

PROGETTO DI RICERCA

RUOLO DELLA NEUROINFIAMMAZIONE NELLA FISIOPATOLOGIA DEL DISORDINE DA DEFICIT DI CDKL5

STATO DELL'ARTE E OBIETTIVO DELLO STUDIO

Le cellule immunitarie del cervello e la neuroinfiammazione.

La microglia, le cellule immunitarie del sistema nervoso centrale (SNC), hanno suscitato negli ultimi anni un interesse particolare nell'ambito delle neuroscienze per il loro coinvolgimento nel corretto funzionamento del sistema nervoso centrale sia in condizioni fisiologiche sia patologiche. Durante lo sviluppo, la microglia contribuisce alla formazione delle sinapsi attraverso un processo noto come synaptic pruning, regolando mediante tale processo la maturazione dei circuiti cerebrali e modulando l'attività sinaptica (Paolicelli et al. 2011; Sominsky et al., 2018). Inoltre, tali cellule contribuiscono al processo di neurogenesi postnatale nel cervello adulto (Battista et al., 2006; Choi et al., 2008; Walton et al. 2006) e svolgono una funzione importante nei meccanismi di plasticità sinaptica, che sono alla base dei processi di memoria e apprendimento (Salter e Stevens, 2017). Evidenze sperimentali via via crescenti hanno però messo in evidenza che l'attivazione delle cellule microgliali può portare ad una complessa cascata di eventi biologici attraverso i quali si instaura uno stato infiammatorio che persiste oltre la normale durata fisiologica, provocando una condizione patologica progressiva a livello cerebrale nota come neuroinfiammazione. La microglia attivata può essere una fonte cronica di fattori neurotossici, tra cui il $TNF\alpha$, l'ossido nitrico, l'interleuchina- 1β e specie reattive dell'ossigeno (ROS; Lull and Block 2010). Il danno che l'attivazione microgliale causa ai meccanismi neuronali non si limita agli effetti diretti delle citochine; infatti una volta attivate le cellule microgliali provocano eccitotossicità poiché possono rilasciare elevate dosi di glutammato che causa neurodegenerazione (Dong et al., 2009). Oltre all'attivazione classica indotta da agenti patogeni, la microglia può essere attivata, e indurre neuroinfiammazione, in risposta al danno neuronale e a svariati fattori genetici o ambientali (Lull e Block 2010). È stato ipotizzato che la neuroinfiammazione cronica abbia un ruolo sia nei disturbi dello sviluppo neurologico sia nelle patologie neurodegenerative (Salter e Stevens, 2017; Dong et al., 2009; Essa et al., 2013). In studi post

mortem su individui affetti da disturbi dello spettro autistico è stata riscontrata, parallelamente ad un'alterazione dei circuiti neuronali, la presenza di un numero elevato di cellule microgliali, con una morfologia tipica delle cellule microgliali attivate di tipo proinfiammatorio M1. A riprova di una attivazione microgliale, è stata individuata un'elevata espressione di geni specifici della microglia, inclusi marcatori caratteristici dello stato infiammatorio (Morgan et al., 2010; Morgan et al., 2012, Vargas et al., 2005; Tetreault et al., 2012). In maniera analoga anche in un modello murino della Sindrome di Rett (RTT), è stata riscontrata una iperattivazione microgliale (Maezawa and Jin, 2010).

Inoltre, molteplici evidenze sperimentali e cliniche supportano il ruolo della neuroinfiammazione nella fisiopatologia dell'epilessia nell'uomo. È stato dimostrato che è possibile indurre crisi epilettiche nei roditori in seguito all'iniezione intraventricolare di terreno di coltura condizionato in cui erano state cresciute cellule microgliali attivate. Questo risultato suggerisce il coinvolgimento dell'attivazione microgliale nei processi che portano all'insorgenza dell'epilessia (Zhao et al., 2018). A dimostrazione di ciò, numerosi studi in modelli preclinici di epilessia stanno validando l'efficacia di approcci terapeutici mirati a contrastare i meccanismi neuroinfiammatori (Barker-Haliski et al., 2017). Tali approcci potrebbero rappresentare nuove strategie terapeutiche, soprattutto per quanto riguarda le epilessie resistenti alle classiche terapie antiepilettiche (Aronica et al., 2017).

