare la divisione nei vari sottodomini individuati dai numeri romani (B)



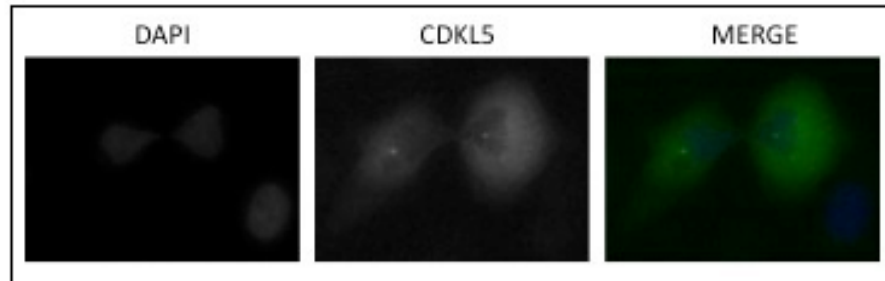


Fig.8. Immunofluorescenza su cellule HeLa overesprimenti CDKL5 wt in fase di divisione cellulare in cui è possibile notare un accumulo di proteina presumibilmente a livello del centrosoma

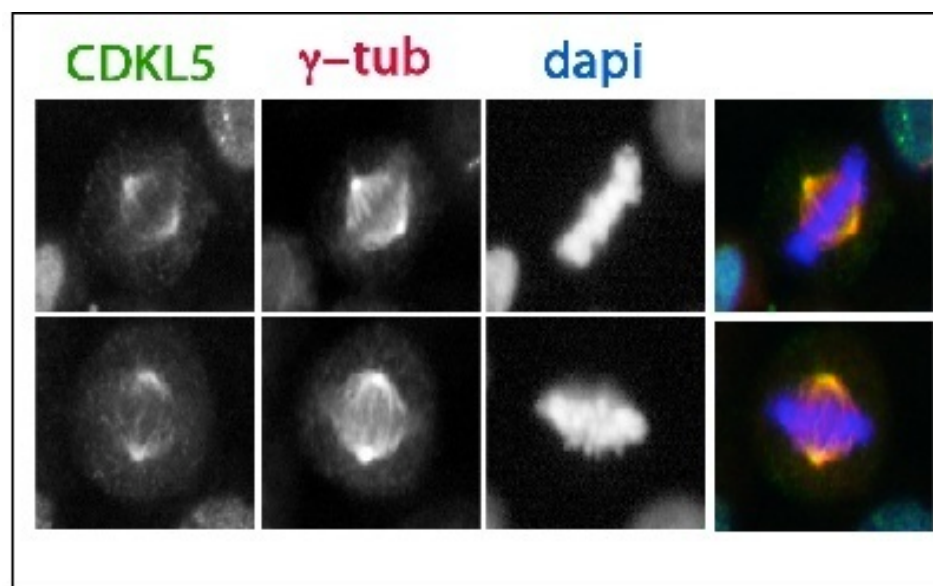


Fig.9. Immunofluorescenza condotta su cellule HeLa bloccate in metafase previo trattamento con nocodazolo in cui è visibile la colocalizzazione di CDKL5 con la gamma tubulina dei centrosomi

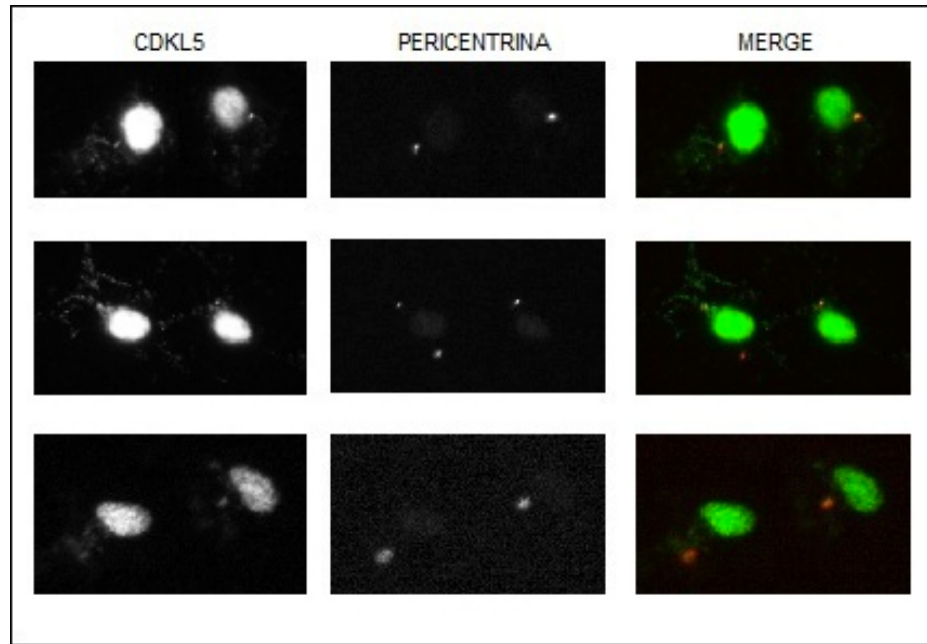


Fig.10. Immunofluorescenza condotta su neuroni corticali di topo fissati a DIV4 in cui è possibile vedere la colocalizzazione di CDKL5 endogena con la pericentrina centrosomica

