André Luiz Teles e Silva

**Estudo funcional de variantes raras nos genes
CACNA1H e *RELN*: um modelo oligogênico de herança
no Transtorno do Espectro Autista.**

**Functional study of rare variants in the *CACNA1H* and *RELN* genes: an
oligogenic model of inheritance for Autism Spectrum Disorder.**

São Paulo
2020

André Luiz Teles e Silva

Estudo funcional de variantes raras nos genes *CACNA1H* e *RELN*: um modelo oligogênico de herança no Transtorno do Espectro Autista.

Functional study of rare variants in the *CACNA1H* and *RELN* genes: an oligogenic model of inheritance for Autism Spectrum Disorder.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Genética.

Orientadora: Dra. Andrea Laurato Sertié
Co-orientadora: Dra. Karina Griesi Oliveira

São Paulo
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo autor.

Teles e Silva, André Luiz.

Estudo funcional de variantes raras nos genes *CACNA1H* e *RELN*: um modelo oligogênico de herança para o Transtorno do Espectro Autista / André Luiz Teles e Silva; orientador Andrea Laurato Sertie; co-orientadora Karina Griesi Oliveira -- São Paulo, 2020.

105 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Herança oligogênica. 3. Gene *CACNA1H*. 4. Gene *RELN*. I. Sertie, Andrea Laurato. II. Oliveira, Karina Griesi. III. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação: Elisabete da Cruz Neves. CRB - 8/6228.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Andrea Laurato Sertié
Orientadora

Dedico este trabalho à minha família que sempre me incentivou e acreditou na possibilidade de mudar o sentido da vida através da educação. À recém chegada Ana Luiza e a menina prodígio Isabella Sousa. À minha companheira Paula Barros e sua família.

In memoriam de José e Terezinha Barros.

Agradecimentos

Os pilares fundamentais que alicerçam meus sonhos foram construídos através de palavras, olhares, abraços e incentivos das pessoas que estão comigo ou que passaram por mim, mas deixaram partes de si e levaram partes de mim. É a elas que devo e dedico este trabalho, que representa muito mais que um pequeno recorte de tempo e dedicação, representa uma conquista.

Agradeço a minha família que sempre está comigo, mesmo à distância. Com grande alegria recebi a notícia da chegada da minha sobrinha Ana Luiza, mas com pesar por não estar presente neste momento tão importante.

Obrigado Isabella, minha irmã, por me fazer acreditar que posso contribuir com o seu crescimento. A cada pequena conquista sua, eu me encho de esperança e orgulho.

Obrigado Mãe! Obrigado Pai! Só posso dizer que isso é por vocês!

O tempo me mostrou que famílias também podem ser construídas, através do amor, sacrifício e companheirismo. E é por isso que não posso deixar de mencionar o papel fundamental da pessoa que me inspira com a sua dedicação, fraternidade e afeto, além de muito trabalho árduo. Pois, poucas coisas na vida são mais gratificantes do que estar ao lado de alguém que admiramos. Obrigado Paula Barros e a sua família.

Que trabalho em Andrea Sertie? Receber um aluno que só sabia fazer PCR (rsrs). Acho que preciso documentar aqui toda a paciência, atenção e cuidado recebido ao longo desse mestrado. Sabemos o quão perigoso é o ambiente acadêmico para a nossa saúde mental, mas graças a você essa caminhada foi muito mais fácil. (Um recado aos futuros alunos, ela fará vocês trabalharem muito apenas deixando vocês empolgados. Cuidado!).

Estendo aqui meus agradecimentos aos meus companheiros de cerveja.. equipe de pesquisa e laboratório, por me aturarem e tornarem meus dias de trabalho um grande encontro entre amigos. Mas, não sei se aguento mais 4 anos trabalhando com a Ana K, afinal já foram 6 anos.

À equipe IIEP por tornarem tudo isso possível, com o melhor suporte científico que há! E aos alunos do “Lab 200” do IB-USP por toda ajuda nos momentos crucias.

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP– Código do processo 2019/08655-2, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA de Gestão em Projetos.

Além do apoio da FABAO (Fundação Antônio Barros de Amparo a Orelhudos).

Sumário

CAPÍTULO 1– INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	1
1.1) Transtorno do Espectro Autista: sintomatologia e epidemiologia	1
1.2) Etiologia do Transtorno do Espectro Autista e arquitetura genética.....	2
1.2.1) Modelo oligogênico e convergência de vias biológicas no Transtorno do Espectro Autista.....	5
1.3) Paciente brasileiro com Transtorno do Espectro Autista: investigação de um modelo oligogênico de herança	6
1.3.1) Estudo funcional da variante identificada no gene <i>RELN</i> no paciente F2688 (resultados já publicados)	8
1.4) Canais de cálcio, gene <i>CACNA1H</i> e seu envolvimento no Transtorno de Espectro Autista.....	12
1.4.1) Canais de cálcio dependentes de voltagem	13
1.4.2) Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T e papel do gene <i>CACNA1H</i> em doenças neurológicas	15
1.5) Hipóteses do trabalho e desenho experimental	18
1.6) Objetivos	20
1.6.1) Objetivos gerais.....	20
1.6.2) Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 2– MATERIAIS E METODOS	23
2) MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1) Pacientes com Transtorno do Espectro Autista, indivíduos controles e análises genéticas	23
2.2) Cultivo de células neuroprogenitoras	24
2.3) Extração de RNA, síntese de cDNA, PCR convencional e PCR quantitativo (qPCR).....	25
2.4) Clonagem do fragmento de cDNA do gene <i>CACNA1H</i> que contém a variante presente no paciente F2688; cultivo e transfecção de células HEK293T.....	25
2.5) Medida do influxo de cálcio extracelular (ensaio de leitor de placa de imagem fluorométrica, FLIPR)	26
2.6) Preparação de meio enriquecido com Relina	27
2.7) Tratamento das células com NNC 55-0396, rapamicina ou Relina selvagem	28
2.8) Extração de proteínas totais e western blot	28
2.9) Mensuração do tamanho celular.....	29
2.10) Análise da proliferação celular.....	29
2.11) Análise da migração celular (<i>scratch-wound healing assay</i>).....	30

2.12) Construção dos modelos tridimensionais e predição de sítios de splicing.....	30
2.13) Análise estatística.....	31
CAPÍTULO 3– ARTIGO CIENTIFICO	33
<i>CAPÍTULO 4 – Discussão geral e conclusões</i>	<i>75</i>
Discussão Geral e Conclusões.....	76
Resumo	82
Abstract.....	83
Referências Bibliográficas GERAIS	84

CAPÍTULO 1– INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

CAPÍTULO 1– INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1) Transtorno do Espectro Autista: sintomatologia e epidemiologia

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico caracterizado por dois grupos de sintomas principais: deficiência na reciprocidade e comunicação social, e comportamento restrito, repetitivo e estereotipado (American Psychiatric Association, 2013). O termo espectro faz referência à falta de homogeneidade na manifestação dos sintomas, resultando em amplo grau de variabilidade na trajetória de desenvolvimento do transtorno, mesmo entre indivíduos da mesma família (Kolevzon et al., 2004; Szatmari et al., 2015). Ainda, outras manifestações clínicas podem estar presentes nos pacientes, tais como deficiência intelectual, epilepsia, transtorno obsessivo compulsivo, ansiedade, resposta anormal a estímulos sensoriais, problemas gastrointestinais, macrocefalia e hipotonia, dentre outros (American Psychiatric Association, 2013; Aldinger et al., 2015).

As estimativas mais recentes de prevalência do TEA apontam que o transtorno acomete cerca de 1% a 2% da população mundial (Baio et al., 2018; Mandy & Lai, 2016). A prevalência do TEA vem aumentando substancialmente ao longo dos anos (Fombonne, 2004), e algumas das possibilidades para esse aumento incluem o maior conhecimento sobre o TEA tanto pelo público leigo quanto por profissionais da saúde, o que leva a maior eficiência no diagnóstico precoce, mudanças em critérios diagnósticos e melhorias em metodologias de análises epidemiológicas (Blumberg et al., 2013; B. K. Lee & McGrath, 2015)

O TEA é significativamente mais comum em meninos do que em meninas, em uma proporção de 4,2 meninos com o transtorno para cada menina. Esta distorção pode ser em decorrência de múltiplos fatores como, por exemplo, a idade em que os indivíduos são avaliados, pois meninas tendem a apresentar características clínicas do TEA mais tardiamente e tendem a recorrer a estratégias de camuflagem dos sintomas, isto é, apresentam maior habilidade de “esconder” socialmente as características do TEA (Loomes et al., 2017). Além

disso, estudos recentes apontam a influência de genes diferencialmente expressos entre os sexos envolvidos na ativação de células imunes neurais, como a micróglia, resultando em uma maior ativação deste tipo celular em cérebros de meninos em resposta a alterações no ambiente intrauterino (como infecções), o que gera um ambiente inflamatório exacerbado que representa um fator de risco ao TEA (Werling, 2016; Villa et al., 2018).

1.2) Etiologia do Transtorno do Espectro Autista e arquitetura genética

Para decifrar a etiologia do TEA diversos estudos avaliaram a concordância do transtorno, que é a presença da mesma característica fenotípica, entre indivíduos com estreito laço familiar, tais como gêmeos monozigóticos, gêmeos dizigóticos e irmãos. Foi observado que a taxa de concordância do TEA variou entre 30 a 99% para gêmeos monozigóticos, 0 a 65% para gêmeos dizigóticos, e 3 a 30% para irmãos. Assim, a herdabilidade estimada para o TEA, que avalia a proporção da contribuição genética na expressão e variabilidade do transtorno, varia entre 38 a 90% (R. E. Rosenberg *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2013; Colvert *et al.*, 2015; Hallmayer *et al.*, 2015; Tick *et al.*, 2016; Sandin *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2019), o que revela a contribuição tanto de fatores genéticos como ambientais para essa condição.

Estudos genômicos em larga escala em indivíduos com TEA realizados nas últimas duas décadas, como os *microarrays* e o sequenciamento de nova geração, têm revelado que as bases genéticas do transtorno, ou sua arquitetura genética, é extremamente complexa e heterogênea, e tanto variantes genéticas raras (pouco frequentes na população) de risco moderado a alto como variantes genéticas comuns (frequentes na população) de risco baixo podem contribuir para sua etiologia. Recentemente, Bourgeron (2015) publicou uma revisão ilustrando como a combinação de variantes genéticas raras e comuns contribuem para moldar o fenótipo do TEA e influenciar na grande variabilidade encontrada nos pacientes. Segundo esse modelo, a quantidade de variantes frequentes de risco baixo presentes no indivíduo pode influenciar o impacto das

variantes raras de penetrância moderada a alta, contribuindo para a manifestação do TEA (Figura 1).

Figura 1. Interação entre variantes genéticas raras e comuns (*background* genético) na etiologia do TEA. A etiologia genética do TEA pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos. Uma variante *de novo*, rara e de risco alto (representada pela estrela vermelha) pode causar TEA mesmo em indivíduos com baixo *background* genético de risco, ou seja, com baixa carga de variantes de risco comuns (representada pela cor azul). O TEA também pode ocorrer em indivíduos que herdam mais de uma variante rara de risco moderado e penetrância reduzida (representada pela estrela roxa), ou em indivíduos que herdam uma carga média de variantes comuns de risco (representada pela cor roxa) e uma variante rara de risco moderado (representada pela estrela roxa). Finalmente, o TEA pode ocorrer em indivíduos que herdam uma grande quantidade de variantes comuns de risco baixo (extrema direita, representada pela cor laranja) (Adaptado de Bourgeron, 2015).

No modelo ilustrado na Figura 1 (extremidade esquerda), um indivíduo que apresenta um *background* genético de risco baixo (ou seja, baixa carga de variantes comuns de risco baixo, representada pela cor azul) apenas desenvolverá TEA se for portador de uma variante deletéria rara, *de novo* e com alta penetrância (representada pela estrela vermelha), em um modelo monogênico de herança. Na segunda situação da Figura 1 (centro esquerda), um indivíduo que apresenta um *background* genético de risco baixo, mas herda mais de uma variante rara de risco moderado (representada pela estrela roxa) desenvolverá TEA. Este modelo poderia explicar a observação de múltiplos *hits* (mutações em loci distintos) em alguns indivíduos com TEA, ou seja, um modelo oligogênico de herança, no qual individualmente cada variante não seria

suficiente para causar TEA, mas que quando combinada com outra ou outras variantes de risco moderado poderiam agir de forma aditiva para desestabilizar o desenvolvimento neuronal resultando no transtorno (Girirajan *et al.*, 2010; Leblond *et al.*, 2012; Pizzo *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2019). Na terceira situação (centro direta), um indivíduo que é portador de um *background* genético com carga moderada de variantes comuns de risco (representada pela cor roxa), desenvolverá TEA na presença de uma variante rara de risco moderado (representada pela estrela roxa). Na quarta situação da Figura 1 (extremidade direita), o indivíduo apresenta TEA pois herda uma combinação de variantes comuns de risco baixo em grande quantidade, ou seja, apresenta uma alta carga de variantes comuns de risco baixo (representada pela cor alaranjada). Essas duas últimas situações se aproximariam mais de um modelo de herança poligênico ou multifatorial, e podem representar parte das famílias nas quais os pais possuem traços do TEA (Constantino, 2011; Bourgeron, 2015; Iakoucheva, Muotri, & Sebat, 2019).

Estima-se que cerca de 25-30% dos casos de TEA são decorrentes de variantes deletérias raras de risco moderado a alto em um único gene principal (modelo monogênico) ou em poucos genes (modelo oligogênico). A maior parte dos genes de risco atualmente conhecidos para TEA estão envolvidos nesses modelos de herança, e as variantes deletérias constituem deleções ou duplicações de segmentos genômicos (do inglês, *copy number variations* - CNVs) ou de poucos nucleotídeos (indels), ou ainda mutações pontuais não sinônimas, sobretudo em regiões codificadoras dos genes (do inglês, *single nucleotide variants*, SNVs) (Bourgeron, 2015). Apesar de centenas de genes de risco para o TEA terem sido identificados (de acordo com a *Simons Foundation Autism Research Initiative* – <https://gene.sfari.org/>, que agrupa todas as informações sobre *loci* de risco para o TEA já publicadas), a contribuição de cada gene em particular é muito pequena, e nenhum deles foi individualmente encontrado em mais de 1% dos pacientes (Gaugler *et al.*, 2014) (Figura 2).

O restante dos casos de TEA parece ser compatível com o modelo poligênico/multifatorial de herança e, nesses casos, pouco se sabe quais são as variantes de risco baixo e quantas delas são necessárias para a penetrância completa do TEA em cada paciente (Bourgeron, 2015; Huguet, Benabou, & Bourgeron, 2016) (Figura 2).

Arquitetura Genética do TEA

Figura 2. Arquitetura genética do TEA. Cerca de 3-5% dos pacientes com TEA apresentam variantes genéticas raras herdadas, e outros 5-10% dos pacientes apresentam variantes genéticas raras *de novo*. Cerca de 10-15% dos pacientes apresentam alterações cromossômicas estruturais, as quais podem ser microscopicamente visíveis ou relativamente menores, as CNVs. Embora existam CNVs espalhadas por todos os cromossomos, em algumas regiões ocorrem CNVs mais frequentes, como as observadas em 15q11-q13, 2p16, 16p11.2, 17q12 e 22q13, que combinadas estão presentes em cerca de 2-3% dos casos de TEA (Marshall et al., 2008; Glessner et al., 2009; Depienne et al., 2009). No restante dos casos, cerca de 70-75%, o TEA apresenta etiologia desconhecida ou poligênica / multifatorial. Dentre esses, estima-se que variantes genéticas comuns de risco baixo estejam envolvidas na manifestação do transtorno em aproximadamente 50% dos casos (Gaugler 2014, et al., 2014; Bourgeron, 2015).

1.2.1) Modelo oligogênico e convergência de vias biológicas no Transtorno do Espectro Autista

Na literatura científica existem diversas evidências do modelo oligogênico de herança para o TEA. Um dos primeiros relatos apontou que indivíduos com atraso do neurodesenvolvimento (incluindo TEA) apresentavam enriquecimento de uma deleção de 520 Kb na região cromossômica 16p12.1, a qual representa um fator de risco moderado ao transtorno pois também é encontrada em menor frequência na população controle. Além disso, diversos desses indivíduos afetados também apresentavam uma carga aumentada de pelo menos outra CNV, e que o quadro clínico daqueles com dois *hits* era mais grave do que o apresentado pelos indivíduos portadores de apenas uma das CNVs (Girirajan et al., 2010a). Outro estudo demonstrou que alguns indivíduos com TEA portadores

de variantes deletérias *de novo* no gene *SHANK2* também eram portadores de CNVs herdadas na região 15q11-q13, a qual também constitui um fator de risco moderado ao TEA (Leblond et al., 2012). Ainda, diferentes estudos utilizando sequenciamento de nova geração (sequenciamento do exoma ou do genoma completo) mostraram a presença de variantes deletérias em mais de um gene de risco em um mesmo indivíduo com TEA, como nos genes *CHD8* e *CUBN* (O'Roak et al., 2012); *SCN2A* e *PTPN14* (Rubeis et al., 2014); *USP54*, *KIAA1217* e *FAT3* (Jiang et al., 2013); *CACNA1H* e *SETX*; e *RELN* e *DIP2A* (Du et al., 2019).

Cabe ressaltar ainda que estudos publicados mais recentemente demonstraram que a gravidade do quadro clínico de indivíduos com TEA está positivamente correlacionada com o número de variantes raras apresentadas pelos pacientes (Du et al., 2019; Pizzo et al., 2019), e que existe uma conectividade funcional entre os diferentes genes com variantes deletérias identificados um mesmo paciente (Du et al., 2019). Assim, essas análises sugerem que os genes com variantes de risco envolvidas no modelo oligogênico de herança para o TEA parecem interagir direta ou indiretamente por meio de redes de interação transcricional ou proteica, e cada gene teria um papel aditivo nas alterações fenotípicas encontradas nos pacientes (Du et al., 2019; Lakoucheva et al., 2019). Contudo, até o momento não há na literatura científica estudos funcionais detalhados que demonstrem como ocorrem essas interações e convergências de vias biológicas em modelos oligogênicos associados ao TEA. O presente trabalho de mestrado visa contribuir nesta área do conhecimento sobre o TEA, conforme abaixo detalhado.

1.3) Paciente brasileiro com Transtorno do Espectro Autista: investigação de um modelo oligogênico de herança

Com o objetivo de identificar variantes genéticas de risco em pacientes brasileiros com TEA, nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo da Dra. Maria Rita Passos-Bueno do Instituto de Biociências (IB) da USP, teve acesso aos dados de sequenciamento do exoma completo a partir de amostras

de DNA genômico do sangue periférico de 30 pacientes com TEA não síndrômico e idiopático e de seus pais. As variantes genéticas identificadas foram analisadas de acordo com: i) a frequência em bancos de dados populacionais [como *1000 Genomes*, *The Genome Aggregation Database (GnomAD)*, *Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM)*]; ii) o tipo (*missense*, *nonsense*, *frameshift*, *splice site*); iii) a presença nos pais (variante *de novo* ou herdada); iv) a conservação evolutiva (com o auxílio do programa *BlastP*); v) a presença em genes expressos no encéfalo ou durante o desenvolvimento embrionário; vi) o potencial de patogenicidade (utilizando programas de predição como *PolyPhen*, *SIFT*, *Mutation Taster*, *Human Splicing Finder* e *CADD*); e vii) a presença em genes descritos no banco de dados SFARI como de risco ao TEA (scores 1 e 2) (Sánchez-Sánchez et al., 2018; da Silva Montenegro et al., 2020; Griesi-Oliveira et al., 2020).

Dentre as variantes identificadas e selecionadas de acordo com os critérios acima mencionados, julgamos particularmente interessantes e candidatas a estarem associadas ao TEA em um modelo de herança oligogênico, as combinações de variantes presentes em um paciente com TEA moderado e macrocefalia, denominado aqui como F2688:

Gene *RELN* (NM_005045.3) - o paciente é heterozigoto composto para as variantes de substituição de aminoácido c.7538C>G:p.Ser2513Cys e c.7634C>T:p.Ala2545Val no exon 48 do gene *RELN*, o qual está mapeado em 7q22 e apresenta score 1 no banco de dados SFARI (ou seja, apresenta alta evidência de estar associado ao TEA). A variante c.7538C>G:p.Ser2513Cys, herdada de seu pai, está presente no banco de dados dbSNP (rs114647348), é muito rara em bancos de dados populacionais (MAF <0,004) e em indivíduos controles da população brasileira (frequência <0,0016, bando de dados ABraOM), é predita como potencialmente patogênica por alguns dos programas de predição de patogenicidade e apresenta CADD score de 21. A variante c.7634C>T:p.Ala2545Val, herdada de sua mãe, está presente no banco de dados dbSNP (rs116634494), é muito rara em bancos de dados populacionais (MAF <0,0005) e em indivíduos controles da população brasileira (frequência <0,0008, bando de dados ABraOM), é predita como potencialmente patogênica por alguns dos programas de predição e apresenta CADD score de 25.

Gene *CACNA1H* (NM_001005407) - o paciente também é heterozigoto para a variante de substituição de nucleotídeo nova c.2907+1 G>A no sítio doador de *splicing* do íntron 13 do gene *CACNA1H*, o qual está mapeado em 16p13.3 e apresenta score 2 no banco de dados SFARI (ou seja, é um forte candidato a estar associado ao TEA). A variante identificada não está descrita em bancos de dados populacionais, apresenta CADD score de 23,6 e é predita alterar o processamento do mRNA do gene, levando à não retirada do intron 13 (o qual apresenta 156 pares de bases) e ao acréscimo de 52 resíduos de aminoácidos no produto proteico em virtude da tradução da região intrônica (Figura 3).

Figura 3. Variante rara no sítio doador de *splicing* no intron 13 do gene *CACNA1H* no paciente F2688 é predita resultar na retenção de todo o íntron no mRNA maduro. **(A)** Representação esquemática da excisão do intron 13 no transcrito maduro do alelo selvagem do gene *CACNA1H*. **(B)** Representação esquemática da retenção do intron 13 no transcrito maduro do alelo mutado do gene *CACNA1H*.

1.3.1) Estudo funcional da variante identificada no gene *RELN* no paciente F2688 (resultados já publicados)

O gene *RELN* codifica a proteína Relina, uma grande glicoproteína secretada constituinte da matriz extracelular que se liga à região extracelular dos receptores de membrana ApoER2 e VLDLR e ativa a fosforilação de resíduos de tirosina das quinases FYN, SRC e da proteína adaptadora intracelular DAB1 (Keshvara et al., 2001; Niu et al., 2004), e então desencadeia a ativação de cascatas de sinalização intracelular, dentre as quais a via mTORC1 (Jossin & Goffinet, 2007), conhecida por seu envolvimento em TEA (Magdalon et al., 2017). Diversos estudos, sobretudo com modelos murinos, mostraram que Relina controla a migração e o posicionamento de células neurais no encéfalo e

espinha dorsal, a formação e arborização de neuritos e o funcionamento das sinapses, tanto durante o desenvolvimento embrionário como na vida adulta (Hong et al., 2000; Ognibene et al., 2008; Qiu et al., 2006; Stahl et al., 2013).

Estudos de expressão gênica e proteica diferencial em cérebro *post-mortem* de pacientes com doenças psiquiátricas como esquizofrenia, transtorno bipolar e TEA, sugeriram que diminuição da expressão da Relina poderia ter um papel significativo na etiologia dessas doenças (Fatemi et al., 2005). Estudos de associação entre variantes polimórficas presentes no gene *RELN* e TEA sugeriram a presença de variantes de risco neste gene (Wang et al., 2014). Ainda, estudos mais recentes de sequenciamento de exoma completo de pacientes com TEA revelaram a presença de diferentes variantes pontuais potencialmente de perda de função no gene *RELN* em alguns pacientes, a maior parte delas herdada de pais fenotipicamente normais e em heterozigose nos pacientes (Lammert & Howell, 2016). Contudo, embora o gene *RELN* receba *score* 1 no banco de dados SFARI, estudos funcionais que exploram os efeitos moleculares e celulares que variantes de risco nesse gene identificadas em pacientes com TEA têm sobre células neurais humanas são escassos (Lammert et al., 2017). Ainda, não é sabido se essas variantes são sozinhas suficientes para causar TEA, já que a maior parte delas também está presente em genitores sem TEA, ou se existe a necessidade de variantes em outros genes para que o transtorno tenha penetrância completa nos pacientes.

