

Basi genetiche dell'epilessia e tecniche di laboratorio

Genetics of the epilepsies and laboratory techniques

F. ZARA

Laboratorio di Neurogenetica Dipartimento di Neuroscienze e Riabilitazione,
Istituto "G. Gaslini", Genova

PAROLE CHIAVE. — Epilessia - Genetica - Mutazioni - Canali ionici
KEY WORDS. — *Epilepsy - Genetics - Mutations - Ion channels*

Per invito
Invited article

Summary

The most important physiological process involved in neuronal excitability is the activation and inactivation of ion currents through the neuronal membrane.

Recent genetic studies showed that mutations in genes encoding neuronal ion channel subunits are involved in different autosomal dominant forms of idiopathic epilepsy. Furthermore genes for different genetic disorders associated to symptomatic epilepsy have been identified, such as progressive myoclonus epilepsies and cortical malformations. Mutations involved in human epilepsy include chromosomal aberrations, microdeletions and genic mutations. Thus, the genetic dissection of epilepsy requires different techniques: cytogenetics for standard karyotyping, molecular cytogenetics for the identification of microrearrangements, molecular biology for the identification of point mutations.

The new insights into genetics of epilepsy led to the development of genetic tests for the diagnosis of some type of epilepsy. However, genetic mutations are found in rare monogenic forms of epilepsy. Thus, the genetic etiology of the most common forms of epilepsy is unknown and the impact of the genetic research in the clinical practice is still limited.

1. Basi genetiche delle epilessie

1.1 Meccanismi molecolari dell'epilettogenesi

Le crisi epilettiche sono il risultato clinico di scariche eccessive che si originano in popolazioni specifiche di neuroni eccitabili. Le alterazioni dell'eccitabilità alla base dell'epilettogenesi non coinvolgono singoli neuroni ma sono capaci di reclutare una massa critica di cellule ipereccitabili in una attività sincronizzata. Il meccanismo fisiologico più importante alla base dell'eccitabilità neuronale prevede l'attivazione e l'inattivazione di correnti ioniche che attraversano la membrana neuronale.

La membrana plasmatica neuronale è costituita da un *bilayer* lipidico impermeabile agli ioni. Tuttavia gli ioni possono fluire attraverso la membrana, secondo un gradiente elettrochimico, attraverso complessi proteici, detti canali, che possono essere attivati da variazioni di voltaggio o da specifici ligandi. Le pompe ioniche creano e mantengono il potenziale di riposo (-70 mV) attraverso il consumo di ATP, mentre le correnti ioniche che fluiscono attraverso i canali determinano dei cambiamenti di stato¹. Tipicamente la depolarizzazione della membrana, ad esempio a seguito dell'azione di un neurotrasmettitore, attiva i canali del sodio (ma anche quelli del calcio) voltaggio-dipendente, che determinano l'insorgenza del potenziale d'azione. Successivamente i canali del potassio voltaggio dipendente si attivano e ripolarizzano la membrana. A seguito dell'arborizzazione assonale e ai numerosissimi contatti sinaptici il segnale viene rapidamente propagato, reclutando altri neuroni in una attività sincronizzata. Pertanto lo sbilanciamento delle correnti eccitatorie o inibitorie è considerato alla base dell'epilettogenesi.

In effetti i recenti studi di genetica molecolare hanno evidenziato l'importanza dei canali ionici neuronali nell'eziopatogenesi delle epilessie umane.