Il Disordine da Deficit di CDKL5

Il Disordine da Deficit di CDKL5 (CDD; OMIM 300203, 300672) è una grave patologia dello sviluppo neurologico causata da mutazioni del gene CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5). Tale gene è localizzato sul braccio corto del cromosoma X (Montini et al., 1998) e codifica per una serina/treonina chinasi che è altamente espressa a livello cerebrale (Rusconi et al., 2008). Questa grave forma di encefalopatia fu inizialmente classificata come "sindrome di Hanefeld" o "Variante con convulsioni ad esordio precoce" della più conosciuta Sindrome di Rett (RTT) avendo caratteristiche cliniche altamente sovrapponibili a quest'ultima. Di recente però, la sistematica analisi dei sintomi clinici riportati dai pazienti, ha permesso di classificare la CDD come entità clinica distinta dalla RTT. Questa grave patologia genetica è caratterizzata principalmente da un'epilessia farmaco resistente ad esordio precoce che si manifesta già a partire dal primo mese di vita con l'ottanta per cento dei bambini che presenta crisi epilettiche quotidiane (Olson et al., 2019). Oltre a ciò, i pazienti presentano: ipotonia, grave

compromissione motoria, severa disabilità intellettiva, tratti autistici e compromissione visiva (Fehr et al., 2013). L'incidenza è attualmente stimata in 1:42.000 neonati (Symonds et al., 2019) e la maggior parte dei pazienti sono bambine eterozigoti. Allo stato attuale non esistono terapie efficaci per migliorare i sintomi della CDD. Inoltre, gli approcci terapeutici fino ad ora utilizzati per contrastare uno dei sintomi più devastanti di tale patologia, l'epilessia, si sono dimostrati di scarsa efficacia (Olson et al., 2019).

Negli ultimi anni sono stati creati molteplici modelli murini della CDD - ovvero: topi knockout (KO) per *Cdkl5* (Wang et al., 2012; Amendola et al., 2014; Okuda et al., 2017) - che ricapitolano molte delle caratteristiche osservate nei pazienti. I topi *Cdkl5* KO presentano, in analogia con la patologia umana, comportamenti simil autistici, deficit cognitivi caratterizzati da una grave compromissione dei processi di memoria e apprendimento ippocampo-dipendenti, deficit visivi e respiratori e stereotipie motorie. Inoltre, benché il modello murino della CDD non presenti epilessie spontanee, i topi *Cdkl5* KO mostrano però una maggiore suscettibilità alle crisi epilettiche indotte da NMDA rispetto ai topi wild type (Okuda et al., 2017).

Lo studio di tali modelli ha permesso perciò di chiarire il ruolo di *CDKL5* nello sviluppo neuronale e nelle funzioni cerebrali (Zhou et al., 2017); questi animali presentano infatti gravi difetti neuroanatomici come ad esempio una ridotta arborizzazione dendritica, una ridotta densità di spine dendritiche ed un'alterata connettività sinaptica (Fuchs et al., 2014; Nawaz et al., 2016, Zhu e Xiong, 2019). Queste evidenze sperimentali suggeriscono che *CDKL5* abbia un ruolo chiave nello sviluppo e nella corretta funzionalità sinaptica. Malgrado ciò, i meccanismi alla base della nell'eziopatogenesi di questa grave encefalopatia devono ancora essere completamente delucidati.