As variantes raras identificadas no paciente F2688 no gene *RELN* estão localizadas na região da proteína Relina que se liga a seus receptores de membrana e é capaz de ativar fosforilação de FYN, SRC e DAB1 (Keshvara et al., 2001; Yasui et al., 2007, 2010). Contudo, estudos funcionais faziam-se necessários para comprovar a patogenicidade de tais variantes. Com o objetivo de poder explorar as consequências fenotípicas/celulares das variantes identificadas no paciente F2688, nosso grupo de pesquisa gerou, em colaboração com a Dra Karina Griesi-Oliveira, células-tronco pluripotentes induzidas (em inglês, *induced pluripotent stem cells*, iPSCs) (Takahashi et al., 2007) a partir de células-tronco da polpa de dente decíduo (em inglês, *stem cell from human exfoliated deciduous teeth* - SHEDs) do paciente F2688, de outros 5 pacientes com TEA idiopático sem variantes deletérias em genes candidatos ao TEA presentes no banco de dados SFARI, e de 5 indivíduos controles pareados

por sexo e idade com os pacientes. Após confirmação do sucesso da geração de diferentes clones de iPSCs de cada um desses indivíduos, estas células foram transformadas em células neuroprogenitoras (em inglês, *neural progenitor cells*, NPCs) e depois em neurônios (Figura 4).

Figura 4. Imagens de imunofluorescência de **(A)** iPSCs geradas pela transdução de SHEDs com vetores retrovirais contendo a região codificadora dos genes *OCT-3/4*, *SOX-2*, *KLF-4* e *c-MYC* (Takahashi et al., 2007). Estas células expressam marcadores de pluripotência como Lin28, Nanog, Sox2 e Oct4. **(B)** NPCs geradas a partir das iPSCs seguindo protocolo descrito em (Marchetto et al., 2010) expressam os marcadores Nestina e Sox2. **(C)** Neurônios gerados a partir das NPCs seguindo protocolo descrito em (Marchetto et al., 2010) expressam os marcadores β -III-tubulina e MAP2. Aumento de 10x em A, 20x em B e C.

Utilizando as NPCs derivadas do paciente F2688 e dos demais indivíduos acima descritos, foram realizados diversos estudos funcionais direcionados para a Relina e as vias de sinalização intracelular ativadas por ela. Foi observado que as NPCs do paciente F2688 apresentam: **1)** secreção diminuída da Relina para o meio extracelular; **2)** deficiência na via de sinalização da Relina (visualizada por meio da diminuição significativa da fosforilação das proteínas FYN, SRC e DAB1); **3)** aumento da atividade da via de sinalização mTORC1 (visualizada por meio do aumento da fosforilação de proteínas da via); **4)** aumento da expressão da proteína CUL5, uma ubiquitina ligase regulada positivamente pela via mTORC1 que é responsável pela degradação de FYN, SRC e DAB1 fosforiladas; **5)** um *crosstalk* anormal entre as vias da Relina e mTORC1, uma vez que o tratamento das células com rapamicina, um inibidor específico de mTORC1, resgata a deficiência na via da Relina.

Os resultados sugeriram também que o hiperfuncionamento da via mTORC1 nas NPCs do paciente F2688 não é devido a presença das variantes na Relina e a sua menor secreção para o meio extracelular, uma vez que o cultivo das células com grandes quantidades de Relina selvagem não reverteu a hiperativação da via mTORC1. Assim, o hiperfuncionamento da via mTORC1 nas células neurais derivadas do paciente F2688 parece funcionar como um “segundo hit” que acentua a deficiência da via da Relina por degradar mais as proteínas FYN, SRC e DAB1 fosforiladas. Esses resultados foram recentemente publicados (Sánchez-Sánchez et al., 2018).

Ainda é desconhecido qual ou quais são as variantes genéticas associadas ao hiperfuncionamento da via de sinalização mTORC1 nas NPCs do paciente F2688, mas nossa hipótese é que possa ser devido, pelo menos em parte, à variante identificada no gene *CACNA1H*, o qual codifica um canal de cálcio (Ca^{2+}) dependente de voltagem do tipo T (mais detalhes adiante). É sabido que a quantidade de Ca^{2+} intracelular regula a atividade da via mTORC1 (Conus et al., 1998; Graves et al., 1997; Hannan et al., 2003) (Figura 5). Assim, julgamos que a variante identificada em *CACNA1H* seja funcional e leve a alterações na quantidade de Ca^{2+} intracelular, o que, por sua vez, acarretaria no aumento da atividade da via mTORC1, que já sabemos contribuir para o funcionamento deficiente da via da Relina (Sánchez-Sánchez et al., 2018). Este projeto de mestrado teve como um de seus objetivos testar essa hipótese, conforme especificado mais adiante (seção I.5).

Figura 5. Via de sinalização de PI3K-mTOR e sua relação com o Ca^{2+} intracelular. A via de sinalização PI3K-mTOR pode ser ativada por uma gama de moléculas sinalizadoras que se ligam a receptores tirosina-quinases (RTKs) ou receptores acoplados a proteínas G presentes na membrana plasmática. A ativação destes receptores leva à ativação da quinase PI3K, o que resulta na geração de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que por sua vez promove o recrutamento e a fosforilação da quinase Akt. Uma vez ativada, Akt fosforila TSC2 e inativa a atividade GAP do complexo TSC1/TSC2, o que leva à ativação da GTPase Rheb, que por sua vez ativa mTOR (mais precisamente o complexo mTOR-Raptor, ou mTORC1). Alternativamente, mTOR ainda pode ser ativado pela via Ras-Erk, na qual Ras, uma proteína com atividade GTPásica, ativa PI3K. Diferentes estudos mostram que Ca^{2+} pode regular a atividade da via mTOR (Graves et al., 1997; Conus et al., 1998; Hannan et al., 2003), e que a fosforilação de S6K1, alvo *downstream* a mTOR, é inibida na presença de quelantes de Ca^{2+} (Y, 2017).

1.4) Canais de cálcio, gene *CACNA1H* e seu envolvimento no Transtorno de Espectro Autista

O Ca^{2+} intracelular livre é normalmente mantido em um nível baixo (10-100 nM) e age como um segundo mensageiro universal (Nedergaard & Verkhratsky, 2010), atuando para impulsionar muitos processos celulares que incluem secreção hormonal, liberação de neurotransmissores, transcrição gênica e modulação de vias de sinalização intracelular que controlam proliferação, diferenciação, migração e morfologia celular (S. S. Rosenberg & Spitzer, 2011; Ross & Manita, 2012; Louhivuori et al., 2013; Brini et al., 2014; Zamponi et al., 2015; Rebellato et al., 2019). O Ca^{2+} intracelular ativa inúmeras enzimas, incluindo cinases, fosfatases e proteases, e ativa canais iônicos,

incluindo canais de K⁺ ativados por Ca²⁺. Portanto, o Ca²⁺ tem múltiplos efeitos sobre a função celular (Catterall et al., 2013).

O controle do influxo de Ca²⁺ é feito por canais presentes na membrana plasmática e no retículo endoplasmático/sarcoplasmático. Os canais de Ca²⁺ controlados por voltagem reagem à despolarização do potencial de membrana, abrindo para permitir que os íons de Ca²⁺ fluam de acordo com o gradiente eletroquímico (Pchitskaya et al., 2018).

1.4.1) Canais de cálcio dependentes de voltagem

Os canais de Ca²⁺ controlados por voltagem são categorizados de acordo com a sua resposta ao estímulo elétrico: canais ativados por alta voltagem (HVA, do inglês *high-voltage-activated*) que se abrem em resposta a grandes despolarizações da membrana, e canais ativados por baixa voltagem (LVA, do inglês *low-voltage-activated*) que são ativados por pequenas mudanças na voltagem da membrana próximas do potencial de repouso (Armstrong & Matteson, 1985; Bean, 1985).

Os canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem podem ser constituídos por no máximo quatro subunidades proteicas diferentes. A subunidade $\alpha 1$, responsável pela formação do poro do canal, bem como as subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$ e β (Figura 6A e 6B). A subunidade $\alpha 1$, que pode ser codificada por um dos 10 genes denominados *CACNA1* (Figura 6C), determina principalmente a cinética, a dependência de voltagem e a condutância do canal, e constitui o principal alvo farmacológico, embora muitas dessas propriedades possam ser moduladas pelas subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$ e β , que também possuem papéis significativos no tráfego dos canais para a membrana (Catterall et al., 2013).

Os canais de Ca²⁺ tipo L (Cav1.1 a Cav1.4), ativados por alta voltagem, são formados por subunidades $\alpha 1$ codificadas pelos genes *CACNA1S*, *C*, *D* e *F* (Figura 6C). Os canais do tipo P/Q, N e R (Cav2.1 a Cav2.3), também ativados por alta voltagem, são formados por subunidades $\alpha 1$ codificadas pelos genes *CACNA1A*, *B* e *E* (Figura 6C). Tanto os canais Cav1 com os Cav2 são formados pelo complexo $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$ e β . Já os canais do tipo T (Cav3.1 a Cav3.3), ativados por baixa voltagem e codificados pelos genes *CACNA1G*, *H* e *I* (Figura 6C), podem

formar canais funcionais utilizando apenas a subunidade α_1 , ou formar complexos com as outras subunidades ($\alpha_2\delta$ e β) (Heyes et al., 2015).

Figura 6. Estrutura e nomenclatura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. (A) Topologia esquemática das subunidades α_1 , $\alpha_2\delta$ e β dos canais de Ca^{2+} . A subunidade α_1 tem 24 segmentos transmembranares, compreendendo quatro domínios homólogos, rotulados como I-IV. Cada domínio possui seis segmentos transmembranares (S1-S6), incluindo o sensor de voltagem S4 (amarelo) e os segmentos de formação do poro S5-S6 (cinza). (B) Topologia 3D dos canais. (C) Nomenclatura dos canais de Ca^{2+} , incluindo os símbolos dos genes que codificam as subunidades α_1 , os nomes das proteínas (nomenclatura CaV) e as siglas usadas na descoberta fisiológica dos canais. HVA (*high voltage activated*) e LVA (*low voltage activated*) = definição clássica de canais com alta ou baixa voltagem de ativação (adaptado de (Proft & Weiss, 2015)).

Todas os dez tipos de subunidades α_1 compartilham uma topologia comum de quatro domínios principais, cada um contendo seis hélices que atravessam a membrana plasmática, denominados S1-S6, sendo que o segmento S4 carregado positivamente controla a ativação dependente de voltagem, e os segmentos S5 e S6 juntamente com uma “alça P” formam o sítio de seletividade do canal (Figura 6A) (Catterall, 2010). Cada uma das regiões da alça P contém resíduos de aminoácidos com carga negativa altamente conservados que cooperam para formar um poro que é altamente seletivo para

cátions, como Ca^{2+} (Ellinor et al., 1995; Tang et al., 2014). Sendo assim, a alça P constitui uma região muito importante para a fisiologia do canal.

Variantes patogênicas tanto de ganho como de perda de função em diferentes tipos de canais Ca^{2+} têm sido associadas a diversas doenças neurológicas como epilepsia, esquizofrenia, transtorno bipolar, deficiência intelectual, síndrome de Timothy (uma forma de autismo sindrômico) e TEA não sindrômico (Heyes et al., 2015). É interessante comentar os estudos realizados com NPCs e neurônios derivados de iPSCs de pacientes com Síndrome de Timothy, causada por variantes patogênicas de ganho de função no gene *CACNA1C*. Foram observadas nas NPCs e neurônios alterações na sinalização dependente de Ca^{2+} (Tian et al., 2014), na diferenciação neuronal (Paşca et al., 2011) e na plasticidade sináptica (Krey et al., 2013).

1.4.2) Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T e papel do gene *CACNA1H* em doenças neurológicas

A denominação de alguns dos subgrupos de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem é baseada nas características de resposta a estímulos elétricos. Por exemplo, os canais que permanecem abertos por períodos mais longos após serem estimulados foram classificados como “Tipo L” (*Long*, do inglês), e aqueles que apresentam respostas mais dinâmicas aos estímulos foram classificados com “Tipo T” (*Transiente*, do inglês) (Perez-reyes & Perez-reyes, 2003).

Para entender o papel dos canais de Ca^{2+} do tipo T em neurônios, é preciso compreender as principais características de sua eletrofisiologia. Dentre elas, o fato desses canais iniciarem a sua abertura após pequenas despolarizações na membrana plasmática (canais ativados por baixa voltagem, ou LVA). Durante um estímulo constante, o estado de ativação dos canais do tipo T é transitório, oscilando entre aberto e fechado constantemente, e sua inativação em estado estacionário ocorre em uma faixa de voltagem semelhante à da ativação. De fato, os canais do tipo T exibem uma “corrente janela”, isto é, existe uma pequena gama de voltagens na qual os canais do tipo T podem abrir, mas não inativam completamente (Figura 7). Esta propriedade pode ser

particularmente importante no controle dos níveis do Ca^{2+} intracelular livre (Bijlenga et al., 2000; Dreyfus et al., 2010; Perez-Reyes, 2003; Senatore & Spafford, 2012).

Figura 7. Biofísica de ativação e desativação dos canais de Ca^{2+} do tipo T (corrente janela). Representação esquemática das curvas de ativação e inativação no estado estacionário de um canal de Ca^{2+} do tipo T. A sobreposição entre as duas curvas dá origem a uma " corrente janela" (indicada em azul) (Adaptado de Bijlenga et al., 2000; Dreyfus et al., 2010; Perez-Reyes, 2003; Senatore & Spafford, 2012).

O influxo de Ca^{2+} nas células neuronais pode ocorrer por meio de estímulos, como nas sinapses, ou de forma espontânea, e ambas as formas são importantes para o neurodesenvolvimento. O influxo espontâneo de Ca^{2+} pode ocorrer mesmo antes da formação das conexões sinápticas em células neuronais maduras (Blankenship & Feller, 2010), e este fato denota a importância dos canais de Ca^{2+} do tipo T em células neurais precursoras, as NPCs. Neste tipo celular ainda não foram formadas conexões sinápticas maduras e o influxo de Ca^{2+} deve ocorrer majoritariamente de forma espontânea, e os canais do tipo T são os únicos que se ativem com um limiar de voltagem próximo ao potencial de repouso da membrana celular neuronal, como acima mencionado.

No sistema nervoso central, Cav3.2 é expresso predominantemente no hipocampo. Camundongos nocautes para *Cacna1h* apresentam anormalidades comportamentais que incluem ansiedade e déficits de memória (Gangarossa et al., 2014; Chung et al., 2015;). Em humanos, variantes de ganho de função em

CACNA1H, as quais levam a maior ativação do canal Cav3.2 ou a maior quantidade desse canal na membrana plasmática resultando em maior influxo de Ca^{2+} e maior excitabilidade nas células, já foram associadas à diferentes formas de epilepsia (Chen et al., 2003; Khosravani et al., 2004; Heron et al., 2007; Eckle et al., 2014; Rajakulendran & Hanna, 2016). Contudo, diversas dessas variantes não segregam com a doença em famílias afetadas, o que sugere que não sejam suficientes para sozinhas causar epilepsia.

Em 2006, Splawski e colaboradores descreveram pela primeira vez a presença de variantes de substituição de aminoácidos raras em *CACNA1H* em pacientes com TEA, onde 6 dentre 461 pacientes apresentavam variantes em regiões da proteína Cav3.2 conservadas evolutivamente. Contudo, grande parte dessas variantes estava também presente em membros não afetados da família dos pacientes, indicando que as variantes não são totalmente penetrantes e que variantes deletérias em outros loci podem ser necessárias para o desenvolvimento do TEA nos pacientes. Este mesmo estudo demonstrou por meio de experimentos de eletrofisiologia *in vitro* em um modelo de expressão heteróloga em células não neurais (com células HEK293) que os canais Cav3.2 mutados conduziam menos corrente que os canais selvagens e, por isso, as variantes identificadas nos pacientes com TEA foram denominadas de perda de função. Entretanto, duas dessas variantes localizadas no domínio S4 (sensível à voltagem) conferiam aos canais mutados menor taxa de desativação e, portanto, permitiram maior influxo de Ca^{2+} nas células. Assim, análises biofísicas mais detalhadas investigando o efeito de variantes encontradas no gene *CACNA1H* em pacientes com TEA ainda se fazem necessárias para a melhor compreensão do seu impacto na excitabilidade e no funcionamento de células neurais.

Um segundo trabalho cita uma variante sinônima no gene *CACNA1H* identificada em uma análise de cérebro *post-mortem* de pacientes com TEA (D’Gama et al., 2015), no qual não foram realizados estudos funcionais. Ainda, mais recentemente, estudos de sequenciamento do exoma completo de pacientes com TEA mostraram a presença de variantes de substituição de aminoácidos raras no gene *CACNA1H* em alguns pacientes (D’Gama et al., 2015; Iossifov et al., 2014, 2015; Takata et al., 2018). Contudo, não foram realizados estudos funcionais para comprovar o efeito funcional de tais variantes. É importante reforçar que variantes de risco em *CACNA1H* parecem sozinhas

não serem suficientes para causar TEA, e que variantes em outros loci sejam necessárias para a penetrância do transtorno nos pacientes, e esse modelo oligogênico de herança não havia ainda sido explorado.

1.5) Hipóteses do trabalho e desenho experimental

As hipóteses que orientaram este projeto são as seguintes: a variante rara c.2907+1 G>A identificada no gene *CACNA1H* no paciente F2688 é funcional, causa disfunção do canal Cav3.2 e entrada anormal de Ca^{2+} em células neurais derivadas do paciente, o que contribui para a disfunção da via mTORC1 e, conseqüentemente, para a disfunção da via da Relina (Figura 8). Como a via mTORC1 está envolvida no controle do tamanho e da proliferação de células neurais (Zhou et al., 2009; Feliciano et al., 2011; Magri et al., 2011; Martin et al., 2020), e tanto a via mTORC1 como a via da Relina estão envolvidas no controle da migração dessas células (Moon et al., 2015), julgamos também que células neurais derivadas do paciente F2688 devem apresentar tamanho, proliferação e migração alteradas, o que deve contribuir para a patofisiologia do TEA no paciente.

Figura 8. Representação esquemática das hipóteses do presente trabalho. A variante identificada no gene *CACNA1H* no paciente F2688 é funcional, leva ao influxo de Ca^{2+} anormal e hiperativa a via de sinalização de mTORC1 (visualizada pelo aumento na fosforilação da proteína RPS6) nas células neurais derivadas desse paciente. Além disso, a sinalização mTORC1 superativada, por sua vez, contribui para a diminuição da atividade da via de sinalização da Relina (visualizada pela diminuição da fosforilação das proteínas DAB1, FYN e SRC), e para alterações no tamanho, proliferação e migração dessas células. Portanto, nossa hipótese central é que existe uma interferência ou *crosstalk* anormal entre os genes *RELN* e *CACNA1H* mutados por meio da via de sinalização mTORC1 em um modelo de herança oligogênica para o TEA.

Para testar essas hipóteses, propusemos utilizar como modelo experimental NPCs derivadas de iPSCs do paciente F2688 e de 4 indivíduos controles pareados por sexo e idade com o paciente para comparação (Figura 4). Propusemos realizar estudos funcionais diversos com essas células, todos direcionados para a atividade do canal Cav3.2 e das vias mTORC1 e da Relina. Ainda, por meio de uma estratégia complementar, propusemos também clonar o cDNA do gene *CACNA1H* tanto selvagem como mutado (contendo a variante presente no paciente F2688) em um vetor de expressão em células de mamíferos, para assim poder superexpressar as proteínas Cav3.2 correspondentes em células HEK293T e poder analisar alterações no influxo de Ca^{2+} e na funcionalidade das vias mTORC1 e da Relina que possam estar exclusivamente relacionadas ao canal Cav3.2 mutado (modelo de expressão heteróloga).

Por fim, julgamos que seria interessante verificar se, assim como o paciente F2688, outros pacientes com TEA também apresentam co-ocorrência de variantes raras e potencialmente deletérias em genes da via da Relina e de canais de Ca^{2+} em um modelo oligogênico de herança. Para isso, propusemos analisar, em colaboração com a aluna de iniciação científica Gabriela da Silva Campos do grupo da Dra. Maria Rita Passos Bueno (IB-USP), os dados do sequenciamento do exoma completo de outros 100 pacientes com TEA e seus genitores.

1.6) Objetivos

1.6.1) Objetivos gerais

a) Verificar se a variante rara identificada no gene *CACNA1H* no paciente F2688 é funcional, leva a alterações no influxo de cálcio, na atividade das vias de sinalização mTORC1 e da Relina, e no tamanho, proliferação e migração de células neurais derivadas desse paciente e, deste modo, atua em um modelo oligogênico de herança para o TEA.

b) Verificar se variantes raras e potencialmente deletérias em genes da via da Relina e de canais de cálcio são observadas simultaneamente em outros pacientes com TEA em um modelo oligogênico de herança.

1.6.2) Objetivos específicos

a) Verificar se células neuroprogenitoras derivadas do paciente F2688 apresentam níveis alterados de expressão gênica e proteica de *CACNA1H* / Cav3.2;

b) Verificar se células neuroprogenitoras derivadas do paciente F2688 apresentam alterações no influxo de cálcio;

c) Verificar se a hiperatividade da via mTORC1 e a deficiência da via da Relina observadas nas células neuroprogenitoras derivadas do paciente F2688 estão associadas à alteração da funcionalidade do canal Cav3.2;

d) Verificar se células neuroprogenitoras derivadas do paciente F2688 apresentam alterações no tamanho e na proliferação;

e) Verificar se células neuroprogenitoras derivadas do paciente F2688 apresentam migração alterada;

f) Verificar se as possíveis alterações observadas no tamanho, proliferação e migração das células neuroprogenitoras derivadas do paciente F2688 são derivadas ao mal funcionamento do canal Cav3.2, à hiperatividade da via mTORC1 e/ou à deficiência da via da Relina.

- g)** Verificar se células HEK293 superexpressando *CACNA1H* mutado (com a variante rara presente no paciente F2688) apresentam alteração no influxo de cálcio e na atividade das vias mTORC1 e da Relina (comprovação dos resultados em um modelo de expressão heteróloga).
- h)** Verificar em uma amostra de 100 pacientes com TEA e seus genitores a ocorrência de variantes raras e potencialmente deletérias em genes da via da Relina e de canais de cálcio.

CAPÍTULO 2– MATERIAIS E METODOS

CAPÍTULO 2– MATERIAIS E METODOS

2) MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) Pacientes com Transtorno do Espectro Autista, indivíduos controles e análises genéticas

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB – USP) e do Hospital Israelita Albert Einstein. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os cuidadores dos pacientes com TEA após receberem informações sobre o estudo. Todos os pacientes e indivíduos controles avaliados nos estudos funcionais com células tinham idades entre 6 e 12 anos no momento da coleta de seu material biológico, são meninos brasileiros brancos e não relacionados. Todos os pacientes foram diagnosticados por psiquiatras usando os critérios definidos no DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2000), e entrevistas semiestruturadas administradas aos pais ou cuidadores, como CARS (do inglês, *Childhood Autism Rating Scale*). Os pacientes também foram submetidos ao teste de QI (*Wechsler Intelligence Scale for Children-III*, WISC-III) sempre que possível. De acordo com os padrões de pontuação do CARS, os pacientes F2688 (pontuação 30,5; QI 110) e F10832 (pontuação CARS 31,0) exibem TEA leve a moderado. Macrocefalia foi observada no paciente F2688 durante exame físico aos 17 anos de idade (PC = 61 cm).