## DISCUSSIONE

La sindrome di Rett è una grave malattia del neurosviluppo che colpisce principalmente individui di sesso femminile. E' considerata la seconda causa di ritardo mentale al mondo dopo la sindrome di Down, a causa della sua incidenza di 1:10000-15000 nate femmine (Hagberg et al, 1983). Le bambine affette da sindrome di Rett subiscono uno sviluppo postnatale apparentemente normale fino all'età di 6-18 mesi, per poi manifestare un marcato declino neurologico con decorso molto variabile. Le manifestazioni iniziali della malattia appaiono solitamente con la perdita delle capacità motorie e di linguaggio acquisite fino al momento. Successivamente le pazienti Rett sviluppano movimenti stereotipati delle mani, disturbi respiratori, crisi epilettiche, ansia, microcefalia, disfunzioni del sistema nervoso autonomo ed ipotonia (Charour et al, 2007). Circa il 25% delle pazienti sono affette da forme atipiche che si discostano dalla forma classica o per il fatto di essere più blande con un'insorgenza più tardiva e un iter meno devastante o per un fenotipo più "aggressivo" che può portare anche a crisi epilettiche non trattabili farmacologicamente (Hagberg et al, 1994; Hanefeld, 1985). In generale comunque non è ancora stata sviluppata una cura mirata e i trattamenti farmacologici adottati sono basati esclusivamente sui sintomi manifestati.

La maggior parte dei casi di forma classica di Rett è causata da mutazioni nel gene MECP2 (Charour et al, 2007). MeCP2 è un repressore trascrizionale espresso maggiormente nel cervello che lega il DNA metilato e che causa la formazione di una struttura cromatinica compatta e trascrizionalmente inerte (Jones et al, 1998; Nanet al, 1998; Fuks et al, 2002; Chandler et al, 1999). Recentemente è stato dimostrato come MeCP2 non funzioni solamente da repressore a lungo termine ma come possa avere anche un ruolo dinamico nella regolazione trascrizionale di alcuni geni specifici neuronali (Chen et al, 2003; Martinowich et al, 2003; Zhou et al, 2006).

Un indispensabile supporto alla ricerca per la sindrome di Rett è stato lo sviluppo di differenti linee mutanti murine che esprimendo varianti non funzionali di MeCP2 hanno riassunto i sintomi della patologia, mimando la patologia della forma umana (Chen et al, 2001; Guy et al, 2001; Shahbazian et al, 2002b; Collins et al, 2004; Chao et al, 2007). Inoltre è stato possibile dimostrare la reversibilità

della malattia nei topi, mettendo in luce che la sindrome di Rett non è una malattia neurodegenerativa bensì del neurosviluppo, aprendo quindi la speranza di una cura che possa ripristinare le normali funzioni neuronali negli individui affetti (Guy et al, 2007; Charour et al, 2007).

Mentre le mutazioni a carico di MeCP2 sono state associate a più del 95% dei casi di Rett classica, nei casi delle forme atipiche esse giustificano solo il 50% dei casi, facendo ipotizzare, per lo meno nelle varianti, il coinvolgimento di altri loci (Evans et al, 2005; Weaving et al, 2005).

Quando nel 2004 sono state descritte mutazioni a carico del gene CDKL5 e più tardi nel 2008 altre a carico del gene FOXP1, associate a fenotipi di casi atipici di sindrome di Rett, la ricerca scientifica ha ampliato i propri obiettivi al fine di comprendere se questi tre geni, apparentemente diversi fra loro, potessero essere accomunati da una stessa via molecolare. A tutt'oggi però i risultati sono ancora scarsi e, a volte, contraddittori, soprattutto per quel che concerne *FOXP1*.

Le mutazioni a carico di CDKL5 sono state in particolar modo riscontrate in pazienti con la variante Hanefeld, una delle più aggressive varianti della sindrome di Rett caratterizzata da un'insorgenza molto precoce e da crisi epilettiche non trattabili farmacologicamente (Hanefeld, 1985). Inoltre, alcune mutazioni sono state anche rilevate in individui con gravi spasmi infantili associati all'X (ISSX), sindrome di West e generale ritardo mentale (Nemos et al, 2009).

Evidenze sperimentali tendono ad associare strettamente CDKL5 ad una stessa via molecolare comune ad MeCP2. Infatti è stato dimostrato che CDKL5 è in grado di fosforilare in vitro MeCP2 e che le due proteine hanno un pattern d'espressione spaziale e temporale piuttosto simile (Mari et al, 2005; Bertani et al, 2006; Rusconi et al, 2008).