Recentemente, nel plasma di pazienti con CDD è stata identificata un'alterazione dei livelli di citochine proinfiammatorie proporzionale alla gravità clinica della patologia (Leoncini et al., 2015; Cortelazzo et al., 2017). Questa evidenza suggerisce la presenza di uno stato infiammatorio cronico subclinico nei bambini affetti da tale patologia. Inoltre, i topi *Cdkl5* KO mostrano un'elevata suscettibilità agli stimoli eccitotossici/neurotossici rispetto alla loro controparte wild type (Fuchs et al., 2019), una caratteristica che indica il potenziale coinvolgimento di processi neuroinfiammatori (Viviani et al., 2014). Tali evidenze suggeriscono che processi infiammatori possano essere coinvolti nella fisiopatologia della CDD. **Tuttavia, ad oggi, non è mai stata investigata l'ipotesi che uno stato**

neuroinfiammatorio possa essere presente nel cervello dei pazienti affetti da CDD e che tale stato possa avere un ruolo causativo o perlomeno esacerbante nella fisiopatologia della CDD.

Obiettivo dello studio

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di comprendere ed investigare il ruolo dei processi neuroinfiammatori nella fisiopatologia della CDD ed in particolare, la sua rilevanza nella genesi dell'epilessia.

Uno dei sintomi più devastanti della CDD è rappresentato dall'insorgenza precoce di crisi epilettiche farmaco resistenti che hanno un impatto molto incisivo sulla qualità della vita di questi bambini e sul loro sviluppo neurologico. Negli ultimi anni stanno emergendo evidenze sperimentali, via via crescenti, a supporto di un ruolo della neuroinfiammazione nella fisiopatologia dell'epilessia umana (Zhao et al., 2018; Aronica et al., 2017; Rana e Musto 2018). Risulta perciò di primaria importanza investigare l'ipotesi che i processi neuroinfiammatori possano svolgere un ruolo causale o esacerbante nell'epileptogenesi associata a CDD. Inoltre, poiché è noto che la neuroinfiammazione influenza negativamente lo sviluppo del cervello e, di conseguenza, le capacità cognitive, esiste la possibilità che tale condizione possa contribuire ai difetti neuroanatomici e comportamentali che caratterizzano i topi Cdk15 KO.

Riteniamo che, poiché questo aspetto della patologia non è stato fino ad ora preso in considerazione, lo studio del ruolo della neuroinfiammazione nella CDD ci permetterà di ottenere indicazioni fondamentali al fine di approfondire la nostra comprensione delle basi eziologiche della CDD, e di conseguenza poter sviluppare approcci terapeutici efficaci per questa grave patologia.

PIANO DI ATTIVITÀ

L'assegnista sarà coinvolto nelle attività di seguito descritte.

Caratterizzazione del processo neuroinfiammatorio in topi Cdk15 KO a diverse classi di età.

Per determinare l'insorgenza e l'evoluzione del processo neuroinfiammatorio nelle diverse fasi di sviluppo del cervello di topi Cdk15 KO, analizzeremo il numero e la morfologia delle

cellule microgliali, nonché i livelli di fosforilazione di STAT3 in diverse regioni cerebrali di topi femmine wild type (+/+) e Cdk15 KO (-/+) a differenti classi di età: giovani (20 giorni), adulti (3 mesi) ed in età avanzata (12-14 mesi).

Dopo il sacrificio, il cervello degli animali verrà rapidamente prelevato ed un emisfero verrà fissato con paraformaldeide (PFA) al 4% per essere successivamente analizzato mediante immunostochimica con un anticorpo anti-AIF-1. In questo modo potremo valutare la densità delle cellule microgliali nelle sezioni corticali e ippocampali con metodi stereologici di frazionamento ottico mentre l'area media del soma delle cellule microgliali sarà quantificata mediante tracciamento manuale di almeno un centinaio di cellule AIF-1 positive per ogni campione analizzato. L'altro emisfero verrà invece impiegato per analizzare mediante Western blot i livelli di P-STAT3 e STAT3 a partire da omogenati di corteccia somatosensoriale e di ippocampo. Inoltre, per investigare l'eventualità che un aggravamento del processo neuroinfiammatorio dovuto all'invecchiamento dell'animale abbia un effetto deleterio sulla sopravvivenza neuronale, valuteremo il numero di cellule apoptotiche (cellule positive alla caspasi-3 clivata) e nuclei picnotici (rilevati tramite colorazione con Hoechst) nell'ippocampo e nella corteccia dei topi Cdk15 KO di età avanzata.