Todas as análises genéticas realizadas nos pacientes estão descritas previamente (Sánchez-Sánchez et al., 2018; da Silva Montenegro et al., 2019; Griesi-Oliveira et al., 2020; Satterstrom et al., 2020) e não fazem parte do trabalho desenvolvido por este projeto de mestrado. Contudo, aqui está apresentada uma descrição sucintamente das análises realizadas. Síndrome do X Frágil foi excluída pela análise por PCR. Não foram detectadas alterações cromossômicas por cariotipagem convencional. As CNVs nas regiões 15q11-q13, 16p11 e 22q13 também foram excluídas (kit Salsa MLPA P343-B1 Autism-

1). O sequenciamento do exoma completo a partir de DNA genômico isolado do sangue periférico dos pacientes e seus pais foi realizado usando os kits Nextera Rapid Capture Expanded da Illumina (para preparação da biblioteca e captura de exoma) e o equipamento Illumina HiSeq 2500 System, de acordo com as instruções do fabricante. Foi alcançada uma cobertura média no alvo de 60x. As leituras foram alinhadas à sequência de referência UCSC Genome Browser hg19 com o Alinhador Burrows-Wheeler (BWA), e o processamento de dados e a chamada de variantes foram realizados com as ferramentas Picard e o Genome Analysis Toolkit (GATK). As variantes foram filtradas para uma frequência inferior a 0,01 nos bancos de dados dbSNP, 1000 genomas, *The Genome Aggregation Database* (gnomAD) e *Online Archive of Brazilian Mutations* (ABraOM; Naslavsky *et al.*, 2017). O potencial de patogenicidade foi averiguado utilizando programas de predição como *PolyPhen*, *SIFT*, *Mutation Taster*, *Human Splicing Finder* e *CADD*. Este último método foi usado para pontuar as variantes raras identificadas em genes candidatos ao TEA nos pacientes F2688 e F10832. Na Tabela suplementar 1 estão listados os genes que codificam componentes da via de sinalização da Relina e canais de Ca²⁺ que foram analisados no grupo de 100 pacientes com TEA e seus genitores.

2.2) Cultivo de células neuroprogenitoras

Todas as amostras de células neuroprogenitoras (NPCs) utilizadas neste estudo foram previamente diferenciadas de iPSCs, conforme descrito em Sánchez-Sánchez *et al.* (2018) e Griesi-Oliveira *et al.* (2020). As NPCs foram mantidas em monocamada em placas revestidas com 10 µg/mL de poli-ornitina (Sigma) e 5 µg/mL de laminina (ThermoFisher) em meio NPC [(DMEM-F12; 0,25x N2; 0,5x B27; 20 ng/mL de FGF (ThermoFisher) e 20 ng/mL de EGF (Peprotech)]. NPCs derivadas de 2 clones de iPSC do paciente F2688 e 1 ou 2 clones de iPSC dos outros indivíduos (n = 4 indivíduos controles) foram usados em todas os experimentos aqui descritos.

2.3) Extração de RNA, síntese de cDNA, PCR convencional e PCR quantitativo (qPCR)

Células neuroprogenitoras foram cultivadas em monocamada sob condições normais de cultura em placas de 6 cm até atingirem uma confluência de 90%. O RNA total foi extraído das células com auxílio do kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas por espectrofotometria com o auxílio do aparelho NanoDrop (Nanovue). A síntese de cDNA das amostras com pureza adequada foi realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit SuperScript® III (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. Reações de PCR convencional foram realizadas para amplificação da região do gene *CACNA1H* contida entre os éxons 12 e 15 utilizando 60ng cDNA derivado de NPCs do paciente F2688 e de indivíduos controles para comparação. Reações de PCR quantitativo (qPCR, ou PCR em tempo real) foram realizadas com ensaios TaqMan comerciais (ThermoFisher) para quantificar a expressão dos genes *CACNA1H* (Hs01103527_m1) e *HMBS* (Hs00609296_g1; este usado como controle endógeno) utilizando 60 ng de cDNA derivados de NPCs do paciente F2688 e de indivíduos controles, e foram conduzidas no termociclador QuantStudio 6 (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada pelo método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$), utilizando como Ct referência o Ct do gene endógeno.

2.4) Clonagem do fragmento de cDNA do gene *CACNA1H* que contém a variante presente no paciente F2688; cultivo e transfecção de células HEK293T

O plasmídeo a1Ha-pcDNA3 (plasmídeo # 45809, Addgene), que contém o cDNA completo do gene *CACNA1H* humano selvagem, foi adquirido comercialmente. Para clonar a variante presente no paciente F2688 no plasmídeo a1Ha-pcDNA3, amostras de cDNA do paciente F2688 foram utilizadas para amplificar por PCR convencional a região do *CACNA1H* contendo a inserção de 156 nucleotídeos correspondentes ao íntron 13 do gene. As

reações de PCR foram conduzidas utilizando uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum SuperFi DNA Polymerase, ThermoFisher) e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos contendo sítios para enzimas de restrição (NotI e BsrGI) em suas extremidades. Após purificação do produto de PCR e digestão com essas enzimas, o fragmento de interesse foi inserido no plasmídeo a1Ha-pcDNA3 (entre os exons 12 e 13) previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilado com o auxílio da enzima fosfatase alcalina (New England Biolabs) para impedir recircularização do plasmídeo sem inserto. Após a clonagem, o plasmídeo contendo a inserção de interesse foi sequenciado pela metodologia de Sanger para comprovar a integridade da sequência.

Células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* (DMEM-HG) suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina / estreptomicina) (ThermoFisher). Uma vez atingida uma confluência de cerca de 70%, as células foram transfectadas com os plasmídeos a1Ha-pcDNA3-selvagem, a1Ha-pcDNA3-mutado ou pcDNA3-vazio (controle negativo) com a ajuda do reagente Lipofectamine™ 3000 (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. Depois disso, as células foram cultivadas por mais 48 horas antes da coleta do RNA e das proteínas totais. A comprovação da superexpressão da proteína de interesse nas células HEK293T foi feita por RT-qPCR (uma vez que o uso de diferentes anticorpos comerciais contra Cav3.2 não ofereceu resultados satisfatórios, mesmo após diversas tentativas conforme descrito abaixo).

2.5) Medida do influxo de cálcio extracelular (ensaio de leitor de placa de imagem fluorométrica, FLIPR)

Os ensaios de influxo de cálcio (Ca²⁺) foram realizados com o kit FLIPR Calcium 4 Assay (Molecular Devices Corp.), seguindo as instruções do fabricante. Suscintamente, as células de interesse (NPCs do paciente F2688 e dos indivíduos controles ou células HEK293T transfectadas) foram semeados na densidade de 3-5x10⁴ células/poço em placas pretas de 96 poços de fundo transparente previamente tratados com 10 µg/mL de poli-ornitina (Sigma) e 5

µg/mL de laminina (ThermoFisher), e foram cultivadas em 100 µL de meio de crescimento apropriado para cada tipo celular. Após 48 horas, as células foram incubadas com o kit Calcium Assay contendo probenecida 2,5 mM (Molecular Devices Corp.) (em um volume final de 200 µL/poço) por 60 minutos a 37°C. Antes do imageamento do Ca²⁺ intracelular, as células foram incubadas com veículo (DMSO) ou com o inibidor de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo T NNC 55-0396 dihydrochloride (Tocris Bioscience) por 30 min (ver abaixo). A fluorescência das amostras foi excitada a 485 nm e a fluorescência emitida detectada a 525 nm. As medidas de fluorescência foram realizadas durante 200 segundos em intervalos de 1,65 segundos. Após 15 segundos de monitoramento da fluorescência basal, as células foram desafiadas com 100 mM de KCl (determinado pelo valor da curva dose-resposta ao KCl), e as medições de influxo de Ca²⁺ foram monitoradas. As respostas à adição de KCl foram determinadas subtraindo a intensidade da fluorescência basal do valor de pico da fluorescência durante a resposta usando o software SoftMax2Pro (Molecular Devices Corp.). Dez replicatas técnicas foram realizadas para as células HEK293T e três replicatas técnicas para as NPCs em cada um de dois experimentos independentes. Os dados foram plotados como média ± erro padrão.

2.6) Preparação de meio enriquecido com Relina

A preparação do meio enriquecido com Relina do tipo selvagem foi realizada conforme descrito anteriormente (Sánchez-Sánchez et al., 2018). Resumidamente, células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo contendo o cDNA completo do gene *Reln* de camundongo (pCrI; gentilmente cedido pelo Dr. Tom Curran) ou com o vector pcDNA3-vazio (controle negativo) utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine™ 3000 (ThermoFisher). Depois disso, as células foram cultivadas por mais 48 horas antes da coleta dos meios condicionados, que foram centrifugados para remoção de células e detritos e concentrados 8x usando os dispositivos de filtro Amicon® Ultra 15 mL 100k (Millipore). O meio enriquecido com Relina ou o meio controle (*mock*, das

células transfectadas com o vetor vazio) foram então adicionados ao meio completo de NPCs antes do uso nos ensaios de proliferação e migração.

2.7) Tratamento das células com NNC 55-0396, rapamicina ou Relina selvagem

Amostras de NPCs do paciente F2688 e de indivíduos controles, bem como células HEK293T transfectadas, foram cultivadas na presença de veículo (DMSO) ou 10 μ M do bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo T NNC 55-0396 dihydrochloride (Tocris Bioscience) por 30 min antes da extração das proteínas totais para análise de western blot ou medições do influxo extracelular de Ca^{2+} . Para os ensaios de proliferação e migração, as NPCs foram cultivadas na presença de veículo (DMSO), ou 1 μ M de NNC 55-0396 dihydrochloride, ou 100 nM de rapamicina (Sigma Aldrich), ou meio enriquecido com Relina selvagem ou meio controle (mock) durante todo o curso dos experimentos.

2.8) Extração de proteínas totais e western blot

Para experimentos de western blot, extratos de proteínas totais das amostras de células (NPCs do paciente F2688 e dos indivíduos controles e células HEK293T transfectadas) foram obtidos utilizando o tampão RIPA (Sigma Aldrich) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (1:100; Sigma Aldrich). A quantificação das proteínas foi feita com auxílio do kit BCA (ThermoFisher), seguindo instruções do fabricante. Cerca de 20 μ g de proteínas totais foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (GE HealthCare), que foram bloqueadas e incubadas durante a noite à 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-DAB1 (1:200, sc-271136 Santa Cruz Biotechnology); anti-pRPS6-S240/244 (1:2500, #5364 Cell Signaling Technology); anti-pSRC-Tyr416 (1:1000, #2101, Cell Signaling Technology); anti-SRC (1:5000, #2123 Cell Signaling Technology) e β actin (1:10000, A2228 Sigma Aldrich) para o controle da quantidade carregada de proteína em cada gel. Além disso, os seguintes anticorpos primários foram utilizados na tentativa de se detectar níveis endógenos de proteína Cav3.2 em NPCs e outros tipos de

células (como células Hela, iPSCs, neurônios derivados de iPSCs e células HEK293T transfectadas com a1Ha-pcDNA3) mas, apesar de várias tentativas, nenhum deles funcionou corretamente: ab135974 e ab128251 (Abcam), sc-377510 (Santa Cruz Biotechnology). A detecção foi realizada usando anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo acoplados à enzima peroxidase (HRP, do inglês *horseradish peroxidase-coupled*) (1:2000, #7074 ou #7072 Cell Signaling Technology), substrato ECL (Bio-Rad) e o sistema de imagem ChemiDoc™ MP (Bio-Rad). A intensidade das bandas foi determinada por densitometria usando o Image Lab Software (Bio-Rad). Os resultados mostrados são de dois experimentos independentes.

2.9) Mensuração do tamanho celular

As amostras de NPCs foram semeadas em placas de 12 poços revestidas com poli-ornitina e laminina na densidade de 1×10^5 células por poço e cultivadas em meio completo de NPCs por 24 horas. A placa foi fotografada sob contraste de fase usando o sistema IncuCyte® (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI). A medida do tamanho do corpo celular foi realizada usando o software NeuroTrack da IncuCyte. Cada condição experimental foi realizada em duplicata, e o gráfico mostra as médias de cada grupo e o desvio-padrão. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

2.10) Análise da proliferação celular

As amostras de NPCs foram semeadas em duplicatas em placas de 12 poços revestidas com poli-ornitina e laminina na densidade de 1×10^5 células por poço e cultivadas em meio completo de NPCs. Após 24 (Dia 0), 48 (Dia 1) e 72 (Dia 2) horas em cultura, as células foram ressuspensas usando tripsina, misturadas ao azul de tripan (diluição 1:1) e contadas com auxílio do contador automático de células Countess® (Invitrogen). Cada condição experimental foi realizada em duplicata, e o gráfico mostra as médias de cada grupo e o desvio-padrão. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

2.11) Análise da migração celular (*scratch-wound healing assay*)

As amostras de NPCs foram semeadas em placas de 96 poços revestidas com poli-ornitina e laminina na densidade de $3,5 \times 10^4$ células por poço, e cultivadas até a confluência em meio completo de NPCs. O meio foi então substituído por DMEM-F12 (sem FGF e EGF) e, com auxílio do WoundMaker de 96 poços (Essen Bioscience), foi realizada uma ferida na monocamada de células. O fechamento da ferida foi monitorado e quantificado com auxílio do sistema IncuCyte® (Essen Bioscience), e os dados foram analisados usando uma métrica integrada da densidade celular relativa na área da ferida. A densidade relativa da ferida foi definida como a densidade celular na área da ferida expressa em relação à densidade celular fora da área da ferida ao longo do tempo. Cada condição experimental foi realizada em 6 poços replicados, e o gráfico mostra as médias de cada grupo e o desvio-padrão. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

2.12) Construção dos modelos tridimensionais e predição de sítios de splicing

Os modelos estruturais das proteínas Cav3.2 selvagem e mutada foram construídos com o servidor on-line I-Tasser (Yang e Zhang, 2015). Como o programa não aceita grandes sequências de aminoácidos para modelagem, três conjuntos de modelos para cada uma das proteínas foram construídos usando os aminoácidos correspondentes aos domínios I-II, II-III e III-IV. Modelos estruturais completos foram então montados após a sobreposição dos três conjuntos de modelos nas coordenadas estruturais do complexo do canal de sódio com tensão controlada NavPaS da *American cockroach Periplaneta americana* (código PDB 6A91) usando a ferramenta de correspondência de estruturas secundárias (Krissinel e Henrick, 2004) em Coot v.0.8.2 (Emsley, 2004). Os modelos do receptor VLDLR selvagem e mutado foram construídos com base nas coordenadas estruturais do receptor LDLR humano (PDB 1n7d) usando com o servidor on-line Modeller v9.24, e o modelo estrutural do complexo

PCSK9:EGF-A (PDB 3m0c) foi utilizado para analisar os efeitos da variante p.Tyr378His. Pymol (DeLano, 2002) foi utilizado para criar as figuras / modelos estruturais e calcular os potenciais eletrostáticos de superfície. Gráficos de valores de hidrofobicidade das sequências de aminoácidos dos canais selvagem e mutado foram produzidos usando ExPASy ProtScale (Kyte & Doolittle, 1982). A predição dos sítios de *splicing* foi realizada usando a ferramenta **Human Splicing Finder** (<http://www.umd.be/HSF/>).

2.13) Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando os modelos lineares de efeito misto no pacote lme4 para a versão R 3.4.1 para explicar a dependência entre as réplicas biológicas (quando NPCs derivadas de diferentes clones iPSCs do mesmo indivíduo foram utilizadas) e as réplicas técnicas independentes por indivíduo ou grupo. As comparações pareadas entre os grupos de tratamento (NNC 55-0396 ou rapamicina versus veículo e meio condicionado com Relina versus meio mock controle) foram realizadas usando o teste t pareado no GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Nas Figuras estão apenas mostrados os valores de p obtidos com as análises das NPCs derivadas do paciente F2688 ou do vetor MUT-a1Ha.

CAPÍTULO 3 – Artigo Científico

CAPÍTULO 3– ARTIGO CIENTIFICO

Rare *CACNA1H* and *RELN* variants act in concert through mTORC1 pathway in an oligogenic model of inheritance for autism spectrum disorder

Teles e Silva AL^{1,2}; Glaser T³, Griesi-Oliveira K¹, Corrêa J³, Ulrich H³, Balan A⁴, Gabriele da Silva Campos², Passos-Bueno MR², Sertié AL¹.

1. Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil; 2. Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; 3. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; 4. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Analysis of rare genetic variants in autism spectrum disorder (ASD) cohorts has found in a fraction of patients evidence of an oligogenic mode of inheritance, in which two or more mutated genes, individually not sufficient to cause ASD, may act additively or synergistically to produce the clinical phenotype. However, currently little is known about how these ASD-risk variants interact with each other and converge on specific neurobiological pathways underlying ASD. Here, we describe the molecular characterization of a de novo splice site variant in the *CACNA1H* gene, which encodes the voltage-gated calcium (Ca²⁺) channel CaV3.2, identified in an ASD patient who also carries previously characterized disruptive missense variants in the Reelin (*RELN*) gene. Using induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived neural progenitor cells (NPCs) from this patient and from control individuals as well as a heterologous expression system, we show that the variant in *CACNA1H* is deleterious and leads to increased Ca²⁺ influx into the cells, which overactivates mTORC1 signaling pathway and, consequently, further exacerbates the impairment of

Reelin signaling. Also, we showed that overactivation of mTORC1 signaling induced by elevated Ca²⁺ influx through mutant Cav3.2 acts individually to induce enhanced proliferation of patient's NPCs and in concert with impaired Reelin signaling to cause abnormal migration of these cells. Finally, using whole exome sequencing data from a new cohort of 100 ASD proband-parent trios, we describe potentially damaging variants in the *VLDLR* and *CACNA2D4* genes, which encode for the Reelin receptor and the Ca²⁺ channel auxiliary $\alpha_2\delta_4$ subunit respectively, in one patient with ASD. Altogether, our results suggest an abnormal functional connectivity between mutated *CACNA1H* and *RELN* genes, and also the nonrandom co-occurrence of rare and potentially damaging variants in genes for the Reelin pathway and Ca²⁺ channels, which may act additively to increase the risk for ASD.

INTRODUCTION

High throughput microarray and sequencing platforms have revealed that the genetic susceptibility to autism spectrum disorder (ASD) is shaped by rare and common variants and varies from one individual to another. While in a few cases a single rare genetic variant with large effect appears sufficient to cause ASD (Iossifov *et al.*, 2014; Rubeis, He, Goldberg, Poultney, & Samocha, 2014; Yuen *et al.*, 2017), in most cases the genetic landscape of the disease is much more complex and involves thousands of common risk alleles, individually of small effect but collectively conferring susceptibility above a threshold of liability (Gaugler *et al.*, 2014; Autism Spectrum Disorders Working Group of the Psychiatric Consortium, 2017; Wiener *et al.*, 2017; Grove *et al.*, 2019). In addition, in several individuals with ASD the clinical outcome seem to be the result of the joint combination of more than one rare low-penetrance variant in an oligogenic (≥ 2 hits) model of inheritance (Girirajan *et al.*, 2010; Leblond *et al.*, 2012; Chilian *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2019; Pizzo *et al.*, 2019). Therefore, a key step in understanding the neurobiological basis of ASD is to decipher the genetic interactions between ASD-risk variants. However, the additive or epistatic interactions of these moderate-risk alleles are still largely unexplored.

Recently, through whole exome sequencing (WES) and CGH-array of 30 Brazilian ASD proband–parent trios, we have identified in one patient with autism and macrocephaly, referred to as F2688, rare compound heterozygous missense

variants in the *RELN* gene and a *de novo* splice site variant in the *CACNA1H* gene (Sánchez-Sánchez et al., 2018; da Silva Montenegro et al., 2020; Griesi-Oliveira et al., 2020). The *RELN* gene encodes Reelin, a large secreted glycoprotein that controls neuronal migration and plasticity of synapses (Jossin & Goffinet, 2007; G. H. Lee & D’Arcangelo, 2016). The *CACNA1H* gene encodes the $\alpha 1$ -subunit of the T-type low voltage dependent calcium (Ca^{2+}) channel Cav3.2, known to control neuronal excitability (Leresche & Lambert, 2017; Weiss & Zamponi, 2020). Although rare heterozygous variants have been identified in both *RELN* and *CACNA1H* genes in ASD patients (Splawski et al., 2006; Iossifov et al., 2014; Lammert et al., 2016, 2017), several of them did not segregate with the disease in the affected families and seem to be low penetrance variants that predispose to ASD, requiring additional genetic, epigenetic or environmental factors to cause the clinical phenotype.

Using induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived neural progenitor cells (NPCs) from patient F2688, we have previously shown that the variants identified in the *RELN* gene are deleterious and lead to diminished Reelin secretion and impaired Reelin signal transduction. Also, our results suggested that mTORC1 signaling is overactivated in F2688 NPCs and contributes to downregulation of the Reelin cascade (Sánchez-Sánchez et al., 2018). However, the underlying molecular mechanisms of mTORC1 signaling hyperfunction remain unknown. Because mTORC1 signaling pathway can be regulated by intracellular Ca^{2+} levels (Gulati et al., 2008; Li et al., 2016), in this study we sought to verify whether the variant identified in the *CACNA1H* gene in patient F2688 function as a ‘second hit’, leading to changes in Ca^{2+} influx and contributing to overactivation of the mTORC1 pathway and to downregulation of the Reelin signaling in patient-derived neuronal cells. We also sought to investigate whether the *CACNA1H* variant acts additively with the *RELN* variant to cause abnormal neuronal cell phenotypes.

RESULTS

A *de novo* heterozygous splice site variant in the *CACNA1H* gene identified in patient F2688 causes intron retention in the mature transcript

WES and CGH-array data were obtained from patient F2688 and his parents (Sánchez-Sánchez et al., 2018; da Silva Montenegro et al., 2020; Griesi-Oliveira et al., 2020). By intersecting rare variants in F2688 with the lists of ASD risk genes (Sfari database, <https://www.sfari.org>), the most likely-damaging variants we identified in patient F2688 were the previously characterized compound heterozygous missense variants in exon 48 of the *RELN* gene (NM_005045.3: c.7538C>G, p.Ser2513Cys and c.7634C>T, p.Ala2545Val) (Sánchez-Sánchez et al., 2018), and a *de novo* heterozygous splice donor site variant in intron 13 of the *CACNA1H* gene (NM_001005407:c.2907+1 G>A). This variant was absent from the population databases (gnomAD, 1000GP, ABRAOM), has a CADD score of 23.6, and is predicted to inactivate the 5' splice site of intron 13, which is only 156 pb long, causing the retention of this intron in the mature *CACNA1H* mRNA. Because the retained intron does not cause a frameshift in the *CACNA1H* gene coding sequence, it is expected to introduce an in-frame insertion of 52 novel amino acid residues in the pore forming region of the Cav3.2 channel.

First, we investigated whether the removal of intron 13 from the pre-mRNA of the *CACNA1H* gene was indeed abnormal in neuronal cells derived from patient F2688 by RT-PCR and Sanger sequencing using cDNA samples from iPSC-derived NPCs from patient F2688 and from control individuals. We observed, as expected, that the PCR band corresponding to the wild-type allele (370 bp long) is present in all NPC samples, whereas the band corresponding to the mutant allele (526 pb long due to retention of intron 13 in the mature transcript) is only present in F2688 NPCs (Figure 1A-C).

We next sought to examine whether the expression levels of *CACNA1H* gene was altered in NPCs derived from F2688 by RT-qPCR. We observed no significant change in the transcript levels of *CACNA1H* in F2688 NPCs compared to control NPCs (Figure 1D).

Figure 1. Splice donor site variant in intron 13 of the *CACNA1H* gene in patient F2688 results in retention of the entire intron in the mature mRNA. (A) Schematic representation of intron 13 retention in the *CACNA1H* transcript showing the locations of primers for RT-PCR. The PCR band corresponding to the wild-type allele is 370 bp long, whereas the band corresponding to the mutant allele is 526 bp long due to retention of intron 13 in the mature transcript. (B) Representative image of agarose gel electrophoresis showing RT-PCR products. The 526 bp PCR product of the mutant allele is only observed in F2688-derived NPCs (n = 2 iPSC clones-derived NPCs). (C) Sanger sequencing of the cloned 526 bp PCR band confirmed intron 13 retention in the *CACNA1H* transcript. (D) The relative transcription levels of *CACNA1H* are not changed in F2688-derived NPCs (n = 2 iPSC clones-derived NPCs) compared with control NPCs (Controls, n = 4).