1.2 Canali ionici neuronali ed epilessie idiopatiche

1.2.1 Canali del cloro nell'epilessia idiopatica generalizzata

I recettori del GABA esplicano la loro azione inibitoria attraverso l'iperpolarizzazione della membrana neuronale in seguito al flusso passivo di ioni cloro in entrata in risposta al GABA. Il canale del cloro CIC-2 consente il passaggio di cloro in uscita in seguito a iperpolarizzazione della membrana per mantenere bassa la concentrazione di cloro nella cellula e consentire l'azione inibitoria del GABA³³. Recentemente sono state descritte tre mutazioni nel gene *CLCN2* codificante il canale CIC-2 in famiglie con epilessia idiopatica generalizzata¹⁸. In queste famiglie le mutazioni hanno un'espressività clinica variabile. Infatti i soggetti portatori della mutazioni possono sviluppare epilessia con assenza dell'infanzia e giovanile, epilessia mioclonica giovanile oppure epilessia con crisi tonico-cloniche generalizzate. Le mutazioni determinano l'interruzione prematura della proteina, uno *splicing* atipico, oppure la sostituzione di un

singolo aminoacido. Studi funzionali hanno dimostrato l'azione epilettogena dei canali mutanti in sistemi cellulari¹⁸. Questi studi hanno dimostrato il ruolo cruciale dell'inibizione GABAergica nell'epilettogenesi.

1.2.2 Canali del calcio nell'epilessia generalizzata

I neuroni talamici facenti parte dei circuiti talamo-corticali sono stati implicati nella genesi dell'attività ritmica caratteristica delle scariche punta-onda. I canali del calcio voltaggio dipendente a bassa soglia giocano un ruolo fondamentale nella fase di depolarizzazione dell'attività ritmica di questi neuroni. I canali del calcio voltaggio dipendente pertanto costituiscono eccellenti candidati ad essere coinvolti nell'eziopatogenesi delle epilessie, in particolare in quelle caratterizzate da assenze.

Mutazioni nel gene CACNB4 codificante la subunità beta4 del canale del calcio voltaggio dipendente di tipo L sono state identificate in due famiglie affette da epilessia generalizzata idiopatica, in particolare epilessia con assenze giovanili ed epilessia mioclonica giovanile¹². Inoltre sono state identificate due mutazioni nel gene CACNA1A codificante una subunità alfa, facente parte dello stesso canale del calcio voltaggio dipendente in famiglie con assenze ad atassia episodica^{20 21}. Il ruolo determinante dei canali del calcio nel controllo dell'eccitabilità neuronale e nella genesi delle epilessie è inoltre dimostrato dalla presenza di modelli murini mutanti per diverse subunità di canali del calcio voltaggio dipendente che sviluppano caratteristiche assenze con scariche punta-onda generalizzate⁵.

1.2.3 Canali del sodio

I canali del sodio voltaggio dipendenti contribuiscono in maniera determinante alla genesi del potenziale d'azione post-sinaptico. Sono costituiti da una subunità alfa, che rappresenta la parte principale del canale e da una o più subunità accessorie con funzione modulatoria. L'attivazione dei canali del sodio voltaggio dipendente determina una violenta depolarizzazione cui segue una rapida inattivazione dei canali del sodio e una lenta ripolarizzazione della membrana ad opera soprattutto dei canali del potassio. I canali del sodio voltaggio dipendenti pertanto svolgono un'azione eccitatoria.

1.2.3.1 Epilessia generalizzata con convulsioni febbrili plus (GEFS+) ed epilessia mioclonica severa dell'infanzia

GEFS+ è una forma familiare di epilessia ad ereditarietà autosomica dominante caratterizzata da convulsioni febbrili e crisi afebrili di diverso tipo che si combinano in maniera variabile in una stessa famiglia. I soggetti affetti presentano più frequentemente convulsioni febbrili semplici spesso seguite da convulsioni febbrili che persistono oltre i 6 anni (convulsioni febbrili "plus") o da crisi afebrili generalizzate tonico-cloniche. Inoltre crisi generalizzate di diverso tipo (assenze, mioclonie, crisi atoniche) e crisi parziali sono state descritte in al-

cune famiglie²⁵. Mutazioni nei geni codificanti la subunità alfa1 (SCN1A) e beta1 (SCN1B) del canale voltaggio dipendente del sodio sono state identificate in diverse famiglie GEFS+^{13 38}. Le mutazioni GEFS+ determinano la sostituzione di un singolo aminoacido e pertanto non compromettono in maniera totale il funzionamento del canale. Poiché le mutazioni sono state associate a diverse alterazioni funzionali del canale, anche opposte, non è ancora chiaro quale sia la conseguenza il meccanismo epilettogeno alla base della GEFS+.