Il confronto tra i diversi gruppi di età ci consentirà di definire se il processo neuroinfiammatorio nei topi Cdk15 KO è già presente in età postnatale, se si aggrava con l'invecchiamento in maniera più estrema rispetto alla controparte wild type ed infine se questo possa comportare neurodegenerazione.

Suscettibilità allo sviluppo di crisi epilettiche nei topi Cdk15 KO trattati con LPS

Per verificare se la neuroinfiammazione cronica rende i topi Cdk15 KO maggiormente inclini alla genesi di fenomeni epilettici, confronteremo la suscettibilità alle convulsioni indotte a seguito dell'iniezione di una dose subconvulsiva di NMDA fra topi Cdk15 KO e topi wild type nei quali l'infiammazione periferica è stata indotta tramite la somministrazione di una dose acuta di lipopolisaccaridi di origine batterica (LPS). Topi di tre mesi (P90) Cdk15 KO e topi wild type saranno iniettati per via intraperitoneale con una singola dose di LPS (1mg/kg, ip; Sayyah et al., 2003) o con soluzione salina come controllo, e tre ore dopo saranno trattati con una dose acuta subconvulsiva di NMDA (25 mg/kg, ip; Ferré et al. 1994). Gli animali saranno monitorati per un periodo di tre ore per poter valutare il grado ed il tempo di insorgenza delle crisi epilettiche in base ai seguenti parametri e punteggi pubblicati da Wu e colleghi: 0. Non si

evidenza nessuna anomalia nel comportamento degli animali; 1. Gli animali smettono di esplorare, annusare e fare grooming e si immobilizzano; 2. Gli animali estendono gli arti anteriori e/o a coda, o assumono una postura rigida; 3. Scatti mioclonici della testa e del collo, con brevi movimenti di contrazioni o movimenti ripetitivi della testa e movimenti simili al "wet dog shake"; 4. Clonia degli arti anteriori ed atteggiamento di "rearing" (sollevamento delle zampe posteriori) parziale, o di "rearing" e ricaduta; 5. Clonia degli arti anteriori continuativa o "rearing" e ricaduta continui; 6. Movimenti tonico-clonici con perdita del tono posturale, spesso con esito mortale (Wu et al., 2005). Otto giorni dopo l'iniezione di NMDA gli animali verranno sacrificati ed il cervello verrà prelevato per poter valutare lo stato di attivazione delle cellule microgliali e la sopravvivenza neuronale come descritto sopra.

PIANO DI FORMAZIONE SCIENTIFICA

Il progetto prevede un piano di formazione scientifica mirato a fornire gli strumenti di carattere teorico e pratico, necessari per il raggiungimento degli obiettivi del progetto.

Dal punto di vista pratico, nel progetto verranno acquisite le seguenti metodologie sperimentali:

- Tecniche di immunocitochimica
- Mantenimento di colonie di topi transgenici e genotipizzazione con varie metodiche
- Manipolazione di animali e tecniche di iniezione sistemica e intracerebrale
- Perfusione transcardiaca e prelievo di tessuto cerebrale
- Sezione di tessuto cerebrale tramite microtomo e montaggio delle fettine su vetrino
- Tecniche di colorazione istologica di base (Nissl, Golgi)
- Tecniche di immunoistochimica semplice e doppia su fettine montate e fluttuanti
- Acquisizione computerizzata di immagini di preparati istologici al microscopio ottico, a fluorescenza e confocale
- Impiego di vari software per l'analisi stereologica di diverse regioni cerebrali (stima del volume e del numero di neuroni), per la ricostruzione dell'albero dendritico, per la quantificazione delle spine dendritiche e per la quantificazione dei terminali sinaptici (densità ottica e quantificazione di "puncta" sinaptici individuali).

Estrazione di proteine da campioni di tessuto cerebrale per analisi tramite i western blot.