Calcium influx through the mutant Cav3.2 channel is increased and induces exaggerated mTORC1 signaling in F2688-derived neural progenitor cells

To assess the functional impact of the 52-amino acid insertion on Cav3.2 channel activity, we measured the influx of extracellular Ca^{2+} in F2688- and control-derived NPCs. We found that F2688 NPCs show significantly increased Ca^{2+} influx after depolarization compared with control NPCs, which was abolished by treatment with the T-type Ca^{2+} channels blocker NNC 55-0396 dihydrochloride

(Figure 2A). These results suggest that the identified variant in the pore region of Cav3.2 allows greater Ca^{2+} influx into NPCs derived from patient F2688.

Next, we sought to verify whether the mTORC1 signaling overactivation previously observed in F2688 NPCs (Sánchez-Sánchez et al., 2018) is due to greater influx of Ca^{2+} into cells via the mutant Cav3.2 channel. We treated F2688 and control NPCs with NNC 55-0396 dihydrochloride and analyzed the phosphorylation status of RPS6, a downstream target of the mTORC1 pathway. We observed that whereas vehicle-treated F2688 NPCs showed, as expected, elevated levels of pRPS6, the blockade of T-type Ca^{2+} channels significantly reduced pRPS6 expression in F2688 NPCs to levels similar to the untreated control NPCs (Figure 2B). These results suggest that the enhanced Ca^{2+} entry into F2688 NPCs through the mutant Cav3.2 channel causes excessive mTORC1 signaling activity in these cells.

Increased calcium influx through the mutant Cav3.2 channel contributes to impaired Reelin signaling in F2688-derived neural progenitor cells

To test the hypothesis that the exaggerated mTORC1 signaling activation due to increased influx of Ca^{2+} through the mutant Cav3.2 channel in F2688 NPCs contributes to the impaired Reelin signaling also observed in these cells, we treated F2688 and control-derived NPCs with NNC 55-0396 dihydrochloride and analyzed the phosphorylation levels of SRC and DAB1, downstream targets of Reelin. We found that whereas vehicle-treated F2688 NPCs showed, as expected, decreased expression of pSRC and pDAB1 (Sánchez-Sánchez et al., 2018), the T-type Ca^{2+} channels blocker significantly improved the abnormal pSRC-pDAB1 axis in these cells (Figure 2B). These results support our hypothesis of an abnormal crosstalk between *CACNA1H* and *RELN* variants, showing that the mutant Cav3.2 channel further exacerbates impaired Reelin signaling in F2688 NPCs through the overactivation of mTORC1 signaling pathway.

Figure 2. Increased Ca²⁺ influx through the mutant Cav3.2 channel causes exaggerated mTORC1 signaling in F2688-derived NPCs, which, in turn, contributes to impaired Reelin signaling in these cells. (A) Average intracellular Ca²⁺ measurements in F2688-derived NPCs (NPCs derived from 2 iPSC clones) and in control-derived NPCs (n = 4) depolarized with 100mM KCl and cultured in the absence (vehicle) or presence (+) of 10uM of the T-type Ca²⁺ channels blocker NNC 55-0396 dihydrochloride (NNC). F2688 NPCs show significantly increased Ca²⁺ influx compared with control NPCs, which was rescued by treatment with NNC. **(B)** Representative immunoblots showing the expression levels of pRPS6, pSRC, SRC, pDAB1, DAB1 and β-actin (used as loading control) in F2688-derived NPCs (NPCs derived from 2 iPSC clones) and in control-derived NPCs (n = 4) cultured in the absence (-) or presence (+) of 10uM of NNC. The bar graph shows the average levels and SD of normalized pRPS6, pSRC and pDAB1 for each group. While F2688-derived NPCs cultured in the absence of NNC show elevated levels of pRPS6 and diminished levels of pSRC and pDAB1, treatment with NNC significantly rescued these abnormalities.

Exaggerated mTORC1 signaling induced by elevated Ca²⁺ influx through mutant Cav3.2 causes enhanced proliferation of F2688-derived neural progenitor cells

Hyperactivation of mTORC1 signaling by mutations in either the *Tsc1* or *Tsc2* gene has been associated with increased size and number of neuronal cells in tuberous sclerosis complex (TSC) mouse and *in vitro* cellular models (Zhou et

al., 2009; Feliciano et al., 2011; Magri et al., 2011; Martin et al., 2020). Therefore, we sought to determine whether elevated mTORC1 signaling activity in F2688-derived NPCs due to increased Ca^{2+} entry through the mutant Cav3.2 channel leads to changes in the size and proliferation rates of these cells. While no significant differences were observed between the soma size of control- and F2688-derived NPCs (Figure 3A), F2688 NPCs show significantly higher proliferation rates compared with control NPCs, which were completely rescued by treatment with either rapamycin, or dihydrochloride NNC 55-0396, or rapamycin plus wild-type Reelin. On the other hand, treatment with wild-type Reelin alone had no effect on the proliferation of F2688 NPCs (Figure 3B). These results suggest that mutant Cav3.2-mediated hyperfunction of mTORC1 signaling acts independently of defective Reelin signaling to cause enhanced proliferation of F2688 NPCs.

Abnormal Cav3.2 and Reelin act in concert through mTORC1 pathway to induce aberrant migration of F2688-derived neural progenitor cells

It has been previously shown that impaired Reelin signaling due to constitutive activation of the mTORC1 signaling pathway plays an important role in abnormal neuronal migration and positioning in the TSC knockout mouse model (Moon et al., 2015). Therefore, we next sought to investigate whether the elevated mTORC1 signaling activity in F2688-derived NPCs due to increased Ca^{2+} entry via the mutant Cav3.2 channel could act additively with impaired Reelin signaling to affect the migration pattern of these cells. Using the wound healing assay, we observed that NPCs derived from patient F2688 show significantly higher migration rates compared with control NPCs, which were significantly attenuated by treatment with either rapamycin, or dihydrochloride NNC 55-0396, or wild-type Reelin. In addition, we observed that concomitant treatment of F2688 NPCs with rapamycin plus wild-type Reelin was the only treatment condition that significantly rescued the abnormal migration pattern of these cells to levels equal to those of the untreated control NPCs, i.e., there was no statistically significant difference between the two groups. (Figure 3C). These findings suggest that overactivation of mTORC1 signaling induced by elevated Ca^{2+} influx through mutant Cav3.2 indeed act additively with deficient Reelin signaling in the abnormal migration of F2688 NPCs.

Figure 3. Mutant Cav3.2-mediated hyperfunction of mTORC1 signaling acts alone to cause enhanced proliferation of F2688-derived NPCs and additively with impaired Reelin signaling in the abnormal migration of these cells. (A) Representative phase-contrast microscopy photographs of control- and F2688-derived NPCs. The bar graph shows the average cell body size of control-derived NPCs (n = 4) and F2688-derived NPCs (NPCs derived from 2 iPSC clones). There were no significant differences in mean soma size between the groups. **(B)** Line graph showing cell proliferation curves (live cell numbers at 0h, 48h, 72h) of control-derived NPCs (n = 4) and F2688-derived (NPCs derived from 2 iPSC clones) cultured in the presence of either vehicle, 1 μ M of NNC 55-0396 dihydrochloride (NNC), or 100 nM of rapamycin; and in the presence of either mock-conditioned medium

(mock), Reelin-conditioned medium (Reelin), or rapamycin + Reelin. F2688 NPCs show significantly higher proliferation rates compared with control NPCs, which were completely rescued by treatment with either rapamycin, NNC, or rapamycin + Reelin. On the other hand, treatment with Reelin alone had no effect on the proliferation of F2688 NPCs. **(C)** Line graph of mean % relative wound density (RWD) over time in control-derived NPCs (n = 4) and in F2688-derived NPCs (NPCs derived from 2 iPSC clones) cultured in the presence of either vehicle, 1 μ M of NNC, or 100 nM of rapamycin; and in the presence of either mock, Reelin, or rapamycin + Reelin. F2688 NPCs exhibit significantly higher migration rates compared with control NPCs, which was significantly attenuated by treatment with either rapamycin, NNC, or Reelin. In addition, concomitant treatment of F2688 NPCs with rapamycin + Reelin was the only treatment condition that significantly rescued the abnormal migration pattern of these cells to levels equal to those of the untreated control NPCs. * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Heterologous expression of mutant Cav3.2 channel confirms its functional relevance

To provide additional support and further strengthen our results, we next examined whether mutant Cav3.2 channel when overexpressed in HEK293T cells would alter Ca^{2+} influx and affect endogenous mTORC1 signaling. To this end, we transfected HEK293T cells with an empty pcDNA3 vector or with plasmids expressing either wild-type (WT-a1Ha-pcDNA3) or mutant (MUT-a1Ha-pcDNA3) Cav3.2 channels, and we measured the influx of extracellular Ca^{2+} and the phosphorylation status of pRPS6 in these cells. We observed that HEK293T cells overexpressing both wild-type and mutant Cav3.2 channels show significantly increased Ca^{2+} influx after depolarization (Figure 4A) and significantly augmented pRPS6 levels (Figure 4B) compared with cells overexpressing the empty vector, suggesting that both the amount of Ca^{2+} ions entering the cells and the activity of the mTORC1 pathway are dependent on the number of Cav3.2 channels expressed in the plasma membrane. Also, in accordance with the results using NPCs derived from patient F2688, we observed that Ca^{2+} entry and pRPS6 levels were significantly greater in cells overexpressing mutant Cav3.2, and that treatment with the T-type Ca^{2+} channels blocker NNC 55-0396 dihydrochloride rescued these phenotypes (Figure 4A, B).

Lastly, we sought to explore whether the abnormal crosstalk between the mutant Cav3.2 channel and the Reelin pathway components would also be observed in HEK293T cells. Because these cells do not express endogenous Reelin and DAB1, we analyzed the levels of endogenous pSRC in cells transfected with an empty vector or with plasmids expressing either wild-type or

mutant Cav3.2 channels. We observed that HEK293T cells overexpressing mutant Cav3.2 show significantly decreased pSRC levels compared with cells overexpressing both the wild-type Cav3.2 channel and the empty vector, and that treatment with the T-type Ca^{2+} channels blocker NNC 55-0396 dihydrochloride rescued this phenotype (Figure 4B).

Taken together, the results using this heterologous expression system strongly supports that the variant identified in the *CACNA1H* gene in patient F2688 exerts a gain-of-function effect by enhancing Ca^{2+} influx through the mutant Cav3.2 channel, which overactivates mTORC1 signaling and which, in turn, contributes to impaired activation of Reelin signaling components in these cells.

Figure 4. HEK 293T cells overexpressing mutant Cav3.2 channel show increased Ca^{2+} influx, hyperfunctional mTORC1 signaling and impaired activation of a Reelin-DAB1 signaling component. HEK 293T cells were transfected with an empty vector (EMPTY-vector; $n = 5$) or with plasmids expressing either wild-type (WT-a1Ha; $n = 5$) or mutant (MUT-a1Ha; $n = 5$) Cav3.2 channels. **(A)** Average intracellular Ca^{2+} measurements in transfected cells depolarized with 100mM KCl and cultured in the absence (vehicle) or presence (+) of 10uM of the T-type Ca^{2+} channels blocker NNC 55-0396 dihydrochloride (NNC). 293T overexpressing mutant Cav3.2 show significantly increased Ca^{2+} influx, which was rescued by treatment with NNC. **(B)** Representative immunoblots showing the expression levels of pRPS6, pSRC, SRC and β -actin (used as loading control) in transfected cells cultured in the absence (-) or presence (+) of 10uM of NNC. The bar graph shows the average levels and SD of normalized pRPS6 and pSRC for each group. 293T overexpressing mutant Cav3.2 show significantly increased pRPS6 levels and significantly decreased pSRC levels, which was rescued by treatment with NNC. * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Structural modeling of the mutant Cav3.2 channel suggests a larger pore diameter than the wild-type channel

Cav3.2 channel consists of four homologous domains (I-IV), each one composed of six α -helical transmembrane segments (S1-S6). The voltage-sensing module of the channel is formed by the positively charged S4 segments, while the ion conductivity and selectivity lie on the negatively charged extracellular membrane-reentrant pore loop (P-loop) between S5 and S6 (Catterall, 2010; Weiss & Zamponi, 2020) (Figure 5A). We observed that the 52-amino acid insertion, located between segments S5 and S6 of domain II (between residues Q⁹⁶⁹ and I⁹⁷⁰), alters the hydropathy profile in the pore region and causes significant conformational changes in the next domain (Figure 5A, yellow).

To evaluate the impact of the insertion on the structure of Cav3.2 channel, we built 3D models of the wild-type and mutant proteins. Simulation of the channel structure viewed from the cytosolic side of the plasma membrane suggests, as pointed by the domain and hydropathy profile analyses, that the insertion (Figure 5Bi, yellow) alters the secondary structure of domain II (Figure 5Bi, magenta) and also impacts the folding of domain III (Figure 5Bi, blue), changing the position of transmembrane helices that compose the pore-forming domain. Whereas in the wild type protein domain III covers part of domain II, in the mutant protein domain III is retracted and domain II is more exposed (Figure 5Bi). In addition, comparison of the pore region between mutant and wild-type proteins suggests that the reorganization of the secondary structure promoted by the insertion increases the pore diameter in the mutant protein (Figure 5Bii). Moreover, the mutant Cav3.2 channel exhibits significant changes in the electrostatic potentials of domains I, II and III compared to the wild-type channel (Supplementary Figure 1). Taken together, these analyses suggest that the insertion induces significant structural changes in the mutant Cav3.2 channel, resulting in larger open pores, which is in accordance with the greater influx of Ca²⁺ into both F2688-derived NPCs and HEK293T cells overexpressing mutant Cav3.2.

Figure 5. 3D model of the mutant Cav3.2 channel reveals significant structural changes. (A) Predicted topologies of the wild type (WT) and mutant (MUT) Cav3.2 channels showing the four homologous domains (I-IV) in different colors, each composed of six transmembrane segments (bars S1-S6). The 52-amino acid insertion (yellow) is located between segments S5 and S6 of domain II. The hydropathy profiles of the amino acid sequences are shown below the channel topologies. (B) Structural features of the WT and MUT Cav3.2 channels. (i) Simulations of the proteins viewed from the cytosolic side of the plasma membrane are shown in cartoon representation and colored by domain (DI-DIV). Domain II is colored in magenta and the 52-amino acid insertion is detached in yellow. (ii) Structural view of the pore center showing the differences in the pore diameter between WT and MUT Cav3.2 channels.

Nonrandom co-occurrence of rare potentially deleterious variants in Reelin pathway and Ca²⁺ channel genes in ASD patients

We hypothesized that the co-occurrence of damaging variants in genes for the Reelin cascade and Ca²⁺ channels may also be observed in other ASD patients. To test this hypothesis, we analyzed the WES results from a different cohort of 100 Brazilian ASD proband–parent trios, and identified in one patient, referred to as F10832, compound heterozygous missense variants in the *VLDLR* gene (NM_003383.5: c.1901G>A; p.Arg634His and c.1132T>C; p.Tyr378His), and an inherited heterozygous missense variant in the *CACNA2D4* gene (NM_172364.5: c.2095C>T; p.Leu699Phe).

The *VLDLR* gene encodes one of the receptors for Reelin (D’Arcangelo et al., 1999; Fraley et al., 2016). It has been reported that *VLDLR* mRNA levels are increased in the post-mortem brain of autistic patients (Fatemi et al., 2005), and abnormal *Vldlr* expression in rodent models causes behavioral abnormalities that are reminiscent of ASD (Iwata et al., 2012; Fraley et al., 2016;). The c.1901G>A (p.Arg634His) substitution, inherited from the mother, is present in dbSNP (rs35339834), is rare in control population databases (MAF <0.001), was not found in control individuals of matched ancestry (ABRaOM database), and shows a CADD score of 35. The c.1132T>C (p.Tyr378His) substitution, inherited from the father, is present in dbSNP (rs142885301), is rare in control population databases (MAF <0.0003) and in ancestry matched controls (MAF <0.002, ABRaOM database), and has a CADD score of 25.4. According to 3D structural model of *VLDLR*, based on the structure coordinates of the full-length *LDLR* ectodomain (Supplementary Figure 2A), the p.Arg634His substitution is located within the six-bladed β -propeller domain and disrupts the hydrogen bonds between the Arg634 and Asp594 residues on two different β -strands (Supplementary Figure 2B). This rupture may lead to important structural and functional modifications of this domain, which is responsible for the control of substrate release (Rudenko et al., 2002). The c.1132T>C (p.Tyr378His) substitution is located within the important EGF-A domain, which shows intimate intermolecular interaction with Reelin (Hirai et al., 2017) and binds in a Ca²⁺-dependent manner to PCSK9, known to control degradation of the receptor (Kwon et al., 2008) (Supplementary Figure 2B). Albeit subtle, the comparison of the electrostatic potentials between the wild-type and mutant *VLDLR*

(p.Tyr378His) showed differences that might affect the interactions with its ligands (Supplementary Figure 2C).

The *CACNA2D4* gene encodes the voltage-gated L-type Ca^{2+} channel auxiliary subunit of the $\alpha_2\delta_4$ type, a regulatory subunit that alters the properties of pore-forming α_1 subunits of these channels (Arikkath & Campbell, 2003; Van Den Bossche et al., 2012). Deletions of 12p13.3 encompassing *CACNA2D4* and *CACNA1C* genes have been associated with ASD-like developmental delays (Abdelmoity et al., 2011; Bhat et al., 2012), and *Cacna2d4* mutant mice exhibit disorganized photoreceptors synaptic terminals (Wycisk et al., 2006). The c.2095C>T (p.Leu699Phe) substitution, inherited from the father, is present in dbSNP (rs151121191), is rare in control population databases (MAF <0.004) and in ancestry matched controls (MAF <0.003, ABRaOM database), and has a CADD score of 20.8. While the predicted 3D structures of the wild-type and mutant proteins suggest that the p.Leu699Phe substitution causes no significant modifications (data not shown), *in silico* tools for splice site defect prediction suggest that the variant creates an exonic splicing silencer (ESS) motif in exon 22 of *CACNA2D4* (Supplementary Figure 2D), which may affect the exon usage. Importantly, the skipping of exon 22 would lead to a frameshift with the loss of the last 452 C-terminal amino acid residues (40% of the protein).

Taken together, we identified the co-occurrence of damaging or potentially damaging variants in genes for the Reelin pathway and Ca^{2+} channels in 2 out of 130 Brazilian ASD patients (1.5%) examined by WES. These results provide additional evidence supporting the notion that genes with nonrandom co-occurring deleterious variants may have direct signaling interactions and act together to cause oligogenic forms of ASD.

DISCUSSION

In this study, we describe the functional analysis of a *de novo* splice site variant identified in the *CACNA1H* gene in a patient with ASD and macrocephaly who also carries deleterious compound heterozygous missense variants in the *RELN* gene (Sánchez-Sánchez et al., 2018). We found that the splice site variant in *CACNA1H* leads to retention of an intronic sequence within the mature transcript, which is predicted to cause an in-frame insertion of 52 novel amino

acid residues in the pore-forming domain of the Cav3.2 channel. We showed that Ca^{2+} influx through the mutant Cav3.2 is increased in patient-derived NPCs, which overactivates mTORC1 signaling pathway and, consequently, further aggravates the impairment of Reelin signaling. Heterologous expression of the mutated Cav3.2 channel confirmed these results, and the 3D model-structure of the mutated channel suggested that the pore may be enlarged in size, which is consistent with the greater influx of Ca^{2+} . In addition, we showed that mutant Cav3.2-mediated increase in mTORC1 signaling acts alone to cause enhanced proliferation of patient's NPCs and additively with impaired Reelin signaling in the abnormal migration of these cells. Finally, through analysis of WES data from a different cohort of 100 ASD proband–parent trios, we identified in one patient potentially disruptive variants in the *VLDLR* and *CACNA2D4* genes, which suggest nonrandom co-occurrence of rare damaging variants in genes for the Reelin pathway and Ca^{2+} channels in oligogenic forms of ASD.

Within the CNS, Cav3.2 is predominantly expressed in the hippocampus, and Cav3.2 knockout mice show behavioral abnormalities reminiscent of human autism, including increased anxiety and impaired memory (Gangarossa et al., 2014; Chung et al., 2015). Rare missense variants in the human Cav3.2 have previously been reported in patients with ASD (Splawski et al., 2006; Devlin et al., 2012; O' Roak et al., 2012; R. Chen et al., 2017; Munnich et al., 2019). However, these variants do not segregate with the disorder in the affected families, but instead appear to contribute to ASD susceptibility. Electrophysiological analysis of some of these variants using a non-neuronal exogenous expression system revealed that mutated Cav3.2 channels conducted substantially less current than wild-type channels. However, two of these variants located within the voltage-sensing region of Cav3.2 were also shown to decrease the inactivation rates of the mutated channels and, thus, are expected to allow larger Ca^{2+} influx once activated (Splawski et al., 2006). Therefore, detailed biophysical analysis investigating the effects of ASD-associated Cav3.2 variants in more native conditions are still necessary to understand their characteristics and functional impact on neuronal excitability and function.

Several variants scattered across the entire Cav3.2 sequence have also been associated with a range of epilepsy syndromes (Y. Chen et al., 2003; Heron

et al., 2004, 2007; Khosravani et al., 2004; Liang et al., 2006). The biophysical alterations observed are in general consistent with a gain-of-function of the channel, although in some cases a loss-of-function was also observed (Heron et al., 2007). However, as for *CACNA1H* variants associated with ASD, variants associated with epilepsy syndromes often show incomplete segregation with the disorder, suggesting that their contribution to epilepsy might be dependent on additional genetic/environmental factors (Weiss & Zamponi, 2020). In contrast, rare *de novo* gain-of-function variants with high penetrance in the *CACNA1C* gene, which encodes the voltage-gated L-type Ca^{2+} channel CaV1.2 , cause Timothy syndrome, a rare autosomal dominant neurodevelopmental disorder associated with ASD and epilepsy (Splawski et al., 2004). It should also be noted that common and rare variants in other Ca^{2+} channel genes (*CACNA1G*, *CACNA1I*, *CACNA1D*, *CACNA2D3*, and *CACNB2*) have been found to be associated with ASD (Strom et al., 2010; Iossifov et al., 2012; Lu et al., 2012; Chuang et al., 2013; Girirajan et al., 2013; Breitenkamp et al., 2014), and functional analysis of some of these variants showed either gain- or loss-of function of channel activity (Breitenkamp et al., 2014; Pinggera et al., 2015). Altogether, the above mentioned findings suggest that perturbed intracellular Ca^{2+} homeostasis due to voltage-gated Ca^{2+} channel dysfunctions may affect neurodevelopmental processes contributing to ASD.

An abnormal excess number of neurons has been observed in the brain of ASD individuals, which may contribute to the early brain overgrowth commonly observed in these patients (Courchesne et al., 2011). Since Ca^{2+} and mTORC1 signaling pathways regulate neuronal cell proliferation (Spitzer, 2006; Ryskalin et al., 2017) and hyperactive mTORC1 signaling has been associated with enlarged brain size (Zhou et al., 2009; Reijnders et al., 2017), it is possible that the increased Ca^{2+} /mTORC1-mediated enhanced proliferation of F2688 NPCs might contribute to the enlarged brain size observed in patient F2688. It is also noteworthy that several neuropathological findings in the brains from autistic subjects support neuronal migration abnormalities (Pan et al., 2019), and that, in addition to TSC mouse model (Moon et al., 2015), deficits in neuronal migration have also been observed in many rodent genetic models of ASD that mimic disease-causing mutations in patients (Peñagarikano et al., 2011; Feliciano et al., 2012; Provenzano et al., 2017). Therefore, the aberrant Ca^{2+} -mediated increase

in mTORC1 signaling, which in turn further exacerbates the Reelin signal transduction defect and lead to abnormal migration of F2688 NPCs might also contribute to the clinical phenotypes observed in the patient.