E' stata inoltre dimostrata la capacità della proteina di interagire con la metiltransferasi I (Kameshita et al, 2008) e di associarsi ai fattori di splicing accumulati nelle cosiddette "macchioline nucleari" (Ricciardi et al, 2009). Per quanto riguarda la sua funzione nel citoplasma invece le informazioni sono ancora poco chiare, ma un recente lavoro vede CDKL5 coinvolta nella maturazione neuronale attraverso un'interazione con la Rho GTPasi Rac1. L'aspetto più importante di queste osservazioni risiede nel fatto che in tutti i casi l'attività catalitica di CDKL5 appare di estrema importanza. Alla luce di questi dati sarebbe quindi interessante osservare con quale modalità le mutazioni a carico di CDKL5 possano influire

sulla sua funzione.

La mia attività di ricerca si è concentrata su 8 mutazioni missenso patogeniche a carico del dominio catalitico (A40V, N71D, V132G, R178W, W195R, E203D, T288I, L220P) con lo scopo di valutarne le conseguenze molecolari e se fosse possibile, sulla base dei dati raccolti e in collaborazione con l'unità clinica coordinata dalla Dr.ssa Murgia, individuare una correlazione tra fenotipo e genotipo. E' importante osservare, a sostegno di quanto detto, come la quasi totalità delle mutazioni missenso ad oggi riscontrate cadano nel dominio catalitico della proteina piuttosto che nella sua coda carbossiterminale dove, al contrario, la maggior parte delle mutazioni finora caratterizzate portano alla sintesi di una proteina tronca.

Per raggiungere il nostro scopo ci siamo avvalsi di due approcci: un approccio di tipo biomolecolare in cui per ogni mutante è stata valutata la localizzazione subcellulare e l'attività chinasi in vitro e un approccio bioinformatico condotto con la collaborazione del prof. Tosatto dell'Università di Padova, volto alla predizione dell'effetto di ogni mutazione sulla struttura e funzione della proteina.

Per quanto riguarda la parte sperimentale è apparsa subito chiara la difficoltà di manipolazione della proteina all'interno di un sistema cellulare neuronale. Ciò è dovuto molto probabilmente ad un effetto letale nella sua overespressione all'interno di colture di neuroni primari. Al momento nel nostro laboratorio è possibile esprimere CDKL5 esogena mediante elettroporazione di neuroni primari ma l'efficienza è ancora troppo bassa per poter garantire dei saggi biochimici che abbiano un alto standard e riproducibilità dei dati. Per questo motivo, abbiamo deciso di condurre gli esperimenti su linee cellulari umane non neuronali, non soggette a questo tipo di problema.

Come primo aspetto abbiamo valutato la possibilità che una mutazione potesse creare una variazione nella localizzazione della proteina all'interno della cellula rispetto alla forma canonica, la quale si distribuisce in quantità comparabili tra il compartimento citoplasmatico e quello nucleare, in quanto in precedenza nel nostro laboratorio è stato osservato che le mutazioni a carico della coda carbossiterminale di CDKL5 che portavano alla produzione di una proteina tronca, causano un accumulo della stessa nel compartimento nucleare.

Dopo la creazione delle varianti di CDKL5 all'interno del vettore pEGFP-C1, le abbiamo overesprese in cellule HeLa e la loro distribuzione è stata analizzata al

microscopio a fluorescenza. Come si vede dalla fig.3-A i dati ottenuti portano alla conclusione che le mutazioni puntiformi nel dominio catalitico, a differenza di quella nella coda carbossiterminale, non causano apprezzabili variazioni nella localizzazione subcellulare di CDKL5. Ciò è vero per tutte le mutazioni, escluse la W195R e la E203D. Queste due varianti hanno un duplice effetto: 1) la proteina viene quasi totalmente esclusa dal compartimento nucleare accumulandosi maggiormente in quello citoplasmatico; 2) viene persa la tipica colorazione a dots caratteristica della proteina wt.

Al momento, non è ancora chiaro per quale motivo CDKL5 si organizza in dots. Come precedentemente detto, recenti studi hanno dimostrato che i dots nucleari di CDKL5 colocalizzano con SC35 e Sm, fattori di splicing che si accumulano in strutture subnucleari conosciute come “macchioline nucleari” (Lamond et al, 2003, Ricciardi et al, 2009), ma nel citoplasma non vi sono chiare indicazioni.

Dall'analisi della struttura tridimensionale del dominio catalitico di CDKL5, queste due mutazioni risultano appartenere entrambe all'elica F del sottodominio IX. Entrambe queste mutazioni portano ad alcune variazioni nelle interazioni tra amminoacidi nella struttura terziaria. Infatti il passaggio da triptofano ad arginina in posizione 195 porta alla perdita del suo legame col glutammato in posizione 181 e con la mutazione E203D dove viene persa l'interazione con la leucina 79 e quella con la leucina 210 diventa un legame idrogeno. Nel 2008, tramite analisi bioinformatiche, è stata attribuita a quest'alfa elica una cruciale importanza nel controllo dell'attività catalitica in quanto potrebbe fungere da ponte di ancoraggio con alcuni motivi idrofobici fondamentali per l'attività fosforilativa (Kornev et al, 2008). Si potrebbe quindi ipotizzare che una distorsione di questa elica porti la proteina a non assumere una corretta conformazione funzionale necessaria per le interazioni responsabili dell'organizzazione in dots.