Tecniche per studi comportamentali mirati a saggiare funzioni di memoria e apprendimento tramite i seguenti test: Morris Water Maze; Y maze; Passive Avoidance e performance motorie.

Impiego di test statistici di base per confronti multipli fra gruppi sperimentali.

Dal punto di vista strettamente teorico il progetto di formazione prevede:

- Frequenza a seminari tenuti nel Dipartimento presso il quale verrà svolto il piano di formazione. I seminari saranno tenuti sia da docenti del dipartimento sia da studiosi nazionali ed internazionali.
- Partecipazione a Congressi scientifici nazionali ed internazionali.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 33(6048):1456-8
2. Sominsky L, De Luca S, Spencer SJ. (2018) Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *Int J Biochem Cell Biol.* 94:56-60.
3. Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. (2006). Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 23(1):83-93.
4. Choi SH, Veeraraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, Sisodia SS. (2008). Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron* 59(4):568-80
5. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP 2nd, Scheffler B, Steindler DA. (2006). Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54(8):815-25
6. Salter MW, Stevens B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med.* 23(9):1018-1027.
7. Lull ME, Block ML. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7(4):354-65.

8. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 30(4):379-87.
9. Essa MM, Braidy N, Vijayan KR, Subash S, Guillemin GJ. (2013). Excitotoxicity in the pathogenesis of autism. *Neurotox Res.* 23(4):393-400.
10. Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, Courchesne E, Everall IP. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry.* 68(4):368-76.
11. Morgan JT, Chana G, Abramson I, Semendeferi K, Courchesne E, Everall IP. (2012). Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Res.* 1456:72-81.
12. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 57(1):67-81.
13. Tetreault NA, Hakeem AY, Jiang S, Williams BA, Allman E, Wold BJ, Allman JM. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *J Autism Dev Disord.* 42(12):2569-84.
14. Maezawa I. and Jin LW (2010). Rett Syndrome Microglia Damage Dendrites and Synapses by the Elevated Release of Glutamate. *J Neurosci.* 30(15):5346-56.
15. Zhao H, Zhu C, Huang D. (2018). Microglial activation: an important process in the onset of epilepsy. *Am J Transl Res.* 10(9):2877-2889.
16. Barker-Haliski ML, Löscher W, White HS, Galanopoulou AS (2017). Neuroinflammation in Epileptogenesis: Insights and Translational Perspectives from New Models of Epilepsy *Epilepsia* 58 Suppl 3(Suppl 3):39-47.
17. Aronica E, Bauer S, Bozzi Y, Caleo M, Dingledine R, Gorter JA, Henshall DC, Kaufer D, Koh S, Löscher W12, Louboutin JP, Mishto M, Norwood BA, Palma E, Poulter MO, Terrone G, Vezzani A, Kaminski RM. (2017). Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. *Epilepsia* 58 Suppl 3(Suppl 3):27-38.
18. Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A, Franco B. (1998). Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* 51(3):427-33.
19. Rusconi L1, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, Landsberger N. (2008). CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its

- subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem.* 283(44):30101-11.
20. Olson HE, Demarest ST, Pestana-Knight EM, Swanson LC, Iqbal S, Lal D, Leonard H, Cross JH, Devinsky O, Benke TA. (2019). Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatr Neurol.* 97:18-25.
 21. Fehr S, Wilson M, Downs J, Williams S, Murgia A, Sartori S, Vecchi M, Ho G, Polli R, Psoni S, Bao X, de Klerk N, Leonard H, Christodoulou J. (2013). The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet.* 21(3):266-73.
 22. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, McLellan A, O'Regan M, MacLeod S, Jollands A, Joss S, Kirkpatrick M, Brunklaus A, Pilz DT, Shetty J, Dorris L, Abu-Arafeh I, Andrew J, Brink P, Callaghan M, Cruden J, Diver LA, Findlay C, Gardiner S, Grattan R, Lang B, MacDonnell J, McKnight J, Morrison CA, Nairn L, Slean MM, Stephen E, Webb A, Vincent A, Wilson M. (2019). Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain* 142(8):2303-2318.
 23. Wang IT, Allen M, Goffin D, Zhu X, Fairless AH, Brodtkin ES, Siegel SJ, Marsh ED, Blendy JA, Zhou Z. (2012). Loss of CDKL5 disrupts kinome profile and event-related potentials leading to autistic-like phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(52):21516-21.
 24. Amendola E, Zhan Y, Mattucci C, Castroflorio E, Calcagno E, Fuchs C, Lonetti G, Silingardi D, Vyssotski AL6, Farley D, Ciani E, Pizzorusso T, Giustetto M, Gross CT. (2014). Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. *PLoS One* ;9(5):e91613.
 25. Okuda K, Kobayashi S, Fukaya M, Watanabe A, Murakami T, Hagiwara M, Sato T, Ueno H, Ogonuki N, Komano-Inoue S, Manabe H, Yamaguchi M, Ogura A, Asahara H, Sakagami H, Mizuguchi M, Manabe T, Tanaka T. (2017). CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility. *Neurobiol Dis.* 106:158-170.
 26. Zhou A, Han S, Zhou ZJ. (2017). Molecular and genetic insights into an infantile epileptic encephalopathy - CDKL5 disorder. *Front Biol (Beijing).* 12(1):1-6.
 27. Fuchs C, Trazzi S, Torricella R, Viggiano R, De Franceschi M, Amendola E, Gross C, Calzà L, Bartesaghi R, Ciani E. (2014). Loss of CDKL5 impairs survival and dendritic growth of newborn neurons by altering AKT/GSK-3 β signaling. *Neurobiol Dis.* 70(100):53-68.

28. Nawaz MS, Giarda E, Bedogni F, La Montanara P, Ricciardi S, Ciceri D, Alberio T, Landsberger N, Rusconi L, Kilstrup-Nielsen C. (2016). CDKL5 and Shootin1 Interact and Concur in Regulating Neuronal Polarization. *PLoS One* 11(2):e0148634.
29. Zhu YC e Xiong ZQ. (2019). Molecular and Synaptic Bases of CDKL5 Disorder. *Dev Neurobiol.* 79(1):8-19.
30. Leoncini S, De Felice C, Signorini C, Zollo G, Cortelazzo A, Durand T, Galano JM, Guerranti R, Rossi M, Ciccoli L, Hayek J. (2015). Cytokine Dysregulation in MECP2- and CDKL5-Related Rett Syndrome: Relationships with Aberrant Redox Homeostasis, Inflammation, and ω -3 PUFAs. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:421624.
31. Cortelazzo A, de Felice C, Leoncini S, Signorini C, Guerranti R, Leoncini R, Armini A, Bini L, Ciccoli L, Hayek J. (2017). Inflammatory protein response in CDKL5-Rett syndrome: evidence of a subclinical smouldering inflammation. *Inflamm Res.* 66(3):269-280.
32. Fuchs C, Medici G, Trazzi S, Gennaccaro L, Galvani G, Berteotti C, Ren E, Loi M, Ciani E. (2019). CDKL5 deficiency predisposes neurons to cell death through the deregulation of SMAD3 signaling. *Brain Pathol.* 29(5):658-674.
33. Viviani B, Boraso M, Marchetti N, Marinovich M. (2014). Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy? *Neurotoxicology* 43:10-20.
34. Rana A, Musto AE. (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation* 15(1):144.
35. Sayyah M, Javad-Pour M, Ghazi-Khansari M. (2003). The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience* 122(4):1073-80.
36. Ferré S, Giménez-Llort L, Artigas F, Martínez E. (1994). Motor activation in short- and long-term reserpinized mice: role of N-methyl-D-aspartate, dopamine D1 and dopamine D2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 255(1-3):203-13.
37. Wu G, Lu ZH, Wang J, Wang Y, Xie X, Meyenhofer MF, Ledeen RW. (2005). Enhanced susceptibility to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death in mice lacking ganglioside GM1: protection with LIGA 20, a membrane-permeant analog of GM1. *J Neurosci.* 25(47):11014-22.