The existence of an oligogenic inheritance of ASD has been unrevealed by a series of studies showing that a single patient can carry gene-disruptive variants in multiple ASD-risk genes (O’Roak et al., 2011; Schaaf et al., 2011; Leblond et al., 2012; Rubeis et al., 2014; Zamponi et al., 2014; Krumm et al., 2015). In addition, more recent studies using large scale genomic data have suggested that there is a negative correlation between the number of hits and patient’s IQ (Du et al., 2019; Pizzo et al., 2019), which suggest additive or epistatic effects of these variants, and that the genes involved in this multi-hit model show higher functional connectivity, measured by protein-protein interaction and coexpression networks (Du et al., 2019). The data reported here corroborate these results, lending further support to the concept that genes with co-occurring deleterious variants tend to have interconnected signaling pathways. In this sense, further functional analysis addressing whether the variants in *VLDLR* and *CACNA2D4* also interact with each other will be of utmost importance. Interestingly, Du et al. (2019) have also recently shown that both *CACNA1H* and *RELN* were involved in the oligogenic model, and disruptive variants were found in the *CACNA1H* and *SETX* genes in an ASD patient, and in the *RELN* and *DIP2A* genes in another patient. Although it is still completely unknown whether these variants somehow crosstalk with each other, it is noteworthy that *DIP2A* was also shown to stimulate Akt/mTOR signaling (Ouchi et al., 2010) and, therefore, it is tempting to speculate that *RELN* and *DIP2A* variants might also interact through mTORC1 signaling, which also corroborate the notion that ASD-risk genes might crosstalk through convergent signaling pathways.

Taken together, our findings provide experimental evidence of an abnormal functional connectivity between mutated *CACNA1H* and *RELN* genes via the intracellular mTORC1 pathway, and also provide insights into the molecular mechanisms of oligogenic inheritance in ASD. A better understanding of these genetic interactions is necessary to decipher the complex genetic architecture of ASD.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and genetic analysis

The Ethics Committees of the Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo and of the Hospital Israelita Albert Einstein approved this study, and written informed consent was obtained from all subjects' caregivers. All individuals whose cells were evaluated in this study (patient F2688 and 4 neurologically normal control individuals) aged 6 to 12 years old at the time of collection of their biological material, and are unrelated white Brazilian males. All ASD patients were diagnosed by psychiatrists using the criteria defined in DSM-IV-TR and Childhood Autism Rating Scale (CARS). Patients were also subjected to IQ testing (Wechsler Intelligence Scale for Children-III, WISC-III) whenever possible. Patient F2688 displays mild to moderate ASD (CARS score 30.5) and high average intelligence (IQ 110). Although data on brain circumference at earlier ages are not available, recent physical examination of patient F2688 at 17 years old revealed an enlarged brain (OFC= 61 cm, >97th centile) (da Silva Montenegro, Costa, Campos, Scliar, de Almeida, et al., 2020). Patient F10832 displays mild to moderate ASD (CARS score 31), and macrocephaly was not observed in the patient on physical examination. WES and CGH-array have been previously performed using genomic DNA isolated from peripheral blood of patient F2688 and their parents (Sánchez-Sánchez et al., 2018; da Silva Montenegro et al., 2020; Griesi-Oliveira et al., 2020). WES using genomic DNA isolated from an additional 100 Brazilian ASD proband–parent trios was performed in collaboration with Dr Joseph D. Buxbaum (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, EUA) as described in Satterstrom et al., 2020. Genes encoding Reelin cascade components and Ca²⁺ channels (Supplementary Table 1) were analyzed for the presence of rare and potentially deleterious variants (*frequency of less than 0.01 in dbSNP, 1000 Genomes, gnomAD, and ABraOM databases*). Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) method was used to score the variants.

Neural progenitor cells culture

All NPC samples used in this study have been previously differentiated from iPSCs as described in Sánchez-Sánchez et al. (2018) and Griesi-Oliveira et al. (2020). NPCs were maintained in monolayer on dishes coated with 10µg/mL

poly-ornithine (Sigma) and 5µg/mL laminin (ThermoFisher) in NPC medium [(DMEM-F12, 0.25x N2, 0.5x B27, 20 ng/mL FGF (ThermoFisher), and 20 ng/mL EGF (Peprotech)]. NPCs derived from 2 iPSC clones of patient F2688 and either 1 or 2 iPSC clones of the other subjects (n= 4 control individuals) were used in all experiments described herein.

Cloning of the mutated *CACNA1H* gene, HEK293T cell culture and transfection

cDNA samples from patient F2688 were used to amplify by conventional PCR the region of the *CACNA1H* gene containing the 156 pb insertion (intron 13). PCR reactions were carried out with a high-fidelity DNA polymerase (Platinum SuperFi DNA Polymerase, ThermoFisher) and specific primers containing terminal restriction endonuclease recognition sites to permit cloning. The purified PCR fragment was then introduced to the wild-type human Cav3.2 cDNA (plasmid a1Ha-pcDNA3, #45809 Addgene) using standard molecular cloning techniques. The presence of the mutation and integrity of the construct were verified by Sanger DNA sequencing.

HEK293T cells were cultured in DMEM-high glucose (DMEM-HG) medium containing 15% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) (ThermoFisher). When the cells reached 70% confluence, they were transfected with either a1Ha-pcDNA3 wild type, or a1Ha-pcDNA3 mutated, or empty pcDNA3 vector (negative control) using the Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher). After that, the cells were cultured for another 48 hours before purification of RNA and protein. The overexpression of WT- and MUT-a1Ha-pcDNA3 was confirmed by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) using predesigned TaqMan gene expression assays (see below), which showed very similar levels of expression (data not shown).

Preparation of Reelin- or mock-conditioned medium

Preparation of wild-type Reelin- or mock-conditioned medium was performed as described previously (Sánchez-Sánchez et al., 2018). Briefly, HEK293T cells were transfected with either full-length mouse Reelin cDNA construct (pCrl; a gift of Tom Curran) or empty pcDNA3 vector (negative control)

using the Lipofectamine [™] 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher). After that, the cells were cultured for additional 48 hours before conditioned medium was harvested, centrifuged to remove cells and debris, and then concentrated 8x using the Amicon® Ultra 15 mL centrifugal 100k filter devices (Millipore). The concentrated Reelin- or mock-medium were then added to complete NPC medium prior to use in the migration assays.

Treatment of cells with NNC 55-0396 dihydrochloride or rapamycin or wild type Reelin

NPC samples from F2688 patient and from control individuals as well as transfected HEK293T cells were cultured in the presence of vehicle (DMSO) or 10 μ M of the T-type Ca^{2+} channels blocker NNC 55-0396 dihydrochloride (Tocris Bioscience) for 30 min prior to protein extraction for western blot analysis or measurements of extracellular Ca^{2+} influx (see below). For the proliferation and migration assays, NPCs were cultured in the presence of vehicle (DMSO), 1 μ M of NNC 55-0396 dihydrochloride, 100 nM of rapamycin (Sigma Aldrich), wild-type Reelin- or mock-*conditioned medium*, or a combination of 100 nM of rapamycin plus wild-type Reelin during the entire course of the experiments.

Conventional and quantitative reverse transcription-PCR analyses

Total RNA was extracted from each cell sample using NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) following manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were determined using Nanodrop (Nanovue). cDNA synthesis was performed using 1 μ g of total RNA and SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (ThermoFisher). Conventional PCR reactions were carried out with 60 ng of control- and F2688-derived NPCs using a forward primer designed to anneal in exon 12 and a reverse primer designed to anneal in exon 15 of the *CACNA1H* gene. Sanger sequencing of the cloned 526 bp PCR band was performed to confirm intron 13 retention in the *CACNA1H* transcript. Quantitative PCR (qPCR) reactions were carried out with 60 ng of cDNA (from control- and F2688-derived NPCs, as well as from transfected HEK293T cells) and predesigned TaqMan gene expression assays (ThermoFisher), with *HMBS* as a housekeeping gene. All qPCR samples were run in triplicate. The

comparative CT method ($\Delta\Delta$ CT Method) was used to analyze the expression levels of the *CACNA1H* gene. The graph in Figure 1D shows the group means and SD. The experiments were repeated twice with similar results.

Measurement of extracellular Ca^{2+} influx

The fluorescence-based *FLIPR® Calcium 4 Assay Kit* (Molecular Devices) was used to *detect changes in intracellular Ca^{2+}* . Briefly, cells ($3\text{-}5 \times 10^4$ cells/well of control- and F2688-derived NPCs, as well as transfected HEK293T cells) were seeded in black 96-well plates coated with poly-ornithine and laminin, and cultured in growth medium for 48 hours. Before initiating the assay, the medium was removed and cells were incubated with the Ca^{2+} dye (containing 2.5 mM probenecid) for 60 min at 37°C in a final volume of 200 μL /well. The cells were then treated with vehicle or NNC 55-0396 dihydrochloride, and the dye was excited at a wavelength of 480 nm and its fluorescence signals detected at a wavelength of 525 nm. The basal fluorescence intensity was monitored for 15 seconds at 1.65-second intervals, and then cells were challenged with 100 mM KCl and the cellular fluorescence continued to be recorded over 200 seconds. KCl-evoked increases in intracellular Ca^{2+} were determined as *peak fluorescence* minus the basal *fluorescence* intensity ($\Delta F/F_0$) using the *SoftMax2Pro* software (Molecular Devices Corp.). The $\Delta F/F_0$ values obtained from the same group did not differ significantly at either time points after KCl stimulation. Each experimental condition was performed in 3 replicate wells for NPCs and 5 replicates wells for HEK293T cells, and the graph shows the group means and SD. The experiments were repeated at least twice with similar results.

Protein extraction and immunoblotting

Total proteins extracts from cell samples (control- and F2688-derived NPCs and transfected HEK293T cells) were obtained using RIPA buffer (Sigma Aldrich) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (1:100; Sigma Aldrich), and were quantified using BCA assay (Thermo Fisher Scientific). Proteins (20 μg) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (GE HealthCare), which were blocked and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-DAB1 (1:200, sc-271136 Santa Cruz Biotechnology); anti-pRPS6-S240/244 (1:2500, # 5364 Cell Signaling

Technology); anti-pSRC-Tyr416 (1:1000, # 2101, Cell Signaling Technology); anti-SRC (1:5000, # 2123 Cell Signaling Technology) and β actin (1:10000, A2228 Sigma Aldrich) for loading control. In addition, the following primary antibodies were used in order to detect endogenous Cav3.2 protein levels in NPCs and other cell types (such as Hela cells, iPSCs, iPSC-derived neurons, and HEK293T cells transfected with wild-type α 1Ha-pcDNA3) but, despite several attempts, neither of them worked properly: ab135974 and ab128251 (Abcam), sc-377510 (Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed using horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:2000, #7074 or #7072 Cell Signaling Technology), ECL substrate (Bio-Rad), and the ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). The intensity of the bands was determined by densitometry using The Image Lab Software (Bio-Rad). Results shown are from two independent experiments.

Analysis of cell size and proliferation

NPC samples were seeded into 12-well plates coated with poly-ornithine and laminin at density of 1.0×10^5 cells per well and cultured in complete NPC medium for 24h. Phase-contrast images were obtained at 20x magnification using the IncuCyte® system (Essen Bioscience). Measurements of cell body sizes were performed using the IncuCyte Neurotrack software. For the proliferation assay, 24h after initial plating (day 0) cells were counted at 48h (day 1) and 72h (day 2) using trypan blue exclusion and automated cell counting. Each experimental condition was performed in 2 replicate wells, and the graph shows the group means and SD. The experiments were repeated at least twice with similar results.

Analysis of cell migration (scratch-wound healing assay)

NPC samples were seeded into 96-well plates coated with poly-ornithine and laminin at density of 3.5×10^4 cells per well and cultured in complete NPC medium until confluence. The medium was then replaced by DMEM/F12 (without FGF and EGF) and the 96-well WoundMaker (Essen Bioscience) was used to generate a wound area in the monolayer of cells. Wound closure was monitored and quantified with the IncuCyte® system (Essen Bioscience), and the data were analyzed using an integrated metric of relative cell density in the wound area.

Relative wound density was defined as *cell density in the wound area* expressed *relative* to the *cell density* outside of the *wound area* over time. Each experimental condition was performed in 6 replicate wells, and the graph shows the group means and SD. The experiments were repeated at least twice with similar results.

Three-dimensional modeling and splice site prediction

The 3D models of wild-type and mutant Cav3.2 channels were built using the online I-Tasser server (Yang & Zhang, 2015). Since the modeling server does not accept large amino acid sequences, three sets of models for each protein were built using the amino acids corresponding to domains I-II, II-III and III-IV. The motifs were then superimposed onto the crystal structure coordinates of the complex of voltage-gated sodium channel NavPaS from the American cockroach *Periplaneta americana* (PDB code 6A91) using the secondary-structure matching tool (Krissinel & Henrick, 2004) in Coot v.0.8.2 (Emsley & Cowtan, 2004). The 3D models of wild-type and mutant VLDLR were built using the Modeller v9.24 (Webb and Sali, 2016) based on the structural coordinates of the full-length extracellular domain of LDLR (PDB 1n7d, Rudenko et al, 2002) and of the PCSK9 protein in complex with LDLR (PDB 3m0c). The latter structure was used to compare the position of the p.Tyr378His substitution. Pymol (DeLano, 2002) was used to create the structural figures and calculate the electrostatic potentials. Protein hydrophobicity plots were produced using Expasy ProtScale (Kyte & Doolittle, 1982). Splice site prediction was performed using the Human Splicing Finder tool (<http://www.umd.be/HSF/>).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the linear mixed-effect models in the lme4 package for R version 3.4.1 to account for dependency between biological replicates (when NPCs derived from different iPSC clones of the same individual were used) and independent technical replicates per individual or group. Pairwise comparisons between the treatment groups (NNC 55-0396 dihydrochloride or rapamycin versus vehicle, and *Reelin*- or mock-*conditioned medium*) were done using paired t-test in GraphPad Prism version 7.0. Data were expressed as means $\pm$ standard deviation. A value of $p < 0.05$ was considered

statistically significant. The Figures show only the p-value obtained from the analyses using F2688 NPCs and MUT-a1Ha.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all the subjects who participated in this work and their family members. We thank Elaine Cristina Zachi for performing formal psychological evaluation of patient F2688. We thank Danielle Moreira, Claudia Ismania Samogy Costa, and Ana Karolyne Santos Gomes for technical assistance. This work was supported by grants from Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant number 2019/08655-2] and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Aldinger, K. A., Lane, C. J., Veenstra-VanderWeele, J., & Levitt, P. (2015). Patterns of Risk for Multiple Co-Occurring Medical Conditions Replicate Across Distinct Cohorts of Children with Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*, 8(6), 771–781. <https://doi.org/10.1002/aur.1492>
- American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. DSM-IV-TR. In *American Journal of Critical Care*. <https://doi.org/10.1176/dsm.10.1176/appi.books.9780890420249.dsm-iv-tr>
- American Psychiatric Association. (2013). American Psychiatric Association, 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). In *American Journal of Psychiatry*. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- Arikkath, J., & Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: Essential components of the voltage-gated calcium channel complex. In *Current Opinion in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00066-7)
- Armstrong, C. M., & Matteson, D. R. (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science*, 227(4682), 65–67. <https://doi.org/10.1126/science.2578071>
- Bai, D., Yip, B. H. K., Windham, G. C., Sourander, A., Francis, R., Yoffe, R., Glasson, E., Mahjani, B., Suominen, A., Leonard, H., Gissler, M., Buxbaum, J. D., Wong, K., Schendel, D., Kodesh, A., Breshnahan, M., Levine, S. Z., Parner, E. T., Hansen, S. N., ... Sandin, S. (2019). Association of Genetic and Environmental Factors with Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, 76(10), 1035–1043.

<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1411>

- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (2013). Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a british twin study. *The Science of Mental Health: Volume 2: Autism*, 91–105.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Rosenberg, C. R., White, T., Durkin, M. S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L. C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R. T., Hewitt, A., ... Dowling, N. F. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(6). <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>
- Bean, B. P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells: Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *Journal of General Physiology*, 86(1), 1–30. <https://doi.org/10.1085/jgp.86.1.1>
- Bijlenga, P., Liu, J. H., Espinos, E., Haenggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R., & Bernheim, L. (2000). T-type α_1H Ca^{2+} channels are involved in Ca^{2+} signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7627–7632. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7627>
- Blankenship, A. G., & Feller, M. B. (2010). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(1), 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrn2759>
- Blumberg, S. J., Bramlett, M. D., Kogan, M. D., Schieve, L. a, Jones, J. R., & Lu, M. C. (2013). Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011– 2012. *National Health Statistics Reports*, 65, 1–12.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 551–563. <https://doi.org/10.1038/nrn3992>
- Breitenkamp, A. F. S., Matthes, J., Nass, R. D., Sinzig, J., Lehmkuhl, G., Nürnberg, P., & Herzig, S. (2014). Rare mutations of CACNB2 found in autism spectrum disease-affected families alter calcium channel function. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095579>
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), 2787–2814. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1550-7>
- Catterall, W. A. (2010). Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neuroscience Letters*, 486(2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.085>
- Catterall, W. A., Leal, K., & Nanou, E. (2013). Calcium channels and short-term synaptic plasticity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10742–10749. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.411645>
- Chen, R., Davis, L. K., Guter, S., Wei, Q., Jacob, S., Potter, M. H., Cox, N. J., Cook, E. H., Sutcliffe, J. S., & Li, B. (2017). Leveraging blood serotonin as an endophenotype to identify de novo and rare variants involved in autism. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0130-3>
- Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W. H. Y., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y., & Wu, X. (2003). Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Annals*

- of *Neurology*, 54(2), 239–243. <https://doi.org/10.1002/ana.10607>
- Chilian, B., Abdollahpour, H., Bierhals, T., Haltrich, I., Fekete, G., Nagel, I., Rosenberger, G., & Kutsche, K. (2013). Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clinical Genetics*. <https://doi.org/10.1111/cge.12105>
- Chuang, Y.-C., Lin, Y.-S., Liu, C.-C., Liu, H.-S., Liao, S.-H., Shi, M.-D., Lei, H.-Y., & Yeh, T.-M. (2013). Factors contributing to the disturbance of coagulation and fibrinolysis in dengue virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 112(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2012.10.013>
- Chung, N. C., Huang, Y. H., Chang, C. H., Liao, J. C., Yang, C. H., Chen, C. C., & Liu, I. Y. (2015). Behavior training reverses asymmetry in hippocampal transcriptome of the Cav3.2 knockout mice. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118832>
- Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S., Garnett, T., Ronald, A., Plomin, R., Rijdsdijk, F., Happé, F., & Bolton, P. (2015). Heritability of autism spectrum disorder in a UK population-based twin sample. *JAMA Psychiatry*, 72(5), 415–423. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3028>
- Constantino, J. N. (2011). The quantitative nature of autistic social impairment. *Pediatric Research*, 69(5 PART 2), 55–62. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318212ec6e>
- Conus, N. M., Hemmings, B. A., & Pearson, R. B. (1998). Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70(S6k). *Journal of Biological Chemistry*, 273(8), 4776–4782. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4776>
- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., Barnes, C. C., & Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1638>
- D’Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M., & Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80860-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80860-0)
- D’Gama, A. M., Pochareddy, S., Li, M., Jamuar, S. S., Reiff, R. E., Lam, A. T. N., Sestan, N., & Walsh, C. A. (2015). Targeted DNA Sequencing from Autism Spectrum Disorder Brains Implicates Multiple Genetic Mechanisms. *Neuron*, 88(5), 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.009>
- da Silva Montenegro, E. M., Costa, C. S., Campos, G., Scliar, M., Almeida, T. F., Zach, E. C., Silva, I. M. W., Chan, A. J. S., Zarrei, M., Lourenço, N. C. V., Yamamoto, G. L., Scherer, S., & Passos-Bueno, M. R. (2020). Meta-Analyses Support Previous and Novel Autism Candidate Genes: Outcomes of an Unexplored Brazilian Cohort. *Autism Research*, 13(2), 199–206. <https://doi.org/10.1002/aur.2238>
- DeLano, W. L. (2002). Unraveling hot spots in binding interfaces: Progress and challenges. In *Current Opinion in Structural Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00283-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00283-X)
- Devlin, B., Boone, B. E., Levy, S. E., Lihm, J., Buxbaum, J. D., Wu, Y., Lewis, L., Han, Y., Boerwinkle, E., Gibbs, R. A., Fromer, M., Shakir, K., Fennell, T., Garimella, K., Banks, E., Poplin, R., Gabriel, S., De Pisto, M., Sunyaev, S., & Daly, M. J. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. In

- Nature* (Vol. 485, Issue 7397, pp. 242–246). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nature11011>
- Dreyfus, F. M., Tscherter, A., Errington, A. C., Renger, J. J., Shin, H. S., Uebele, V. N., Crunelli, V., Lambert, R. C., & Leresche, N. (2010). Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of ITwindow. *Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4305-09.2010>
- Du, Y., Li, Z., Liu, Z., Zhang, N., Wang, R., Li, F., Zhang, T., Jiang, Y., Zhi, X., Wang, Z., & Wu, J. (2019). Nonrandom occurrence of multiple de novo coding variants in a proband indicates the existence of an oligogenic model in autism. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0610-2>
- Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., & Tsien, R. W. (1995). Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron*, 15(5), 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90100-0)
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*.
<https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- Fatemi, S. H., Snow, A. V., Stary, J. M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T. J., Lee, S., Brooks, A. I., & Pearce, D. A. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.018>
- Feliciano, D. M., Quon, J. L., Su, T., Taylor, M. M., & Bordey, A. (2012). Postnatal neurogenesis generates heterotopias, olfactory micronodules and cortical infiltration following single-cell TSC1 deletion. *Human Molecular Genetics*.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr511>
- Feliciano, D. M., Su, T., Lopez, J., Platel, J. C., & Bordey, A. (2011). Single-cell Tsc1 knockout during corticogenesis generates tuber-like lesions and reduces seizure threshold in mice. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI44909>
- Fombonne, E. (2004). The changing epidemiology of autism spectrum disorders. *Journal of Intellectual Disability Research*, 48, 283.
- Fraley, E. R., Burkett, Z. D., Day, N. F., Schwartz, B. A., Phelps, P. E., & White, S. A. (2016). Mice with Dab1 or Vldlr insufficiency exhibit abnormal neonatal vocalization patterns. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep25807>
- Gangarossa, G., Laffray, S., Bourinet, E., & Valjent, E. (2014). T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00092>
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K., & Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, 46(8), 881–885. <https://doi.org/10.1038/ng.3039>
- Girirajan, S., Dennis, M. Y., Baker, C., Malig, M., Coe, B. P., Campbell, C. D., Mark, K., Vu, T. H., Alkan, C., Cheng, Z., Biesecker, L. G., Bernier, R., & Eichler, E. E. (2013). Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.12.016>
- Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Cooper, G. M., Antonacci, F., Siswara, P., Itsara, A., Vives, L., Walsh, T., McCarthy, S. E., Baker, C., Mefford, H. C., Kidd, J. M.,