L'analisi della localizzazione subcellulare dei vari mutanti rimarrebbe comunque imprecisa se non venisse eseguita utilizzando un microscopio confocale che, prendendo le immagini su diversi piani focali, permette di separare completamente il nucleo dallo strato di citoplasma che lo ricopre o un'analisi biochimica per frazionamento cellulare. Come approccio abbiamo deciso di procedere con il frazionamento cellulare seguito da una quantificazione della proteina nei due compartimenti tramite western blot. Come mostrato in fig.3-B i dati ottenuti sono in buon accordo con gli studi di immunofluorescenza.

Per iniziare a valutare l'attività catalitica per ciascun mutante è stata osservata l'attività di autofosforilazione di CDKL5 sul dominio TEY. Questo dominio di soli 3 amminoacidi è comune a tutte le ERK ed è indispensabile alla proteina per attivarsi e poter successivamente fosforilare i propri geni target. Il saggio prevede l'overespressione del mutante in esame, la sua immunoprecipitazione e l'analisi tramite western blot utilizzando un anticorpo che riconosce specificatamente il dominio TEY fosforilato. Il risultato è dato dall'analisi di densitometria della banda della forma fosforilata paragonata a quella della proteina totale immunoprecipitata, in relazione alla forma wt (Fig.5). I dati raccolti sono stati inoltre replicati con un saggio di chinasi con  $[\gamma\text{-}^{33}]\text{-ATP}$ .

Nella loro globalità, i risultati ci permettono di individuare tre tipi di fenomeni.

- 1) Totale mancanza di attività enzimatica. Questo effetto è stato possibile osservarlo solo nella variante A40V.
- 2) La mutazione causa una diminuzione più o meno evidente dell'attività enzimatica nel maggior numero dei casi e le proteine V132G, R178W, W195R, E203D, L220P e T288I appaiono ipomorfiche rispetto alla forma wt.
- 3) La mutazione non causa nessun effetto evidente sull'attività chinasi. Questo dato è stato osservato solamente per la variante N71D.

Per quanto riguarda l'analisi dell'autoradiografia della autofosforilazione di CDKL5, nel saggio di chinasi è possibile notare delle discrepanze con il saggio sul P-TEY. Infatti il mutante V132G sembra avere un'attività catalitica maggiore rispetto alla forma wt e gli altri mutanti sembrano invece non influenzarla. Ciò può essere spiegato con la considerazione che mentre nel western blot si va a valutare un unico sito di fosforilazione, nel saggio di chinasi si considera la fosforilazione della proteina nella sua interezza. Infatti, recenti studi di spettrometria di massa (Daub et al, 2008) hanno evidenziato la presenza di diverse serine fosforilate su CDKL5 (Ser306, Ser407; Ser646, Ser720, Ser761). L'importanza di questi residui è ancora oggetto di studio ma non possiamo escludere che possano subire un'influenza diversa in base alla variazione presente. Dall'immagine tridimensionale del dominio catalitico di CDKL5 (Fig.7) si può notare che le varie mutazioni sono dislocate su strutture secondarie appartenenti a diversi sottodomini. Alcune di esse, come la N71D, la V132G e la R178W giacciono in zone di loop di interconnessione. Dall'analisi della loro posizione non è quindi generalmente possibile predire un loro preciso effetto sull'attività

catalitica. Ciononostante si può notare come la mutazione A40V interessi proprio il sito di legame per l'ATP. Esso giace in una tasca tra queste due regioni che può ruotare in una conformazione “aperta” o “chiusa” a seconda del legame con l'ATP e dello stato di attivazione della stessa molecola (Cox et al, 1994; Huse et al, 2002; Sowadski et al, 1999). Non desta quindi sorpresa il fatto che i dati molecolari rilevino che questa mutazione porti CDKL5 a perdere completamente la propria funzione catalitica.

Con questa tipologia di saggi non è stato comunque possibile stabilire un effetto diretto per la paziente portatrice della mutazione N71D. La bambina presenta una gravità dei sintomi paragonabile a quella degli altri pazienti ma la sua mutazione sembra non inficiare né la localizzazione della proteina, né la sua attività chinasi. Dall'analisi bioinformatica emerge che il passaggio da asparagina ad acido aspartico in posizione 71 crea una modificazione della sua interazione con la lisina 121, passando da un legame ad idrogeno ad un ponte salino. Trattandosi di un'interazione di natura più forte, e considerando il fatto che l'amminoacido 71 si trova nel loop che collega il sottodominio costituito dalle alfa eliche con quello costituito dai foglietti beta ove è situata la tasca molecolare dove avviene lo scambio di ATP, è possibile ipotizzare che questa mutazione blocchi la proteina in uno stato permanente (attivo o non attivo). Considerato che l'analisi di autofosforilazione non rileva una diminuzione dell'attività catalitica, per validare questa ipotesi sarà quindi opportuno sviluppare dei saggi biochimici su diversi mutanti puntiformi progettati per amplificare il difetto proposto e volti a valutare l'attività catalitica e, possibilmente, la capacità di scambiare ATP. Nel frattempo abbiamo deciso di effettuare per questa variante un saggio di stabilità della proteina utilizzando la cicloesimide come inibitore della sintesi proteica.