- Browning, S. R., Browning, B. L., Dickel, D. E., Levy, D. L., Ballif, B. C., Platky, K., Farber, D. M., ... Eichler, E. E. (2010). A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nature Genetics*, 42(3), 203–209. <https://doi.org/10.1038/ng.534>
- Graves, L. M., He, Y., Lambert, J., Hunter, D., Li, X., & Earp, H. S. (1997). An intracellular calcium signal activates p70 but not p90 ribosomal S6 kinase in liver epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1920>
- Griesi-Oliveira, K., Fogo, M. S., Pinto, B. G. G., Alves, A. Y., Suzuki, A. M., Morales, A. G., Ezquina, S., Sosa, O. J., Sutton, G. J., Sunaga-Franze, D. Y., Bueno, A. P., Seabra, G., Sardinha, L., Costa, S. S., Rosenberg, C., Zachi, E. C., Sertie, A. L., Martins-de-Souza, D., Reis, E. M., ... Passos-Bueno, M. R. (2020). Transcriptome of iPSC-derived neuronal cells reveals a module of co-expressed genes consistently associated with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0669-9>
- Gulati, P., Gaspers, L. D., Dann, S. G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F., Kozma, S. C., Thomas, A. P., & Thomas, G. (2008). Amino Acids Activate mTOR Complex 1 via Ca²⁺/CaM Signaling to hVps34. *Cell Metabolism*, 7(5), 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.002>
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Grether, J. K., & Risch, N. (2015). *Genetic Heritability*. 68(11), 1095–1102. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76.Genetic>
- Hannan, K. M., Thomas, G., & Pearson, R. B. (2003). Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20021709>
- Heron, S. E., Khosravani, H., Varela, D., Bladen, C., Williams, T. C., Newman, M. R., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Mulley, J. C., & Zamponi, G. W. (2007). Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.21169>
- Heron, S. E., Phillips, H. A., Mulley, J. C., Mazarib, A., Neufeld, M. Y., Berkovic, S. F., & Scheffer, I. E. (2004). Genetic Variation of CACNA1H in Idiopathic Generalized Epilepsy [1]. In *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20028>
- Heyes, S., Pratt, W. S., Rees, E., Dahimene, S., Ferron, L., Owen, M. J., & Dolphin, A. C. (2015a). Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Progress in Neurobiology*, 134, 36–54. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.002>
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Al Shahwan, S., Grant, P. E., Hourihane, J. O. B., Martin, N. D. T., & Walsh, C. A. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/79246>
- Huguet, G., Benabou, M., & Bourgeron, T. (2016). The Genetics of Autism Spectrum Disorders. In P. Sassone-Corsi & Y. Christen (Eds.), *A Time for Metabolism and Hormones* (pp. 101–129). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27069-2>
- Iakoucheva, L. M., Muotri, A. R., & Sebat, J. (2019). Getting to the Cores of Autism. *Cell*, 178(6), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.037>
- Iossifov, I., Levy, D., Allen, J., Ye, K., Ronemus, M., Lee, Y. H., Yamrom, B., & Wigler, M. (2015). Low load for disruptive mutations in autism genes and their biased

- transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516376112>
- Iossifov, I., O’Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepers, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E., Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., ... Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515(7526), 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y. H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., ... Wigler, M. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron*, 74(2), 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009>
- Iwata, K., Izumo, N., Matsuzaki, H., Manabe, T., Ishibashi, Y., Ichitani, Y., Yamada, K., Thanseem, I., Anitha, A., Vasu, M. M., Shimmura, C., Wakuda, T., Kamenno, Y., Takahashi, T., Iwata, Y., Suzuki, K., Nakamura, K., & Mori, N. (2012). Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-3-11>
- Jiang, Y. H., Yuen, R. K. C., Jin, X., Wang, M., Chen, N., Wu, X., Ju, J., Mei, J., Shi, Y., He, M., Wang, G., Liang, J., Wang, Z., Cao, D., Carter, M. T., Chrysler, C., Drmic, I. E., Howe, J. L., Lau, L., ... Scherer, S. W. (2013). Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.012>
- Jossin, Y., & Goffinet, A. M. (2007). Reelin Signals through Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt To Control Cortical Development and through mTor To Regulate Dendritic Growth. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00928-07>
- Keshvara, L., Benhayon, D., Magdaleno, S., & Curran, T. (2001). Identification of Reelin-induced Sites of Tyrosyl Phosphorylation on Disabled 1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101422200>
- Khosravani, H., Altier, C., Simms, B., Hamming, K. S., Snutchll, T. P., Mezeyova, J., McRory, J. E., & Zamponi, G. W. (2004). Gating Effects of Mutations in the Cav3.2 T-type Calcium Channel Associated with Childhood Absence Epilepsy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9681–9684. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400006200>
- Kolevzon, A., Smith, C. J., Schmeidler, J., Buxbaum, J. D., & Silverman, J. M. (2004). Familial symptom domains in monozygotic siblings with autism. *American Journal of Medical Genetics*, 129B(1), 76–81. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30011>
- Krey, J. F., Paşca, S. P., Shcheglovitov, A., Yazawa, M., Schwemberger, R., Rasmusson, R., & Dolmetsch, R. E. (2013). Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nature Neuroscience*, 16(2), 201–209. <https://doi.org/10.1038/nn.3307>
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0907444904026460>
- Krumm, N., Turner, T. N., Baker, C., Vives, L., Mohajer, K., Witherspoon, K., Raja, A., Coe, B. P., Stessman, H. A., He, Z. X., Leal, S. M., Bernier, R., & Eichler, E. E. (2015). Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.3303>

- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lammert, D. B., & Howell, B. W. (2016). RELN Mutations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00084>
- Lammert, D. B., Middleton, F. A., Pan, J., Olson, E. C., & Howell, B. W. (2017). The de novo autism spectrum disorder RELN R2290C mutation reduces Reelin secretion and increases protein disulfide isomerase expression. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.14045>
- Leblond, C. S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., Konyukh, M., Chaste, P., Ey, E., Rastam, M., Anckarsäter, H., Nygren, G., Gillberg, I. C., Melke, J., Toro, R., Regnault, B., Fauchereau, F., Mercati, O., Lemièrre, N., ... Bourgeron, T. (2012). Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genetics*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002521>
- Lee, B. K., & McGrath, J. J. (2015). Advancing parental age and autism: Multifactorial pathways. In *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.005>
- Lee, G. H., & D'Arcangelo, G. (2016). New insights into reelin-mediated signaling pathways. In *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00122>
- Leresche, N., & Lambert, R. C. (2017). T-type calcium channels in synaptic plasticity. In *Channels*. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1238992>
- Li, R. J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y. G., Jia, H., & Liu, J. O. (2016). Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *ELife*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.19360>
- Liang, J., Zhang, Y., Wang, J., Pan, H., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Shen, Y., & Wu, X. (2006). New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.073>
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- Louhivuori, L. M., Louhivuori, V., Wigren, H. K., Hakala, E., Jansson, L. C., Nordström, T., Castrén, M. L., & Åkerman, K. E. (2013). Role of low voltage activated calcium channels in neuritogenesis and active migration of embryonic neural progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 22(8), 1206–1219. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0234>
- Lu, A. T.-H., Dai, X., Martinez-Agosto, J. A., & Cantor, R. M. (2012). Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-3-18>
- Magdalon, J., Sánchez-Sánchez, S. M., Griesi-Oliveira, K., & Sertié, A. L. (2017). Dysfunctional mTORC1 signaling: A convergent mechanism between syndromic and nonsyndromic forms of autism spectrum disorder? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms18030659>
- Magri, L., Cambiaghi, M., Cominelli, M., Alfaro-Cervello, C., Cursi, M., Pala, M., Bulfone, A., Garca-Verdugo, J. M., Leocani, L., Minicucci, F., Poliani, P. L., &

- Galli, R. (2011). Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.008>
- Mandy, W., & Lai, M. C. (2016). Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 57(3), 271–292. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12501>
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H., & Muotri, A. R. (2010). A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016>
- Martin, P., Wagh, V., Reis, S. A., Erdin, S., Beauchamp, R. L., Shaikh, G., Talkowski, M., Thiele, E., Sheridan, S. D., Haggarty, S. J., & Ramesh, V. (2020). TSC patient-derived isogenic neural progenitor cells reveal altered early neurodevelopmental phenotypes and rapamycin-induced MNK-eIF4E signaling. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0311-3>
- Moon, U. Y., Park, J. Y., Park, R., Cho, J. Y., Hughes, L. J., McKenna, J., Goetzl, L., Cho, S. H., Crino, P. B., Gambello, M. J., & Kim, S. (2015). Impaired Reelin-Dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex. *Cell Reports*, 12(6), 965–978. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.013>
- Munnich, A., Demily, C., Frugère, L., Duwime, C., Malan, V., Barcia, G., Vidal, C., Throo, E., Besmond, C., Hubert, L., Roland-Manuel, G., Malen, J. P., Ferreri, M., Hanein, S., Thalabard, J. C., Boddaert, N., & Assouline, M. (2019). Impact of on-site clinical genetics consultations on diagnostic rate in children and young adults with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0284-2>
- Nedergaard, M., & Verkhratsky, A. (2010). Calcium dyshomeostasis and pathological calcium signalling in neurological diseases. *Cell Calcium*, 47(2), 101–102. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.011>
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M., & D'Arcangelo, G. (2004). Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00819-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00819-5)
- O'Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., Karakoc, E., MacKenzie, A. P., Ng, S. B., Baker, C., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Bernier, R., Fisher, S. E., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature Genetics*, 43(6), 585–589. <https://doi.org/10.1038/ng.835>
- O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., ... Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature10989>
- Ognibene, E., Adriani, W., Caprioli, A., Ghirardi, O., Ali, S. F., Aloe, L., & Laviola, G. (2008). The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.03.023>
- Ouchi, N., Asami, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y., & Walsh, K. (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *Journal of Biological*

- Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069468>
- Pan, Y. H., Wu, N., & Yuan, X. B. (2019). Toward a better understanding of neuronal migration deficits in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00205>
- Paşca, S. P., Portmann, T., Voineagu, I., Yazawa, M., Shcheglovitov, A., Paşca, A. M., Cord, B., Palmer, T. D., Chikahisa, S., Nishino, S., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., Geschwind, D. H., & Dolmetsch, R. E. (2011). Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nature Medicine*, 17(12), 1657–1662. <https://doi.org/10.1038/nm.2576>
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 70, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.008>
- Peñagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L. I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J. T., Peles, E., & Geschwind, D. H. (2011). Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.040>
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. In *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2002>
- Perez-reyes, E., & Perez-reyes, E. (2003). <Perez-Reyes, T ca channels.pdf>. 117–161.
- Pinggera, A., Lieb, A., Benedetti, B., Lampert, M., Monteleone, S., Liedl, K. R., Tuluc, P., & Striessnig, J. (2015). CACNA1D de novo mutations in autism spectrum disorders activate cav1.3 l-type calcium channels. *Biological Psychiatry*, 77(9), 816–822. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.020>
- Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., Thiruvahindrapuram, B., Xu, X., Ziman, R., Wang, Z., Vorstman, J. A. S., Thompson, A., Regan, R., Pilorge, M., Pellecchia, G., Pagnamenta, A. T., Oliveira, B., Marshall, C. R., Magalhaes, T. R., ... Scherer, S. W. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*, 94(5), 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>
- Pizzo, L., Jensen, M., Polyak, A., Rosenfeld, J. A., Mannik, K., Krishnan, A., McCready, E., Pichon, O., Le Caignec, C., Van Dijck, A., Pope, K., Voorhoeve, E., Yoon, J., Stankiewicz, P., Cheung, S. W., Pazuchanics, D., Huber, E., Kumar, V., Kember, R. L., ... Girirajan, S. (2019). Rare variants in the genetic background modulate cognitive and developmental phenotypes in individuals carrying disease-associated variants. *Genetics in Medicine*, 21(4), 816–825. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0266-3>
- Proft, J., & Weiss, N. (2015). G protein regulation of neuronal calcium channels: Back to the future. *Molecular Pharmacology*, 87(6), 890–906. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096008>
- Provenzano, G., Chelini, G., & Bozzi, Y. (2017). Genetic control of social behavior: Lessons from mutant mice. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.005>
- Qiu, S., Korwek, K. M., Pratt-Davis, A. R., Peters, M., Bergman, M. Y., & Weeber, E. J. (2006). Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in Reelin haploinsufficient mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.11.001>

- Rajakulendran, S., & Hanna, M. G. (2016). The role of calcium channels in epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1), 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022723>
- Rebellato, P., Kaczynska, D., Kanatani, S., Rayyes, I. Al, Zhang, S., Villaescusa, C., Falk, A., Arenas, E., Hermanson, O., Louhivuori, L., & Uhlén, P. (2019). The T-type Ca²⁺ Channel Ca_v3.2 Regulates Differentiation of Neural Progenitor Cells during Cortical Development via Caspase-3. *Neuroscience*, 402, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.015>
- Reijnders, M. R. F., Kousi, M., Van Woerden, G. M., Klein, M., Bralten, J., Mancini, G. M. S., Van Essen, T., Proietti-Onori, M., Smeets, E. E. J., Van Gastel, M., Stegmann, A. P. A., Stevens, S. J. C., Lelieveld, S. H., Gilissen, C., Pfundt, R., Tan, P. L., Kleefstra, T., Franke, B., Elgersma, Y., ... Brunner, H. G. (2017). Variation in a range of mTOR-related genes associates with intracranial volume and intellectual disability. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00933-6>
- Rosenberg, R. E., Law, J. K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W. E., & Law, P. A. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 163(10), 907–914. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.98>
- Rosenberg, S. S., & Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004259>
- Rosolem, M. M., Rabello, L. S. C. F., Lisboa, T., Caruso, P., Costa, R. T., Leal, J. V. R., Salluh, J. I. F., & Soares, M. (2012). Critically ill patients with cancer and sepsis: clinical course and prognostic factors. *Journal of Critical Care*, 27(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.06.014>
- Ross, W. N., & Manita, S. (2012). Imaging calcium waves and sparks in central neurons. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7(10), 1087–1091. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot071480>
- Rubeis, S. De, He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., & Samocha, K. (2014). Synaptic, transcriptional, and chromatin genes disrupted in autism A. *Nature*, 515(7526), 209–215. <https://doi.org/10.14440/jbm.2015.54.A>
- Rudenko G, Henry L, Henderson K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 2002;298(5602):2353-2358. doi:10.1126/science.1078124
- Ryskalin, L., Lazzeri, G., Flaibani, M., Biagioni, F., Gambardella, S., Frati, A., & Fornai, F. (2017). mTOR-Dependent Cell Proliferation in the Brain. In *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/7082696>
- Sánchez-Sánchez, S. M., Magdalon, J., Griesi-Oliveira, K., Yamamoto, G. L., Santacruz-Perez, C., Fogo, M., Passos-Bueno, M. R., & Sertié, A. L. (2018). Rare RELN variants affect Reelin–DAB1 signal transduction in autism spectrum disorder. *Human Mutation*, 39(10), 1372–1383. <https://doi.org/10.1002/humu.23584>
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Hultman, C., Larsson, H., & Reichenberg, A. (2017). The Heritability of Autism Spectrum Disorder Analysis method B. *Jama*, 318(12), 1182–1184.
- Schaaf, C. P., Sabo, A., Sakai, Y., Crosby, J., Muzny, D., Hawes, A., Lewis, L., Akbar, H., Varghese, R., Boerwinkle, E., Gibbs, R. A., & Zoghbi, H. Y. (2011). Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders.

Human Molecular Genetics. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr243>

- Senatore, A., & Spafford, J. D. (2012). Gene transcription and splicing of T-type channels are evolutionarily-conserved strategies for regulating channel expression and gating. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037409>
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05300>
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., & Sanguinetti, M. C. (2004). Ca^v1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism ultimate signaling molecule for organisms ranging from prokaryotes to humans. In higher organisms, Ca²⁺ mediates processes as diverse as synaptic transmiss. *Cell*, 119, 19–31. <https://pdf.sciencedirectassets.com/272196/1-s2.0-S0092867400X0637X/1-s2.0-S0092867404008426/main.pdf?x-amz-security-token=AgoJb3JpZ2luX2VjEJD%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQDZZq4zN5B2QzwzRBYHHdicBY4clftFvxxwMxQnKW2WQwlhAJOx3qGFrl6l>
- Splawski, I., Yoo, D. S., Stotz, S. C., Cherry, A., Clapham, D. E., & Keating, M. T. (2006). CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 22085–22091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603316200>
- Stahl, H.-C., Butenschoen, V. M., Tran, H. T., Gozzer, E., Skewes, R., Mahendradhata, Y., Runge-Ranzinger, S., Kroeger, A., & Farlow, A. (2013). Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. *BMC Public Health*, 13(1), 1048. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1048>
- Strom, S. P., Stone, J. L., Ten Bosch, J. R., Merriman, B., Cantor, R. M., Geschwind, D. H., & Nelson, S. F. (2010). High-density SNP association study of the 17q21 chromosomal region linked to autism identifies CACNA1G as a novel candidate gene. *Molecular Psychiatry*, 15(10), 996–1005. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.41>
- Szatmari, P., Georgiades, S., Duku, E., Bennett, T. A., Bryson, S., Fombonne, E., Mirenda, P., Roberts Md, W., Smith, I. M., Vaillancourt, T., Volden, J., Waddell, C., Zwaigenbaum, L., Elsabbagh, M., & Thompson, A. (2015). Developmental trajectories of symptom severity and adaptive functioning in an inception cohort of preschool children with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 72(3), 276–283. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.2463>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takata, A., Miyake, N., Tsurusaki, Y., Fukai, R., Miyatake, S., Koshimizu, E., Kushima, I., Okada, T., Morikawa, M., Uno, Y., Ishizuka, K., Nakamura, K., Tsujii, M., Yoshikawa, T., Toyota, T., Okamoto, N., Hiraki, Y., Hashimoto, R., Yasuda, Y., ... Matsumoto, N. (2018). Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.074>
- Tang, L., Gamal El-Din, T. M., Payandeh, J., Martinez, G. Q., Heard, T. M., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2014). Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, 505(7481), 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature12775>
- Tian, Y., Voineagu, I., Pasca, S. P., Won, H., Chandran, V., Horvath, S., Dolmetsch, R.

- E., & Geschwind, D. H. (2014). Alteration in basal and depolarization induced transcriptional network in iPSC derived neurons from Timothy syndrome. *Genome Medicine*, 6(10), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0075-5>
- Van Den Bossche, M. J., Strazisar, M., De Bruyne, S., Bervoets, C., Lenaerts, A.-S., De Zutter, S., Nordin, A., Norrback, K.-F., Goossens, D., De Rijk, P., Green, E. K., Grozeva, D., Mendlewicz, J., Craddock, N., Sabbe, B. G., Adolfsson, R., Souery, D., & Del-Favero, J. (2012). Identification of a CACNA2D4 deletion in late onset bipolar disorder patients and implications for the involvement of voltage-dependent calcium channels in psychiatric disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 159B(4), 465–475. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32053>
- Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., Lolli, F., Marcello, E., Sironi, L., Vegeto, E., & Maggi, A. (2018). Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Reports*, 23(12), 3501–3511. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.048>
- Wang, Z., Hong, Y., Zou, L., Zhong, R., Zhu, B., Shen, N., Chen, W., Lou, J., Ke, J., Zhang, T., Wang, W., & Miao, X. (2014). Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: An integrated meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32222>
- Weiss, N., & Zamponi, G. W. (2020). Genetic T-type calcium channelopathies. *J Med Genet*, 57, 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106163>
- Werling, D. M. (2016). The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biology of Sex Differences*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0112-8>
- Werling, D. M., Parikshak, N. N., & Geschwind, D. H. (2016). Gene expression in human brain implicates sexually dimorphic pathways in autism spectrum disorders. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10717>
- Wycisk, K. A., Zeitz, C., Feil, S., Wittmer, M., Forster, U., Neidhardt, J., Wissinger, B., Zrenner, E., Wilke, R., Kohl, S., & Berger, W. (2006). Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1086/508944>
- Y, W. (2017). Involvement of Calcium, Ras, MAPK, PI3K-Akt and mTOR Signaling Pathways in Autism Spectrum Disorders. *Neurology & Neurotherapy Open Access Journal*, 2(1). <https://doi.org/10.23880/nnoaj-16000110>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Yasui, N., Nogi, T., Kitao, T., Nakano, Y., Hattori, M., & Takagi, J. (2007). Structure of a receptor-binding fragment of reelin and mutational analysis reveal a recognition mechanism similar to endocytic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700438104>
- Yasui, N., Nogi, T., & Takagi, J. (2010). Structural Basis for Specific Recognition of Reelin by Its Receptors. *Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.010>
- Yuen, R. K. C., Merico, D., Bookman, M., Howe, J. L., Thiruvahindrapuram, B., Patel, R. V., Whitney, J., Deflaux, N., Bingham, J., Wang, Z., Pellecchia, G., Buchanan, J. A., Walker, S., Marshall, C. R., Uddin, M., Zarrei, M., Deneault, E., D'Abate, L., Chan, A. J. S., ... Scherer, S. W. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature*

- Neuroscience*, 20(4), 602–611. <https://doi.org/10.1038/nn.4524>
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A. C., Xu, B., Chen, S., Luo, Y., Chen, Z., Liu, L. L., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Chen, L., Huang, S., Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., ... Bourgeron, T. (2014). Getting to the Cores of Autism. *Nature Genetics*, 6(4), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.002>
- Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C. H., Zhang, W., Sinton, C., Powell, C. M., & Parada, L. F. (2009). Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific PTEN knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009>

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1. Comparative analysis of the electrostatic potentials (EP) between wild-type and mutant Cav3.2 channels reveals that the insertion perturbs the EP surface of domains I-III. The EP surface diagrams of the wild type (A) and mutant (B) proteins, as well as of domain II at the inner membrane side, calculated by Pymol are shown. Red, blue and gray indicate negative, positive and neutral surfaces, respectively. (C) The EP values observed on the surfaces of each domain are shown.

Supplementary Figure 2

(D)

Splice site mutation predictions with the usage of Human Splicing Finder bioinformatics algorithms.

Variant in CACNA2D4	Predicted signal	Prediction algorithm	Interpretation	
c.2095C>T	New ESS Site	Sironi et al. - Motif 1 IIEs from Zhang et al. ESR Sequences from Goren et al.	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.	
Branch Points calculation				
	Branch Point motif	CV for reference sequence (0-100)	CV for mutant sequence (0-100)	Variation
c.2095C>T	AGCTCAG	88.45	64.61	Site broken
Silencer motifs from Sironi Silencer motifs from Sironi et al.; IIEs from Zhang et al. and Goren et al.				
	Sironi Mutant motif	Mutant silencer (value 0-100)	Variation	
c.2095C>T	Motif 1 - CTAGAGGT	CCGGAAGT (64.15)	New site 2.93	

Supplementary Figure 2. 3D model of the mutant VLDLR reveals significant structural changes and splice-site prediction programs reveal that the variant in *CACNA2D4* creates an exonic splicing silencer. (A) 3D model of VLDLR based on structural coordinates of the human LDLR ectodomain (PDB 1n7d) showing the LDLR type-A (LA) repeats (R2-R7), the C-domain, the β -propeller domain, and the EGF-A and EGF-B repeats. The p.Arg634His substitution is located within the β -propeller domain, and the p.Tyr378His substitution is located within the EGF-A domain (in orange spheres). (B) Structural features of the β -propeller domain with 6 symmetrical blade-shaped β -sheets (β 1-6). Residue Arg634, located in β 4 (pale pink), makes three hydrogen bonds with residue Asp594 in β 5 (pale yellow) and connects β 4 and β 5 blades. In detail, β 4 and β 5 blades showing that the p.Arg634His substitution (mutated β 4 in green) disrupt the hydrogen bonds between the Arg634 and Asp594 residues, which may lead to important structural and functional modifications of the β -propeller domain. (C) This panel shows the 3D structure of the β -propeller (deep green) and EGF-A and -B domains of LDLR resolved in complex with PCSK9 (pale yellow cartoon) (PDB 3m0c) showing that EGF-A is the region of interaction with PCSK9. Ca^{2+} ions are shown as pink spheres. In detail the same domains are showed for the VLDLR model. The Tyr378His substitution (orange sphere) is located exactly in the EGF-A and slightly alters the electrostatic potential of this domain (values below the figures), which may affect the interactions between VLDLR and its ligands. Red: negative charge, blue: positive charge and gray: neutral. (D) The bioinformatics analysis with Human Splicing Finder predicted that the c.2095C>T variant in the *CACNA2D4* gene creates an exonic splicing silencer (ESS) motif in exon 22 (according to the prediction algorithms described in Sironi, et al. 2004; Zhang, et al. 2004; Goren, et al. 2006), which may affect the exon usage and protein function.

Supplementary Table 1

Supplementary Table 1. List of genes screened for the presence of co-occurring rare and potentially protein-damaging variants in ASD patients.

<i>CACNA1A</i>	<i>CACNA2D1</i>	<i>CACNG1</i>	<i>ITPR1</i>	<i>CASK</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>CRK</i>	<i>MTOR</i>	<i>RPS6KA1</i>
<i>CACNA1B</i>	<i>CACNA2D2</i>	<i>CACNG2</i>	<i>ITPR2</i>	<i>CREBBP</i>	<i>PSEN1</i>	<i>NCK2</i>	<i>RPS6</i>	<i>RPS6KA2</i>
<i>CACNA1C</i>	<i>CACNA2D3</i>	<i>CACNG3</i>	<i>ITPR3</i>	<i>DAB1</i>	<i>RELN</i>	<i>RAP1A</i>	<i>TBC1D7</i>	<i>RPS6KA3</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>CACNA2D4</i>	<i>CACNG4</i>	<i>RYR1</i>	<i>FYN</i>	<i>SRC</i>	<i>PTEN</i>	<i>MLST8</i>	
<i>CACNA1E</i>	<i>CACNB1</i>	<i>CACNG5</i>	<i>RYR2</i>	<i>GRIN1</i>	<i>VLDLR</i>	<i>PDK1</i>	<i>PRKAA1</i>	
<i>CACNA1F</i>	<i>CACNB2</i>	<i>CACNG6</i>	<i>RYR3</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>APOE</i>	<i>TSC1</i>	<i>PRKAA2</i>	
<i>CACNA1G</i>	<i>CACNB3</i>	<i>CACNG7</i>	<i>TPCN1</i>	<i>GRIN2B</i>	<i>AKT</i>	<i>TSC2</i>	<i>PRKAB1</i>	
<i>CACNA1H</i>	<i>CACNB4</i>	<i>CACNG8</i>	<i>TPCN2</i>	<i>GRIN3A</i>	<i>TBR1</i>	<i>RHEB</i>	<i>PIK3CA</i>	
<i>CACNA1I</i>	<i>CAMK2A</i>	<i>CAMK2G</i>	<i>ORAI1</i>	<i>ITGA3</i>	<i>TP73</i>	<i>RPTOR</i>	<i>RAS</i>	
<i>CACNA1S</i>	<i>CAMK2B</i>	<i>ORAI3</i>	<i>ORAI2</i>	<i>LRP8</i>	<i>GRIN2D</i>	<i>DEPTOR</i>	<i>MAPK1</i>	

CAPÍTULO 4 – Discussão geral e conclusões

Discussão Geral e Conclusões

O grande desafio atual no estudo da genética do Transtorno do Espectro Autista (TEA) é determinar quais dentre as diversas variantes genéticas identificadas pelas análises genômicas em larga escala são as que estão de fato envolvidas na etiologia da doença, quantas variantes são necessárias para a penetrância completa do TEA, e como essas variantes convergem em vias biológicas comuns que resultam na doença em cada paciente. Poucos estudos até o presente momento exploraram as interações genéticas entre as diferentes variantes raras e potencialmente deletérias encontradas nos pacientes, o que é um passo essencial para se entender a herança complexa do TEA.

Por meio do sequenciamento do exoma completo de 30 pacientes brasileiros com TEA e seus genitores (30 trios), nosso grupo de pesquisa identificou em um paciente com TEA e macrocefalia, denominado F2688, variantes raras em dois genes candidatos ao TEA: *RELN*, que codifica a proteína Relina, e *CACNA1H*, que codifica o canal de cálcio (Ca^{2+}) dependente de voltagem do tipo T Cav3.2 (Sánchez-Sánchez et al., 2018; da Silva Montenegro et al., 2020; Griesi-Oliveira et al., 2020).

Um estudo prévio de nosso grupo, utilizando como modelo experimental células neuroprogenitoras (NPCs) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) do paciente F2688 e de indivíduos controles, já havia mostrado que as variantes identificadas no gene *RELN* são deletérias, levam à diminuição da secreção da Relina para o meio extracelular e ao mal funcionamento de sua via de sinalização intracelular (caracterizada pela diminuição dos níveis de fosforilação das proteínas intracelulares FYN, SRC e DAB1, *downstream* à Relina). Ainda, foi mostrado que a via de sinalização mTORC1 estava superativa nas NPCs do paciente F2688 e funcionava com um “segundo hit”, acentuando a deficiência da via da Relina por ativar CUL5, uma ubiquitina ligase regulada positivamente pela via mTORC1 que é responsável pela degradação de FYN, SRC e DAB1 fosforiladas (Sánchez-Sánchez et al., 2018).

No presente estudo, descrevemos a análise funcional da variante rara *de novo* presente no gene *CACNA1H* do paciente F2688. Essa variante está

localizada no sítio doador de *splicing* do intron 13 do gene. Utilizando as NPCs derivadas do paciente F2688 e de indivíduos controles, mostramos que essa variante leva à retenção do intron 13 (que apresenta 156 pb) no transcrito maduro, o que é previsto causar uma inserção *in frame* de 52 novos resíduos de aminoácidos no domínio de formação de poro do canal Cav3.2.

Mostramos que as NPCs derivadas do paciente F2688 apresentam influxo de Ca^{2+} aumentado através do canal Cav3.2 mutado, o que leva a superativação da via de sinalização mTORC1 e, conseqüentemente, agrava ainda mais o comprometimento da via de sinalização da Relina. A expressão heteróloga do canal Cav3.2 mutado em células HEK293T confirmou esses resultados, e a estrutura do modelo 3D do canal mutado sugeriu que o poro do canal está aumentado em diâmetro quando comparado ao poro do canal Cav3.2 selvagem, o que é consistente com o maior influxo de Ca^{2+} observado tanto nas NPCs derivadas do paciente F2688 como nas células HEK293T superexpressando o canal Cav3.2 mutado.

Mostramos também que o aumento da sinalização da via mTORC1 mediada pelo maior influxo de Ca^{2+} pelo canal Cav3.2 mutado atua de forma individual na maior proliferação das NPCs derivadas do paciente F2688 e de forma aditiva com a sinalização deficiente da Relina na migração anormal dessas células. Assim, nossos resultados sugerem que existe um *crosstalk* anormal entre *RELN* e *CACNA1H* mutados por meio da via mTORC1, e que ambos os genes devem agir conjuntamente e contribuir para o desenvolvimento do TEA no paciente F2688 em um modelo oligogênico de herança.

Por fim, por meio da análise dos dados de sequenciamento do exoma completo de mais 100 pacientes brasileiros com TEA e seus pais (100 trios), identificamos um outro paciente, denominado F10832, que apresenta variantes raras em dois genes: *VLDLR*, que codifica um dos receptores da Relina, e *CACNA2D4*, que codifica a subunidade $\alpha 2\delta$ de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L. O modelamento da proteína VLDLR mutada sugeriu que as variantes identificadas têm grande potencial de mudar significativamente a estrutura do receptor e/ou sua interação com ligantes específicos; e a análise de predição de sítios de *splicing* sugeriu que a variante no *CACNA2D4* tem potencial de criar um sítio silenciador de *splicing* no exon 22 do gene, o qual é predito

alterar o quadro de leitura de mRNA e criar um código prematuro de parada a tradução. Esses resultados sugerem a ocorrência não aleatória de variantes deletérias em genes que codificam componentes da via da Relina e canais de Ca^{2+} em pacientes com TEA. Neste sentido, estudos funcionais que comprovem a patogenicidade das variantes encontradas nos genes *VLDLR* e *CACNA2D4* e que investiguem se essas variantes agem de forma aditiva para causar anormalidades celulares que possam estar envolvidas na etiologia do TEA no paciente F10832 serão muito importantes.

Variantes raras de substituição de aminoácidos no gene *CACNA1H* foram previamente relatadas em pacientes com TEA (Splawski et al., 2006; Devlin et al., 2012; O'Roak et al., 2012; R. Chen et al., 2017; Munnich et al., 2019). No entanto, muitas dessas variantes apresentam penetrância reduzida e não segregam com o transtorno nas famílias afetadas, o que sugere que elas contribuam para a susceptibilidade ao TEA, mas que individualmente não são suficientes para causar TEA. Análises eletrofisiológicas de algumas dessas variantes usando um sistema de expressão heteróloga em células não neurais revelou que os canais Cav3.2 mutados conduziam substancialmente menos corrente que os canais do tipo selvagem. No entanto, duas dessas variantes localizadas na região de detecção de tensão do canal Cav3.2 (domínio S4) também diminuía as taxas de inativação dos canais mutados e, portanto, eram esperadas permitir maior influxo de Ca^{2+} pelos canais ativados (Splawski et al., 2006). Assim, análises biofísicas detalhadas que investigam em condições mais fisiológicas os efeitos das variantes em Cav3.2 associadas ao TEA ainda são necessárias para entender suas características e seus impactos na excitabilidade e função de células neurais.

Embora o paciente F2688 não apresente epilepsia, diversas variantes raras e potencialmente de risco foram também descritas por toda a sequência do gene *CACNA1H* em pacientes com diferentes tipos de epilepsia (Y. Chen et al., 2003; Heron et al., 2004, 2007; Khosravani et al., 2004; Liang et al., 2006). Análises eletrofisiológicas de células expressando vários dos canais mutados são geralmente consistentes com um ganho de função dos canais, embora em alguns casos também tenham sido observadas alterações compatíveis com perda de função dos canais (Heron et al., 2007). No entanto, assim como as

variantes em *CACNA1H* associadas ao TEA, as variantes associadas às síndromes de epilepsia geralmente mostram segregação incompleta com o distúrbio, sugerindo que sua contribuição para a epilepsia também deva depender de fatores genéticos e/ou ambientais adicionais (Weiss & Zamponi, 2020).

Variantes de risco tanto raras como comuns em outros genes que codificam canais de Ca^{2+} (*CACNA1G*, *CACNA1I*, *CACNA1D*, *CACNA2D3*, e *CACNB2*) também já foram descritas em pacientes com TEA (Strom et al., 2010; Iossifov et al., 2012; Lu et al., 2012; Chuang et al., 2013; Girirajan et al., 2013; Breitenkamp et al., 2014). A análise funcional de algumas dessas variantes mostrou alterações compatíveis com ganho ou perda de função dos canais mutados (Breitenkamp et al., 2014; Pinggera et al., 2015). Assim, os estudos acima mencionados sugerem que perturbações na homeostase intracelular de Ca^{2+} devidas a disfunções nos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem podem afetar processos do desenvolvimento neurológico que contribuem para o TEA.

Pacientes com TEA podem apresentar um número aumentado de neurônios no cérebro, o que foi sugerido contribuir para o crescimento cerebral exacerbado observado durante os primeiros anos de vida dos pacientes (Courchesne et al., 2011). Como as vias de sinalização de Ca^{2+} e mTORC1 regulam a proliferação de células neurais (Spitzer, 2006; Ryskalin et al., 2017) e a hiperativação da via mTORC1 já foi associada ao crescimento anormal do cérebro (Zhou et al., 2009; Reijnders et al., 2017), é possível que o aumento da proliferação das NPCs derivadas do paciente F2688 contribua para a macrocefalia observada no paciente. Ainda, achados neuropatológicos sugestivos de alterações na migração de células neurais foram descritos em diversos pacientes com TEA (Pan et al., 2019), e diferentes modelos animais de TEA portadores de variantes deletérias causadoras do transtorno em humanos (como nos genes *CNANAP2*, *TSC1*, *CDH8*) apresentam alterações na migração de células neurais (Feliciano et al., 2012; Peñagarikano et al., 2011; Moon et al., 2015; Provenzano et al., 2017; Xu et al., 2018). Assim sendo, é possível que a migração anormal das NPCs derivadas do paciente F2688 devida ao influxo aumentado de Ca^{2+} nas células, que superativa a via mTORC1 e, conseqüentemente, acentua o mal funcionamento da via da Relina, possa

também contribuir para o desenvolvimento do TEA no paciente F2688.

É importante comentar um estudo recente que utilizou camundongos modelos para Complexo Esclerose Tuberosa (síndrome monogênica que apresenta alta prevalência de TEA no quadro clínico e é causada por variantes patogênicas nos genes *TSC1* e *TSC2*), os quais apresentam hiperativação constitutiva da via mTORC1. Os autores mostraram que as alterações em migração de células neurais e a consequente desorganização da citoarquitetura do córtex cerebral apresentadas pelos camundongos eram devidas à deficiência na via de sinalização da Relina, a qual por sua vez estava alterada pela maior expressão de CUL5, ubiquitina ligase que degrada FYN, SRC e DAB1 fosforiladas, devido à superativação da via mTORC1. A inibição da atividade de mTORC1 com rapamicina conseguiu restaurar a deficiência da via da Relina (Moon et al., 2015). Assim, a interação entre a via mTORC1 e da Relina levando a migração alterada de células neurais já havia sido descrita como um mecanismo patofisiológico associado a uma forma de TEA sindrômico.

A existência de um modelo oligogênico de herança para o TEA foi revelada por uma série de estudos que mostraram que um mesmo paciente pode apresentar variantes deletérias em mais de um gene de risco para o transtorno (O'Roak et al., 2011; Schaaf et al., 2011; Leblond et al., 2012; Rubeis et al., 2014; Zamponi et al., 2014; Krumm et al., 2015). Além disso, estudos mais recentes usando dados de microarranjos em larga escala e de sequenciamento de exoma ou genoma completos sugerem que existe uma correlação negativa entre o número de genes com variantes deletérias (*hits*) e o coeficiente de inteligência (QI) do paciente (Du et al., 2019; Pizzo et al., 2019), o que indica efeitos aditivos ou epistáticos dessas variantes. Ainda, esses estudos sugerem que os genes envolvidos nesse modelo de vários *hits* (oligogênico) mostram maior conectividade funcional, medida por redes de interação proteína-proteína e de coexpressão (Du et al., 2019). Assim sendo, os resultados descritos no presente trabalho de mestrado (envolvendo tanto o paciente F2688 como o paciente F10832) corroboram os achados desses estudos genômicos conduzidos com um grande número de pacientes com TEA, e sustentam a hipótese de que genes com variantes deletérias presentes em um mesmo paciente tendem a interagir e participar de vias biológicas comuns.

Du e colaboradores (2019) mostraram recentemente que tanto o gene *CACNA1H* quanto o gene *RELN* estão envolvidos no modelo oligogênico de herança para o TEA, e que variantes deletérias foram encontradas nos genes *CACNA1H* e *SETX* em um paciente com TEA e nos genes *RELN* e *DIP2A* em outro paciente com o transtorno. Embora ainda seja desconhecido se essas variantes interagem de alguma forma, é interessante notar que o gene *DIP2A* também está envolvido na estimulação da sinalização Akt/mTOR (Ouchi et al., 2010) e, portanto, é tentador especular que *RELN* e *DIP2A* também possam interagir por meio da via de sinalização mTORC1, o que também corrobora com a hipótese de que os genes de risco ao TEA interagem por meio de vias biológicas convergentes.

Em conclusão, nossos resultados fornecem evidências diretas de que a variante identificada no paciente F2688 no gene *CACNA1H* causa maior influxo de Ca^{2+} pelo canal Cav3.2 mutado nas NPCs derivadas desse paciente, o que superativa a via de sinalização mTORC1 e, conseqüentemente, exacerba o mal funcionamento da via da Relina, a qual já está deficiente devido às variantes no gene *RELN* presentes no paciente. Nossos resultados sugerem também que o hiperfuncionamento da via mTORC1 mediada pelo maior influxo de Ca^{2+} age de forma independente da via da Relina na maior proliferação das NPCs derivadas do paciente F2688 e de forma aditiva à sinalização deficiente da Relina na migração anormal dessas células. Assim, nossos resultados elucidam o mecanismo molecular do modelo oligogênico de herança em um paciente com TEA, no qual variantes com efeito deletério moderado e penetrância incompleta são individualmente insuficientes para causar o quadro clínico completo, mas juntas podem agir de forma aditiva para desestabilizar o desenvolvimento neural resultando no transtorno.

Resumo

Estudo funcional de variantes raras nos genes *CACNA1H* e *RELN*: um modelo oligogênico de herança no Transtorno do Espectro Autista

Teles e Silva AL^{1,2}; Glaser T³, Griesi-Oliveira K¹, Corrêa J³, Ulrich H³, Balan A⁴, Gabriele da Silva Campos², Passos-Bueno MR², Sertié AL¹

1 – Hospital Israelita Albert Einstein, Centro de Pesquisa Experimental, São Paulo, Brasil

2- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

3 - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

4 - Instituto de Ciências Biomédicas., Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Os estudos de análise genômica em larga escala em pacientes com Transtorno do Espectro Autista (TEA) têm revelado, em uma fração dos pacientes, evidências do modo oligogênico de herança, no qual dois ou mais genes mutados, individualmente insuficientes para causar TEA, podem atuar de forma aditiva ou sinérgica para resultar no fenótipo clínico. No entanto, até o momento pouco se sabe sobre como essas variantes de risco ao TEA interagem e convergem em vias neurobiológicas específicas que levam ao transtorno. No presente trabalho, descrevemos a caracterização funcional de uma variante *de novo* em um sítio de *splicing* do gene *CACNA1H*, o qual codifica o canal de cálcio (Ca²⁺) dependente de voltagem Cav3.2, identificado em um paciente com TEA que também é portador de variantes *missense* deletérias no gene *RELN* (Relina). Usando células progenitoras neurais (NPCs) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas desse paciente e de indivíduos controles, bem como um sistema de expressão heteróloga, mostramos que a variante em *CACNA1H* é deletéria e leva ao aumento do influxo de Ca²⁺ nas células, o que hiperativa a via de sinalização do mTORC1 e, conseqüentemente, exacerba o mal funcionamento da via de sinalização da Relina. Além disso, mostramos que a hiperativação da via mTORC1 induzida pelo influxo elevado de Ca²⁺ por meio do canal Cav3.2 mutado atua individualmente para induzir proliferação aumentada das NPCs derivadas do paciente, ou em conjunto com a sinalização deficiente da Relina para causar migração anormal dessas células. Por fim, analisando dados de sequenciamento do exoma completo de um grupo diferente de 100 pacientes com TEA e seus genitores (100 trios), descrevemos em outro paciente com TEA variantes raras e potencialmente deletérias nos genes *VLDLR* e *CACNA2D4*, que codificam o receptor da Relina e a subunidade $\alpha 2\delta 4$ de canais Ca²⁺ respectivamente. Em conjunto, nossos resultados sugerem uma interação funcional anormal entre os genes *CACNA1H* e *RELN* mutados, e a co-ocorrência não aleatória de variantes raras e potencialmente patogênicas em genes da via da Relina e de canais de Ca²⁺, que parecem atuar de forma aditiva para aumentar o risco de TEA.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista, modelo oligogênico de herança, gene *CACNA1H*, gene *RELN*, sinalização mTORC1.

Abstract

Functional study of rare variants in the *CACNA1H* and *RELN* genes: an oligogenic model of inheritance for Autism Spectrum Disorder

Teles e Silva AL^{1,2}; Glaser T³, Griesi-Oliveira K¹, Corrêa J³, Ulrich H³, Balan A⁴, Gabriele da Silva Campos², Passos-Bueno MR², Sertié AL¹

1 – Hospital Israelita Albert Einstein, Centro de Pesquisa Experimental, São Paulo, Brasil

2- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

3 - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

4 - Instituto de Ciências Biomédicas., Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Analysis of rare genetic variants in autism spectrum disorder (ASD) cohorts has found in a fraction of patients evidence of an oligogenic mode of inheritance, in which two or more mutated genes, individually not sufficient to cause ASD, may act additively or synergistically to produce the clinical phenotype. However, currently little is known about how these ASD-risk variants interact with each other and converge on specific neurobiological pathways underlying ASD. Here, we describe the molecular characterization of a *de novo* splice site variant in the *CACNA1H* gene, which encodes the voltage-gated calcium (Ca²⁺) channel Cav3.2, identified in an ASD patient who also carries previously characterized disruptive missense variants in the Reelin (*RELN*) gene. Using induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived neural progenitor cells (NPCs) from this patient and from control individuals as well as a heterologous expression system, we show that the variant in *CACNA1H* is deleterious and leads to increased Ca²⁺ influx into the cells, which overactivates mTORC1 signaling pathway and, consequently, further exacerbates the impairment of Reelin signaling. Also, we showed that overactivation of mTORC1 signaling induced by elevated Ca²⁺ influx through mutant Cav3.2 acts individually to induce enhanced proliferation of patient's NPCs and in concert with impaired Reelin signaling to cause abnormal migration of these cells. Finally, using whole exome sequencing data from a new cohort of 100 ASD proband-parent trios, we describe potentially damaging variants in the *VLDLR* and *CACNA2D4* genes, which encode for the Reelin receptor and the Ca²⁺ channel auxiliary $\alpha 2\delta 4$ subunit respectively, in one patient with ASD. Altogether, our results suggest an abnormal functional connectivity between mutated *CACNA1H* and *RELN* genes, and also the nonrandom co-occurrence of rare and potentially damaging variants in genes for the Reelin pathway and Ca²⁺ channels, which may act additively to increase the risk for ASD.

Key-words: Autism Spectrum Disorder, oligogenic mode of inheritance, *CACNA1H* gene, *RELN* gene, mTORC1 signaling.

Referências Bibliográficas GERAIS

- Aldinger, K. A., Lane, C. J., Veenstra-VanderWeele, J., & Levitt, P. (2015). Patterns of Risk for Multiple Co-Occurring Medical Conditions Replicate Across Distinct Cohorts of Children with Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*, 8(6), 771–781. <https://doi.org/10.1002/aur.1492>
- American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. DSM-IV-TR. In *American Journal of Critical Care*. <https://doi.org/10.1176/dsm.10.1176/appi.books.9780890420249.dsm-iv-tr>
- American Psychiatric Association. (2013). American Psychiatric Association, 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). In *American Journal of Psychiatry*. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- Arikkath, J., & Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: Essential components of the voltage-gated calcium channel complex. In *Current Opinion in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(03\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(03)00066-7)
- Armstrong, C. M., & Matteson, D. R. (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science*, 227(4682), 65–67. <https://doi.org/10.1126/science.2578071>
- Bai, D., Yip, B. H. K., Windham, G. C., Sourander, A., Francis, R., Yoffe, R., Glasson, E., Mahjani, B., Suominen, A., Leonard, H., Gissler, M., Buxbaum, J. D., Wong, K., Schendel, D., Kodesh, A., Breshnahan, M., Levine, S. Z., Parner, E. T., Hansen, S. N., ... Sandin, S. (2019). Association of Genetic and Environmental Factors with Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, 76(10), 1035–1043. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2019.1411>
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (2013). Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a british twin study. *The Science of Mental Health: Volume 2: Autism*, 91–105.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Rosenberg, C. R., White, T., Durkin, M. S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L. C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R. T., Hewitt, A., ... Dowling, N. F. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(6). <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>
- Bean, B. P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells: Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *Journal of General Physiology*, 86(1), 1–30. <https://doi.org/10.1085/jgp.86.1.1>
- Bijlenga, P., Liu, J. H., Espinos, E., Haenggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R., & Bernheim, L. (2000). T-type α_1H Ca^{2+} channels are involved in Ca^{2+} signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7627–7632. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7627>
- Blankenship, A. G., & Feller, M. B. (2010). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(1), 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrn2759>
- Blumberg, S. J., Bramlett, M. D., Kogan, M. D., Schieve, L. a, Jones, J. R., & Lu, M. C. (2013). Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in

- school-aged U.S. children: 2007 to 2011– 2012. *National Health Statistics Reports*, 65, 1–12.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 551–563. <https://doi.org/10.1038/nrn3992>
- Breitenkamp, A. F. S., Matthes, J., Nass, R. D., Sinzig, J., Lehmkuhl, G., Nürnberg, P., & Herzig, S. (2014). Rare mutations of CACNB2 found in autism spectrum disease-affected families alter calcium channel function. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095579>
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), 2787–2814. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1550-7>
- Catterall, W. A. (2010). Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neuroscience Letters*, 486(2), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.085>
- Catterall, W. A., Leal, K., & Nanou, E. (2013). Calcium channels and short-term synaptic plasticity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10742–10749. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.411645>
- Chen, R., Davis, L. K., Guter, S., Wei, Q., Jacob, S., Potter, M. H., Cox, N. J., Cook, E. H., Sutcliffe, J. S., & Li, B. (2017). Leveraging blood serotonin as an endophenotype to identify de novo and rare variants involved in autism. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0130-3>
- Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W. H. Y., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y., & Wu, X. (2003). Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Annals of Neurology*, 54(2), 239–243. <https://doi.org/10.1002/ana.10607>
- Chilian, B., Abdollahpour, H., Bierhals, T., Haltrich, I., Fekete, G., Nagel, I., Rosenberger, G., & Kutsche, K. (2013). Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clinical Genetics*. <https://doi.org/10.1111/cge.12105>
- Chuang, Y.-C., Lin, Y.-S., Liu, C.-C., Liu, H.-S., Liao, S.-H., Shi, M.-D., Lei, H.-Y., & Yeh, T.-M. (2013). Factors contributing to the disturbance of coagulation and fibrinolysis in dengue virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 112(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2012.10.013>
- Chung, N. C., Huang, Y. H., Chang, C. H., Liao, J. C., Yang, C. H., Chen, C. C., & Liu, I. Y. (2015). Behavior training reverses asymmetry in hippocampal transcriptome of the Cav3.2 knockout mice. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118832>
- Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S., Garnett, T., Ronald, A., Plomin, R., Rijdsdijk, F., Happé, F., & Bolton, P. (2015). Heritability of autism spectrum disorder in a UK population-based twin sample. *JAMA Psychiatry*, 72(5), 415–423. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3028>
- Constantino, J. N. (2011). The quantitative nature of autistic social impairment. *Pediatric Research*, 69(5 PART 2), 55–62. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318212ec6e>
- Conus, N. M., Hemmings, B. A., & Pearson, R. B. (1998). Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70(S6k). *Journal of Biological Chemistry*, 273(8), 4776–4782.