Dalla figura 6 è possibile notare che i livelli della proteina mutata, dopo solo 3 ore dal trattamento con cicloesimide, crollano a circa un terzo rispetto a quelli delle cellule non trattate, a differenza della forma wt che per dimezzare la quantità necessita di 6 ore di trattamento. Precedentemente è stato dimostrato che i livelli d'espressione di CDKL5 vengono regolati in base all'età e alle aree cerebrali, facendo ipotizzare che i livelli di questa chinasi debbano essere finemente regolati per una corretta funzionalità neuronale (Mari et al, 2005; Rusconi et al, 2008); è pertanto facile suggerire che la patogenicità della mutazione N71D possa consistere ancora una volta in una “*loss of function*” determinata da una ridotta



quantità di enzima.

Riassumendo, i dati molecolari da noi raccolti ci permettono di individuare due sottotipi fenotipici, uno riguardante la localizzazione subcellulare e l'altro che si ripercuote sull'attività chinasica. Un terzo sottotipo potrebbe essere costituito da quella classe di mutazioni che porta a dei livelli d'espressione diminuiti, ma questo dato deve essere allargato a più di un'osservazione. Attualmente il gruppo della Prof.ssa Murgia sta analizzando tutte le caratteristiche fenotipiche delle pazienti in esame per verificare se gli effetti molecolari delle mutazioni possano incidere sul livello di gravità dei sintomi manifestati.

L'analisi al microscopio a fluorescenza ha permesso di evidenziare inaspettatamente una peculiare distribuzione di CDKL5. Infatti, nelle cellule HeLa in fase di divisione cellulare CDKL5 ha suggerito una sua localizzazione sul centrosoma (Fig.8).

Per confermare quest'ipotesi abbiamo quindi condotto un'immunofluorescenza su cellule HeLa trattate con nocodazolo, un farmaco che arresta il ciclo cellulare in metafase, in cui il centrosoma è ben visibile al microscopio. Usando quindi degli anticorpi marcati diversamente per la gamma tubulina, un componente del centrosoma, e la CDKL5 endogena è stato così possibile confermare che le due proteine colocalizzano perfettamente (Fig. 9).

Sebbene i neuroni siano delle cellule differenziate e non più proliferanti, e quindi un ipotetico ruolo di CDKL5 nel ciclo cellulare non sia di rilevante importanza nell'eziopatogenesi della sindrome di Rett, la sua interazione coi centrosomi depone a favore di un suo ruolo nella maturazione neuronale.

L'ultimo periodo del mio dottorato di ricerca si è quindi focalizzato sull'obiettivo di stabilire se effettivamente CDKL5 prendesse parte nel processo di maturazione di cellule derivanti da colture di neuroni primari e se la localizzazione a livello centrosomico fosse presente anche in cellule non proliferanti. Dopo aver proceduto alla piastratura di neuroni corticali derivanti da embrioni di topo sacrificati ad E18, è stata eseguita un' immunofluorescenza fissando le cellule a DIV4 utilizzando un anticorpo per la CDKL5 endogena e un anticorpo per la centrina, un altro componente del centrosoma. Come si può vedere dalla figura 10, il segnale dato dalla centrina colocalizza con il segnale di CDKL5. Ciononostante CDKL5 non si distribuisce unicamente in prossimità del centrosoma ma, in linea con le precedenti osservazioni, tende a occupare tutto il

soma e i dendriti.

Recenti lavori hanno evidenziato un ruolo attivo di CDKL5 nella maturazione neuronale e nell'arborizzazione dell'albero dendritico. Infatti neuroni corticali primari trasfettati con shRNA contro CDKL5 mostrano un marcato decremento nella lunghezza sia dei dendriti che degli assoni. Al contrario l'overespressione di CDKL5 incrementa la lunghezza totale dei dendriti. Gli stessi effetti sono stati visti in vivo utilizzando l'elettroporazione in utero. Curiosamente, CDKL5 è capace di interagire con Rac1, una Rho GTPasi coinvolta nella regolazione dell'actina citoscheletrica e la morfogenesi neuronale (Chen et al, 2010).

Parallelamente recenti studi sul coinvolgimento del centrosoma nella maturazione neuronale mostrano come questo organello sia di fondamentale importanza per questo fenomeno dimostrando una sua interazione con l'isoforma  $\beta$  di CamKII nella transizione dalla crescita alla retrazione del dendrite (Puram et al, 2011). Lavori precedenti avevano già messo in luce il ruolo del centrosoma nell'organizzazione del citoscheletro nelle fasi di estensione, nucleocinesi e ritrazione della migrazione neuronale (Hatten, 2002; Rivas et al, 1995) e nella scelta della direzione di migrazione (Gotlieb et al, 1981).

Con questi dati appare chiara la versatilità di CDKL5 ma non è certo possibile stabilire un suo preciso ruolo nella maturazione neuronale, sebbene la colocalizzazione con il centrosoma offra sicuramente una nuova chiave di lettura. Futuri esperimenti volti ad un'analisi più approfondita nei diversi stadi di maturazione neuronale e dell'interazione tra CDKL5 e altre proteine coinvolte in questo fenomeno, potrebbero mettere in luce una più chiara funzione di CDKL5 all'interno dei neuroni e chiarire un suo ruolo nell'insorgenza della sindrome di Rett.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad FJ, Joshi HC, Centonze VE, Baas PW. Inhibition of microtubule nucleation at the neuronal centrosome compromises axon growth. *Neuron*. 1994 Feb;12(2):271-80.
- Ahmad FJ, Baas PW. Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon. *J Cell Sci*. 1995 Aug;108 ( Pt 8):2761-9.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999 Oct;23(2):185-8.
- Amir RE, Fang P, Yu Z, Glaze DG, Percy AK, Zoghbi HY, Roa BB, Van den Veyver IB. Mutations in exon 1 of MECP2 are a rare cause of Rett Syndrome. *J Med Genet*. 2005 Feb;42(2):e15
- Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*. 2003 Dec 4;426(6966):570-4.
- Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, Huyton M, O'Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J. CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J Med Genet*. 2006 Sep;43(9):729-34.
- Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, Hayek G, Rocchi R, Zappella M, Renieri A. Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 deletion and one case of MECP2 duplication. *Hum Mutat*. 2004 Aug;24(2):172-7.
- Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Jul;83(1):89-93.
- Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995 Mar;54(2):195-201.
- Armstrong DD, Dunn K, Antalffy B. Decreased dendritic branching in frontal, motor and limbic cortex in Rett syndrome compared with trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Nov;57(11):1013-7.
- Armstrong DD. Rett syndrome neuropathology review 2000. *Brain Dev*. 2001 Dec;23 Suppl 1:S72-6. Review.

Artuso R, Mencarelli MA, Polli R, Sartori S, Ariani F, Pollazzon M, Marozza A, Cilio MR, Specchio N, Vigevano F, Vecchi M, Boniver C, Dalla Bernardina B, Parmeggiani A, Buoni S, Hayek G, Mari F, Renieri A, Murgia A. Early-onset seizure variant of Rett syndrome: definition of the clinical diagnostic criteria. *Brain Dev.* 2010 Jan;32(1):17-24.

Badano JL, Teslovich TM, Katsanis N. The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2005 Mar;6(3):194-205.

Bertani I, Rusconi L, Bolognese F, Forlani G, Conca B, De Monte L, Badaracco G, Landsberger N, Kilstrup-Nielsen C. Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. *J Biol Chem.* 2006 Oct 20;281(42):32048-56.

Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet.* 2006 Jun;7(6):415-26. Review

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 1999 Nov 12;286(5443):1358-62.

Boveri T. Uber die Natur der Centrosomen. *Jena Z. Med. Nature.* 1901. 28, 1-220

Buschdorf JP, Strätling WH, A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med (Berl).* 2004 Feb;82(2):135-43.

Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T, Reiner O. Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet.* 2000 Sep 22;9(15):2205-13.

Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron.* 2007 Nov 8;56(3):422-37. Review.

Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe AP. The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry.* 1999 Jun 1;38(22):7008-18.

Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R. The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron.* 2006 Feb 2;49(3):341-8.

Chao H, Zoghbi HY, Rosenmund C. MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. *Neuron* 2007;56:1-8.

Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, Armstrong DL, Percy AK, Pozzo-Miller L. Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis.* 2009 Aug;35(2):219-33.

Charman T, Neilson TC, Mash V, Archer H, Gardiner MT, Knudsen GP, McDonnell A, Perry J, Whatley SD, Bunyan DJ, Ravn K, Mount RH, Hastings RP, Hulten M, Orstavik KH, Reilly S, Cass H, Clarke A, Kerr AM, Bailey ME. Dimensional phenotypic analysis and functional categorisation of mutations reveal novel genotype-phenotype associations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005 Oct;13(10):1121-30.

Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):327-31.

Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science.* 2003 Oct 31;302(5646):885-9.

Chen Q, Zhu YC, Yu J, Miao S, Zheng J, Xu L, Zhou Y, Li D, Zhang C, Tao J, Xiong ZQ. CDKL5, a protein associated with rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling. *J Neurosci.* 2010 Sep 22;30(38):12777-86.

Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol.* 2010 Apr;70(5):271-88. Review.

Collins AL, Levenson JM, Vilaythong AP, Richman R, Armstrong DL, Noebels JL, David Sweatt J, Zoghbi HY. Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet.* 2004 Nov 1;13(21):2679-89. Epub 2004 Sep 6.

Cox DR, Green ED, Lander ES, Cohen D, Myers RM. Assessing mapping progress in the Human Genome Project. *Science.* 1994 Sep 30;265(5181):2031-2.

Daub H, Olsen JV, Bairlein M, Gnad F, Oppermann FS, Körner R, Greff Z, Kéri G, Stemmann O, Mann M. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell.* 2008 Aug 8;31(3):438-48.

Elia M, Falco M, Ferri R, Spalletta A, Bottitta M, Calabrese G, Carotenuto M, Musumeci SA, Lo Giudice M, Fichera M. CDKL5 mutations in boys with severe encephalopathy and early-onset intractable epilepsy. *Neurology.* 2008 Sep 23;71(13):997-9.

Evans JC, Archer HL, Colley JP, Ravn K, Nielsen JB, Kerr A, Williams E, Christodoulou J, Gécz J, Jardine PE, Wright MJ, Pilz DT, Lazarou L, Cooper DN, Sampson JR, Butler R, Whatley SD, Clarke AJ. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. *Eur J Hum Genet.* 2005 Oct;13(10):1113-20.

Fichou Y, Nectoux J, Bahi-Buisson N, Chelly J, Bienvenu T. 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.* 2011 Jan;56(1):52-7.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron.* 1999 Jun;23(2):247-56.

Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2002 Feb 7;278(6):4035-40.

Glaze DG. Neurophysiology of Rett syndrome. *J Child Neurol.* 2005 Sep;20(9):740-6. Review.

Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science.* 1994 Mar 18;263(5153):1618-23.

Gotlieb AI, May LM, Subrahmanyam L, Kalnins VI. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol.* 1981 Nov;91(2 Pt 1):589-94.

Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):322-6.

Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science.* 2007 Feb 23;315(5815):1143-7

Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A. The Role of MeCP2 in the Brain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010 Oct 29.

Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol.* 1983 Oct;14(4):471-9.

Hagberg BA, Skjeldal OH. Rett variants: a suggested model for inclusion criteria. *Pediatr Neurol.* 1994 Jul;11(1):5-11.

Hagberg B. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(2):61-5. Review.

Hagberg B. Rett syndrome: long-term clinical follow-up experiences over four decades. *J Child Neurol.* 2005 Sep;20(9):722-7

Hanefeld F. The clinical pattern of the Rett syndrome. *Brain Dev.* 1985;7(3):320-5.

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995 May;9(8):576-96. Review.

Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S, El-Osta A. Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet.* 2005 Mar;37(3):254-64.

Hatten ME. New directions in neuronal migration. *Science.* 2002 Sep 6;297(5587):1660-3. Review.

Hatrack K, Taylor WR. Sequence conservation and correlation measures in protein structure prediction. *Comput Chem.* 1994 Sep;18(3):245-9.

Hendrich B, Bird A. Identification and Characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* Nov 1998, Vol 18(11) p.6538-47

Hébert JM, Fishell G. The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Sep;9(9):678-85. Review.

Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 2002 May 3;109(3):275-82. Review.

Jian L, Nagarajan L, de Klerk N, Ravine D, Bower C, Anderson A, Williamson S, Christodoulou J, Leonard H. Predictors of seizure onset in Rett syndrome. *J Pediatr.* 2006 Oct;149(4):542-7.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998 Jun;19(2):187-91.

Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gécz J, Sefiani A, Hoffmann K, Moser B, Haas S, Gurok U, Haesler S, Aranda B, Nshedjan A, Tzschach A, Hartmann N, Roloff TC, Shoichet S, Hagens O, Tao J, Van Bokhoven H, Turner G, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Nuber U, Hoeltzenbein M, Scharff C, Scherthan H, Lenzner S, Hamel BC, Schweiger S, Ropers HH. Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet.* 2003 Dec;35(4):313-5.

Kameshita I, Sekiguchi M, Hamasaki D, Sugiyama Y, Hatano N, Suetake I, Tajima S, Sueyoshi N. Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 26;377(4):1162-7.

Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Nov;27(3):306-21.

- Kornev AP, Taylor SS, Ten Eyck LF. A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 23;105(38):14377-82.
- Kuijpers M, Hoogenraad CC. Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol Cell Neurosci*. 2011 May 23.
- Lamond AI, Spector DL. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Aug;4(8):605-12. Review.
- 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. 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*. 2005 Jul 15;14(14):1935-46.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*. 2003 Oct 31;302(5646):890-3.
- Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992 Oct 11;20(19):5085-92.
- Meins M, Lehmann J, Gerresheim F, Herchenbach J, Hagedorn M, Hameister K, Eppelen JT. Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J Med Genet*. 2005 Feb;42(2):e12.
- Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A, Franco B. Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics*. 1998 Aug 1;51(3):427-33.
- Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R., Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD, Zoghbi HY. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 2006;26:319-27.
- Nan X, Tate P, Li E, Bird A. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol*. 1996 Jan;16(1):414-21.
- Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*. 1997 Feb 21;88(4):471-81.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):386-9.



- Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):815-25. Review.
- Nigg EA. Centrosome in development and disease. 2004. Wiley-VCH, Weinheim
- Nomura Y. Early behavior characteristics and sleep disturbance in Rett syndrome. *Brain Dev*. 2005 Nov;27 Suppl 1:S35-S42. Review.
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. Jan 2001, Vol.2(1), p.24-32
- Puram SV, Kim AH, Ikeuchi Y, Wilson-Grady JT, Merdes A, Gygi SP, Bonni A. A CaMKII $\beta$  signaling pathway at the centrosome regulates dendrite patterning in the brain. *Nat Neurosci*. 2011 Jul 3;14(8):973-83.
- Rademacher N, Hambrock M, Fischer U, Moser B, Ceulemans B, Lieb W, Boor R, Stefanova I, Gillissen-Kaesbach G, Runge C, Korenke GC, Spranger S, Laccione F, Tzschach A, Kalscheuer VM. Identification of a novel CDKL5 exon and pathogenic mutations in patients with severe mental retardation, early-onset seizures and Rett-like features. *Neurogenetics*. 2011 May;12(2):165-7.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., Ledbetter, D.H., 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364, 717–721.
- Rett A. On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med Wochenschr*. 1966 Sep 10;116(37):723-6.
- Ricciardi S, Kilstrup-Nielsen C, Bienvenu T, Jacquette A, Landsberger N, Broccoli V. CDKL5 influences RNA splicing activity by its association to the nuclear speckle molecular machinery. *Hum Mol Genet*. 2009 Dec 1;18(23):4590-602.
- Ríos RM, Sanchís A, Tassin AM, Fedriani C, Bornens M. GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):323-35.
- Rivas, R.J., Hatten, M.E., 1995. Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J. Neurosci*. 15, 981–989.
- 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. Impairment of CDKL5 nuclear localisation as a cause for severe infantile encephalopathy. *J Med Genet*. 2008 Mar;45(3):172-8.
- Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, Landsberger N. CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):30101-11.

Rusconi L, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. Extrasynaptic NMDA receptor stimulation induces CDKL5 cytoplasmic translocation and proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 2011 Aug 5.

Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet.* 2005 Feb;42(2):103-7.

Schüle B, Armstrong DD, Vogel H, Oviedo A, Francke U. Severe congenital encephalopathy caused by MECP2 null mutations in males: central hypoxia and reduced neuronal dendritic structure. *Clin Genet.* 2008 Aug;74(2):116-26. *Epub* 2008 May 8. *Review.*

Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet.* 2002a Jan 15;11(2):115-24.

Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron.* 2002b Jul 18;35(2):243-54.

Sirianni N, Naidu S, Pereira J, Pillotto RF, Hoffman EP. Rett syndrome: confirmation of X-linked dominant inheritance, and localization of the gene to Xq28. *Am J Hum Genet.* 1998 Nov;63(5):1552-8.

Skene PJ, Illingworth RS, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Andrews R, Bird AP. Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol Cell.* 2010 Feb 26;37(4):457-68.

Sowadski JM, Epstein LF, Lankiewicz L, Karlsson R. Conformational diversity of catalytic cores of protein kinases. *Pharmacol Ther.* 1999 May-Jun;82(2-3):157-64. *Review.*

Stiess M, Maghelli N, Kapitein LC, Gomis-Rüth S, Wilsch-Bräuninger M, Hoogenraad CC, Tolić-Nørrelykke IM, Bradke F. Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation. *Science.* 2010 Feb 5;327(5966):704-7.

Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., Gleeson, J.G. Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.* 2004.165, 709–721.

Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Géczy J, Ropers HH, Kalscheuer VM. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet.* 2004 Dec;75(6):1149-54.

Thyberg J, Moskalewski S. Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 1;246(2):263-79. Review.

Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15536-41

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. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2004 Dec;75(6):1079-93.

Williamson SL, Giudici L, Kilstrup-Nielsen C, Gold W, Pelka GJ, Tam PP, Grimm A, Prodi D, Landsberger N, Christodoulou J. A novel transcript of cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) has an alternative C-terminus and is the predominant transcript in brain. *Hum Genet.* 2011 Jul 12.

Young JI, Zoghbi HY. X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of Rett syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004 Mar;74(3):511-20.

Zappella M, Meloni I, Longo I, Hayek G, Renieri A. Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet.* 2001 Nov 15;104(1):14-22.

Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao WN, Ho HY, Schmidt L, Chen WG, Lin Y, Savner E, Griffith EC, Hu L, Steen JA, Weitz CJ, Greenberg ME. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron.* 2006 Oct 19;52(2):255-69.