<https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4776>

- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., Barnes, C. C., & Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1638>
- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M., & Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80860-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80860-0)
- D'Gama, A. M., Pochareddy, S., Li, M., Jamuar, S. S., Reiff, R. E., Lam, A. T. N., Sestan, N., & Walsh, C. A. (2015). Targeted DNA Sequencing from Autism Spectrum Disorder Brains Implicates Multiple Genetic Mechanisms. *Neuron*, 88(5), 910–917. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.009>
- da Silva Montenegro, E. M., Costa, C. S., Campos, G., Scliar, M., Almeida, T. F., Zachi, E. C., Silva, I. M. W., Chan, A. J. S., Zarrei, M., Lourenço, N. C. V., Yamamoto, G. L., Scherer, S., & Passos-Bueno, M. R. (2020). Meta-Analyses Support Previous and Novel Autism Candidate Genes: Outcomes of an Unexplored Brazilian Cohort. *Autism Research*, 13(2), 199–206. <https://doi.org/10.1002/aur.2238>
- DeLano, W. L. (2002). Unraveling hot spots in binding interfaces: Progress and challenges. In *Current Opinion in Structural Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00283-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00283-X)
- Devlin, B., Boone, B. E., Levy, S. E., Lihm, J., Buxbaum, J. D., Wu, Y., Lewis, L., Han, Y., Boerwinkle, E., Gibbs, R. A., Fromer, M., Shakir, K., Fennell, T., Garimella, K., Banks, E., Poplin, R., Gabriel, S., De Pisto, M., Sunyaev, S., & Daly, M. J. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. In *Nature* (Vol. 485, Issue 7397, pp. 242–246). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature11011>
- Dreyfus, F. M., Tscherter, A., Errington, A. C., Renger, J. J., Shin, H. S., Uebele, V. N., Crunelli, V., Lambert, R. C., & Leresche, N. (2010). Selective T-type calcium channel block in thalamic neurons reveals channel redundancy and physiological impact of ITwindow. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4305-09.2010>
- Du, Y., Li, Z., Liu, Z., Zhang, N., Wang, R., Li, F., Zhang, T., Jiang, Y., Zhi, X., Wang, Z., & Wu, J. (2019). Nonrandom occurrence of multiple de novo coding variants in a proband indicates the existence of an oligogenic model in autism. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0610-2>
- Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., & Tsien, R. W. (1995). Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron*, 15(5), 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90100-0)
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- Fatemi, S. H., Snow, A. V., Stary, J. M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T. J., Lee, S., Brooks, A. I., & Pearce, D. A. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.018>
- Feliciano, D. M., Quon, J. L., Su, T., Taylor, M. M., & Bordey, A. (2012). Postnatal neurogenesis generates heterotopias, olfactory micronodules and cortical infiltration following single-cell TSC1 deletion. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr511>

- Feliciano, D. M., Su, T., Lopez, J., Platel, J. C., & Bordey, A. (2011). Single-cell Tsc1 knockout during corticogenesis generates tuber-like lesions and reduces seizure threshold in mice. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI44909>
- Fombonne, E. (2004). The changing epidemiology of autism spectrum disorders. *Journal of Intellectual Disability Research*, 48, 283.
- Fraley, E. R., Burkett, Z. D., Day, N. F., Schwartz, B. A., Phelps, P. E., & White, S. A. (2016). Mice with Dab1 or Vldlr insufficiency exhibit abnormal neonatal vocalization patterns. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep25807>
- Gangarossa, G., Laffray, S., Bourinet, E., & Valjent, E. (2014). T-type calcium channel Cav3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00092>
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K., & Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, 46(8), 881–885. <https://doi.org/10.1038/ng.3039>
- Girirajan, S., Dennis, M. Y., Baker, C., Malig, M., Coe, B. P., Campbell, C. D., Mark, K., Vu, T. H., Alkan, C., Cheng, Z., Biesecker, L. G., Bernier, R., & Eichler, E. E. (2013). Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.12.016>
- Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Cooper, G. M., Antonacci, F., Siswara, P., Itsara, A., Vives, L., Walsh, T., McCarthy, S. E., Baker, C., Mefford, H. C., Kidd, J. M., Browning, S. R., Browning, B. L., Dickel, D. E., Levy, D. L., Ballif, B. C., Platky, K., Farber, D. M., ... Eichler, E. E. (2010). A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nature Genetics*, 42(3), 203–209.
<https://doi.org/10.1038/ng.534>
- Graves, L. M., He, Y., Lambert, J., Hunter, D., Li, X., & Earp, H. S. (1997). An intracellular calcium signal activates p70 but not p90 ribosomal S6 kinase in liver epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1920>
- Griesi-Oliveira, K., Fogo, M. S., Pinto, B. G. G., Alves, A. Y., Suzuki, A. M., Morales, A. G., Ezquina, S., Sosa, O. J., Sutton, G. J., Sunaga-Franze, D. Y., Bueno, A. P., Seabra, G., Sardinha, L., Costa, S. S., Rosenberg, C., Zachi, E. C., Sertie, A. L., Martins-de-Souza, D., Reis, E. M., ... Passos-Bueno, M. R. (2020). Transcriptome of iPSC-derived neuronal cells reveals a module of co-expressed genes consistently associated with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0669-9>
- Gulati, P., Gaspers, L. D., Dann, S. G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F., Kozma, S. C., Thomas, A. P., & Thomas, G. (2008). Amino Acids Activate mTOR Complex 1 via Ca²⁺/CaM Signaling to hVps34. *Cell Metabolism*, 7(5), 456–465.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.002>
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Grether, J. K., & Risch, N. (2015). *Genetic Heritability*. 68(11), 1095–1102.
<https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
- Hannan, K. M., Thomas, G., & Pearson, R. B. (2003). Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event

- involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20021709>
- Heron, S. E., Khosravani, H., Varela, D., Bladen, C., Williams, T. C., Newman, M. R., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Mulley, J. C., & Zamponi, G. W. (2007). Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.21169>
- Heron, S. E., Phillips, H. A., Mulley, J. C., Mazarib, A., Neufeld, M. Y., Berkovic, S. F., & Scheffer, I. E. (2004). Genetic Variation of CACNA1H in Idiopathic Generalized Epilepsy [1]. In *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.20028>
- Heyes, S., Pratt, W. S., Rees, E., Dahimene, S., Ferron, L., Owen, M. J., & Dolphin, A. C. (2015a). Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Progress in Neurobiology*, 134, 36–54. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.002>
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Al Shahwan, S., Grant, P. E., Hourihane, J. O. B., Martin, N. D. T., & Walsh, C. A. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/79246>
- Huguet, G., Benabou, M., & Bourgeron, T. (2016). The Genetics of Autism Spectrum Disorders. In P. Sassone-Corsi & Y. Christen (Eds.), *A Time for Metabolism and Hormones* (pp. 101–129). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27069-2>
- Iakoucheva, L. M., Muotri, A. R., & Sebat, J. (2019). Getting to the Cores of Autism. *Cell*, 178(6), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.037>
- Iossifov, I., Levy, D., Allen, J., Ye, K., Ronemus, M., Lee, Y. H., Yamrom, B., & Wigler, M. (2015). Low load for disruptive mutations in autism genes and their biased transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516376112>
- Iossifov, I., O’Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepier, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E., Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., ... Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515(7526), 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y. H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., ... Wigler, M. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron*, 74(2), 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009>
- Iwata, K., Izumo, N., Matsuzaki, H., Manabe, T., Ishibashi, Y., Ichitani, Y., Yamada, K., Thanseem, I., Anitha, A., Vasu, M. M., Shimmura, C., Wakuda, T., Kameno, Y., Takahashi, T., Iwata, Y., Suzuki, K., Nakamura, K., & Mori, N. (2012). Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-3-11>
- Jiang, Y. H., Yuen, R. K. C., Jin, X., Wang, M., Chen, N., Wu, X., Ju, J., Mei, J., Shi, Y., He, M., Wang, G., Liang, J., Wang, Z., Cao, D., Carter, M. T., Chrysler, C., Drmic, I. E., Howe, J. L., Lau, L., ... Scherer, S. W. (2013). Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.012>
- Jossin, Y., & Goffinet, A. M. (2007). Reelin Signals through Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt To Control Cortical Development and through mTor To Regulate

Dendritic Growth. *Molecular and Cellular Biology*.
<https://doi.org/10.1128/mcb.00928-07>

- Keshvara, L., Benhayon, D., Magdaleno, S., & Curran, T. (2001). Identification of Reelin-induced Sites of Tyrosyl Phosphorylation on Disabled 1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101422200>
- Khosravani, H., Altier, C., Simms, B., Hamming, K. S., Snutchll, T. P., Mezeyova, J., McRory, J. E., & Zamponi, G. W. (2004). Gating Effects of Mutations in the Cav3.2 T-type Calcium Channel Associated with Childhood Absence Epilepsy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 9681–9684. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400006200>
- Kolevzon, A., Smith, C. J., Schmeidler, J., Buxbaum, J. D., & Silverman, J. M. (2004). Familial symptom domains in monozygotic siblings with autism. *American Journal of Medical Genetics*, 129B(1), 76–81. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30011>
- Krey, J. F., Paşca, S. P., Shcheglovitov, A., Yazawa, M., Schwemberger, R., Rasmusson, R., & Dolmetsch, R. E. (2013). Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nature Neuroscience*, 16(2), 201–209. <https://doi.org/10.1038/nn.3307>
- Krissinel, E., & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0907444904026460>
- Krumm, N., Turner, T. N., Baker, C., Vives, L., Mohajeri, K., Witherspoon, K., Raja, A., Coe, B. P., Stessman, H. A., He, Z. X., Leal, S. M., Bernier, R., & Eichler, E. E. (2015). Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.3303>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lammert, D. B., & Howell, B. W. (2016). RELN Mutations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00084>
- Lammert, D. B., Middleton, F. A., Pan, J., Olson, E. C., & Howell, B. W. (2017). The de novo autism spectrum disorder RELN R2290C mutation reduces Reelin secretion and increases protein disulfide isomerase expression. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.14045>
- Leblond, C. S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., Konyukh, M., Chaste, P., Ey, E., Rastam, M., Anckarsäter, H., Nygren, G., Gillberg, I. C., Melke, J., Toro, R., Regnault, B., Fauchereau, F., Mercati, O., Lemièrre, N., ... Bourgeron, T. (2012). Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genetics*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002521>
- Lee, B. K., & McGrath, J. J. (2015). Advancing parental age and autism: Multifactorial pathways. In *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.005>
- Lee, G. H., & D'Arcangelo, G. (2016). New insights into reelin-mediated signaling pathways. In *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00122>
- Leresche, N., & Lambert, R. C. (2017). T-type calcium channels in synaptic plasticity. In *Channels*. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1238992>

- Li, R. J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y. G., Jia, H., & Liu, J. O. (2016). Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *ELife*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.19360>
- Liang, J., Zhang, Y., Wang, J., Pan, H., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Shen, Y., & Wu, X. (2006). New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.073>
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- Louhivuori, L. M., Louhivuori, V., Wigren, H. K., Hakala, E., Jansson, L. C., Nordström, T., Castrén, M. L., & Åkerman, K. E. (2013). Role of low voltage activated calcium channels in neuritogenesis and active migration of embryonic neural progenitor cells. *Stem Cells and Development*, 22(8), 1206–1219. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0234>
- Lu, A. T.-H., Dai, X., Martinez-Agosto, J. A., & Cantor, R. M. (2012). Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-3-18>
- Magdalon, J., Sánchez-Sánchez, S. M., Griesi-Oliveira, K., & Sertié, A. L. (2017). Dysfunctional mTORC1 signaling: A convergent mechanism between syndromic and nonsyndromic forms of autism spectrum disorder? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms18030659>
- Magri, L., Cambiaghi, M., Cominelli, M., Alfaro-Cervello, C., Corsi, M., Pala, M., Bulfone, A., Garca-Verdugo, J. M., Leocani, L., Minicucci, F., Poliani, P. L., & Galli, R. (2011). Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.008>
- Mandy, W., & Lai, M. C. (2016). Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 57(3), 271–292. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12501>
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H., & Muotri, A. R. (2010). A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016>
- Martin, P., Wagh, V., Reis, S. A., Erdin, S., Beauchamp, R. L., Shaikh, G., Talkowski, M., Thiele, E., Sheridan, S. D., Haggarty, S. J., & Ramesh, V. (2020). TSC patient-derived isogenic neural progenitor cells reveal altered early neurodevelopmental phenotypes and rapamycin-induced MNK-eIF4E signaling. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0311-3>
- Moon, U. Y., Park, J. Y., Park, R., Cho, J. Y., Hughes, L. J., McKenna, J., Goetzl, L., Cho, S. H., Crino, P. B., Gambello, M. J., & Kim, S. (2015). Impaired Reelin-Dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex. *Cell Reports*, 12(6), 965–978. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.013>
- Munnich, A., Demily, C., Frugère, L., Duwime, C., Malan, V., Barcia, G., Vidal, C., Throo, E., Besmond, C., Hubert, L., Roland-Manuel, G., Malen, J. P., Ferreri, M., Hanein, S., Thalabard, J. C., Boddaert, N., & Assouline, M. (2019). Impact of on-site clinical genetics consultations on diagnostic rate in children and young adults with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*. <https://doi.org/10.1186/s13229->

- Nedergaard, M., & Verkhratsky, A. (2010). Calcium dyshomeostasis and pathological calcium signalling in neurological diseases. *Cell Calcium*, 47(2), 101–102. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.011>
- Niu, S., Renfro, A., Quattrocchi, C. C., Sheldon, M., & D'Arcangelo, G. (2004). Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00819-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00819-5)
- O'Roak, B. J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J. J., Girirajan, S., Karakoc, E., MacKenzie, A. P., Ng, S. B., Baker, C., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Bernier, R., Fisher, S. E., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature Genetics*, 43(6), 585–589. <https://doi.org/10.1038/ng.835>
- O'Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., ... Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature10989>
- Ognibene, E., Adriani, W., Caprioli, A., Ghirardi, O., Ali, S. F., Aloe, L., & Laviola, G. (2008). The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.03.023>
- Ouchi, N., Asami, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y., & Walsh, K. (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069468>
- Pan, Y. H., Wu, N., & Yuan, X. B. (2019). Toward a better understanding of neuronal migration deficits in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00205>
- Paşca, S. P., Portmann, T., Voineagu, I., Yazawa, M., Shcheglovitov, A., Paşca, A. M., Cord, B., Palmer, T. D., Chikahisa, S., Nishino, S., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., Geschwind, D. H., & Dolmetsch, R. E. (2011). Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nature Medicine*, 17(12), 1657–1662. <https://doi.org/10.1038/nm.2576>
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 70, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.008>
- Peñagarikano, O., Abrahams, B. S., Herman, E. I., Winden, K. D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L. I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J. T., Peles, E., & Geschwind, D. H. (2011). Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.040>
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. In *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2002>
- Perez-reyes, E., & Perez-reyes, E. (2003). <Perez-Reyes, T ca channels.pdf>. 117–161.
- Pinggera, A., Lieb, A., Benedetti, B., Lampert, M., Monteleone, S., Liedl, K. R., Tuluc, P., & Striessnig, J. (2015). CACNA1D de novo mutations in autism spectrum disorders activate cav1.3 I-type calcium channels. *Biological Psychiatry*, 77(9),

- 816–822. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.020>
- Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., Thiruvahindrapuram, B., Xu, X., Ziman, R., Wang, Z., Vorstman, J. A. S., Thompson, A., Regan, R., Pilorge, M., Pellecchia, G., Pagnamenta, A. T., Oliveira, B., Marshall, C. R., Magalhaes, T. R., ... Scherer, S. W. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*, 94(5), 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>
- Pizzo, L., Jensen, M., Polyak, A., Rosenfeld, J. A., Mannik, K., Krishnan, A., McCready, E., Pichon, O., Le Caignec, C., Van Dijck, A., Pope, K., Voorhoeve, E., Yoon, J., Stankiewicz, P., Cheung, S. W., Pazuchanics, D., Huber, E., Kumar, V., Kember, R. L., ... Girirajan, S. (2019). Rare variants in the genetic background modulate cognitive and developmental phenotypes in individuals carrying disease-associated variants. *Genetics in Medicine*, 21(4), 816–825. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0266-3>
- Proft, J., & Weiss, N. (2015). G protein regulation of neuronal calcium channels: Back to the future. *Molecular Pharmacology*, 87(6), 890–906. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096008>
- Provenzano, G., Chelini, G., & Bozzi, Y. (2017). Genetic control of social behavior: Lessons from mutant mice. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.005>
- Qiu, S., Korwek, K. M., Pratt-Davis, A. R., Peters, M., Bergman, M. Y., & Weeber, E. J. (2006). Cognitive disruption and altered hippocampus synaptic function in Reelin haploinsufficient mice. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.11.001>
- Rajakulendran, S., & Hanna, M. G. (2016). The role of calcium channels in epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1), 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022723>
- Rebellato, P., Kaczynska, D., Kanatani, S., Rayyes, I. Al, Zhang, S., Villaescusa, C., Falk, A., Arenas, E., Hermanson, O., Louhivuori, L., & Uhlén, P. (2019). The T-type Ca²⁺ Channel Ca_v3.2 Regulates Differentiation of Neural Progenitor Cells during Cortical Development via Caspase-3. *Neuroscience*, 402, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.015>
- Reijnders, M. R. F., Kousi, M., Van Woerden, G. M., Klein, M., Bralten, J., Mancini, G. M. S., Van Essen, T., Proietti-Onori, M., Smeets, E. E. J., Van Gastel, M., Stegmann, A. P. A., Stevens, S. J. C., Lelieveld, S. H., Gilissen, C., Pfundt, R., Tan, P. L., Kleefstra, T., Franke, B., Elgersma, Y., ... Brunner, H. G. (2017). Variation in a range of mTOR-related genes associates with intracranial volume and intellectual disability. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00933-6>
- Rosenberg, R. E., Law, J. K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W. E., & Law, P. A. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 163(10), 907–914. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.98>
- Rosenberg, S. S., & Spitzer, N. C. (2011). Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004259>
- Rosolem, M. M., Rabello, L. S. C. F., Lisboa, T., Caruso, P., Costa, R. T., Leal, J. V. R., Salluh, J. I. F., & Soares, M. (2012). Critically ill patients with cancer and sepsis: clinical course and prognostic factors. *Journal of Critical Care*, 27(3), 301–

307. <https://doi.org/10.1016/j.jcsrc.2011.06.014>

- [illegible]

- D. H., & Nelson, S. F. (2010). High-density SNP association study of the 17q21 chromosomal region linked to autism identifies CACNA1G as a novel candidate gene. *Molecular Psychiatry*, 15(10), 996–1005. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.41>
- Szatmari, P., Georgiades, S., Duku, E., Bennett, T. A., Bryson, S., Fombonne, E., Mirenda, P., Roberts Md, W., Smith, I. M., Vaillancourt, T., Volden, J., Waddell, C., Zwaigenbaum, L., Elsabbagh, M., & Thompson, A. (2015). Developmental trajectories of symptom severity and adaptive functioning in an inception cohort of preschool children with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 72(3), 276–283. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.2463>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takata, A., Miyake, N., Tsurusaki, Y., Fukai, R., Miyatake, S., Koshimizu, E., Kushima, I., Okada, T., Morikawa, M., Uno, Y., Ishizuka, K., Nakamura, K., Tsujii, M., Yoshikawa, T., Toyota, T., Okamoto, N., Hiraki, Y., Hashimoto, R., Yasuda, Y., ... Matsumoto, N. (2018). Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.074>
- Tang, L., Gamal El-Din, T. M., Payandeh, J., Martinez, G. Q., Heard, T. M., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2014). Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, 505(7481), 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature12775>
- Tian, Y., Voineagu, I., Paşca, S. P., Won, H., Chandran, V., Horvath, S., Dolmetsch, R. E., & Geschwind, D. H. (2014). Alteration in basal and depolarization induced transcriptional network in iPSC derived neurons from Timothy syndrome. *Genome Medicine*, 6(10), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0075-5>
- Van Den Bossche, M. J., Strazisar, M., De Bruyne, S., Bervoets, C., Lenaerts, A.-S., De Zutter, S., Nordin, A., Norrback, K.-F., Goossens, D., De Rijk, P., Green, E. K., Grozeva, D., Mendlewicz, J., Craddock, N., Sabbe, B. G., Adolfsson, R., Souery, D., & Del-Favero, J. (2012). Identification of a CACNA2D4 deletion in late onset bipolar disorder patients and implications for the involvement of voltage-dependent calcium channels in psychiatric disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 159B(4), 465–475. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32053>
- Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., Lolli, F., Marcello, E., Sironi, L., Vegeto, E., & Maggi, A. (2018). Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Reports*, 23(12), 3501–3511. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.048>
- Wang, Z., Hong, Y., Zou, L., Zhong, R., Zhu, B., Shen, N., Chen, W., Lou, J., Ke, J., Zhang, T., Wang, W., & Miao, X. (2014). Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: An integrated meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32222>
- Weiss, N., & Zamponi, G. W. (2020). Genetic T-type calcium channelopathies. *J Med Genet*, 57, 1–10. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106163>
- Werling, D. M. (2016). The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biology of Sex Differences*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0112-8>
- Werling, D. M., Parikshak, N. N., & Geschwind, D. H. (2016). Gene expression in

- human brain implicates sexually dimorphic pathways in autism spectrum disorders. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10717>
- Wycisk, K. A., Zeitz, C., Feil, S., Wittmer, M., Forster, U., Neidhardt, J., Wissinger, B., Zrenner, E., Wilke, R., Kohl, S., & Berger, W. (2006). Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1086/508944>
- Y, W. (2017). Involvement of Calcium, Ras, MAPK, PI3K-Akt and mTOR Signaling Pathways in Autism Spectrum Disorders. *Neurology & Neurotherapy Open Access Journal*, 2(1). <https://doi.org/10.23880/nnoaj-16000110>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Yasui, N., Nogi, T., Kitao, T., Nakano, Y., Hattori, M., & Takagi, J. (2007). Structure of a receptor-binding fragment of reelin and mutational analysis reveal a recognition mechanism similar to endocytic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700438104>
- Yasui, N., Nogi, T., & Takagi, J. (2010). Structural Basis for Specific Recognition of Reelin by Its Receptors. *Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.01.010>
- Yuen, R. K. C., Merico, D., Bookman, M., Howe, J. L., Thiruvahindrapuram, B., Patel, R. V., Whitney, J., Deflaux, N., Bingham, J., Wang, Z., Pellecchia, G., Buchanan, J. A., Walker, S., Marshall, C. R., Uddin, M., Zarrei, M., Deneault, E., D'Abate, L., Chan, A. J. S., ... Scherer, S. W. (2017). Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience*, 20(4), 602–611. <https://doi.org/10.1038/nn.4524>
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A. C., Xu, B., Chen, S., Luo, Y., Chen, Z., Liu, L. L., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Chen, L., Huang, S., Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., ... Bourgeron, T. (2014). Getting to the Cores of Autism. *Nature Genetics*, 6(4), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.002>
- Zhou, J., Blundell, J., Ogawa, S., Kwon, C. H., Zhang, W., Sinton, C., Powell, C. M., & Parada, L. F. (2009). Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific PTEN knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009>