A causa della comune propensione a sviluppare crisi nel corso di rialzi febbrili e della presenza di crisi polimorfe, l'epilessia mioclonica severa dell'infanzia (SMEI) e la GEFS+ sono state considerate le estremità fenotipiche di un continuum clinico³¹. Infatti studi genetici hanno evidenziato la presenza di mutazioni nel gene SCN1A in soggetti con SMEI⁷. Le mutazioni determinano frequentemente la produzione di un canale aberrante tronco, cui si associa una perdita di funzione totale o quasi. La gravità del quadro clinico e la sporadicità di questa condizione correla con la gravità delle conseguenze funzionali delle mutazioni e con l'insorgenza generalmente *de novo* delle mutazioni. Tuttavia non è chiaro quali circuiti sarebbero coinvolti nell'eziologia di queste forme dal momento che la perdita di funzione di un canale con funzioni eccitatorie dovrebbe avere effetti ipoeccitatori. Le mutazioni descritte sono ormai più di un centinaio. La presenza di forme intermedie non inquadrabili nelle SMEI, caratterizzate da crisi generalizzate farmacoresistenti, da un grado variabile di ritardo mentale e da mutazioni in SCN1A, conferma l'esistenza di una condizione genetica caratterizzata da uno spettro di fenotipi clinici correlati²⁶.

Tuttavia, una percentuale consistente di famiglie GEFS+ e di soggetti SMEI risultano negativi all'analisi di mutazione. Pertanto è possibile prevedere l'esistenza di altri geni coinvolti in queste forme.

1.2.3.2 Convulsioni benigne familiari neonatali-infantili (BFNIS)

Recentemente, sono state descritte alcune famiglie caratterizzate da crisi parziali benigne nel primo anno di vita. Dal punto di vista semiologico le crisi si manifestano in maniera del tutto simile alle convulsioni familiari infantili benigne (BFIC) descritte da Vigevano et al.³⁷. Tuttavia l'età di insorgenza tipicamente è antecedente ai 4 mesi, e talvolta nei primi giorni di vita. Dal punto di vista della classificazione questa forma può essere considerata una forma intermedia tra le convulsioni familiari benigne neonatali e quelle infantili³. Mutazioni nel gene SCN2A, codificante la subunità alfa2 del canale del sodio voltaggio dipendente, sono state recentemente descritte in diverse famiglie BFNIS, a testimonianza del ruolo centrale di questi canali nella patogenesi delle epilessie genetiche. L'individuazione di una mutazione SCN2A in una famiglia con fenotipo clinico BFIC dimostra la sovrapposizione clinica di queste forme³⁵. Studi funzionali hanno dimostrato l'effetto patologico delle mutazioni sulla cinetica del canale con conseguenze eccitatorie.

1.2.4 Canali del potassio

I canali del potassio costituiscono una famiglia di proteine molto grande in grado di modulare l'eccitabilità neuronale in maniera molto fine e sofisticata. La maggior parte dei canali del potassio consentono di ripolarizzare la membrana in seguito a depolarizzazione della membrana.

1.2.4.1 Convulsioni familiari neonatali benigne (BFNC)

Nelle BFNC, le crisi iniziano tipicamente nel 2 o 3 giorno di vita e scompaiono entro una settimana. Il 10% dei soggetti BFIC tuttavia sviluppano successivamente epilessia⁸. Le BFIC hanno un'ereditarietà autosomica dominante ad elevata penetranza. Tuttavia esistono casi sporadici con caratteristiche cliniche sovrapponibili. Mutazioni nei geni *KCNQ2* e *KCNQ3*, codificanti le subunità del canale del potassio M^{6,32}. Il canale M si attiva in seguito ad uno stimolo eccitatorio che depolarizza il neurone, ripolarizzando la membrana fino a raggiungere il potenziale di riposo. Il canale M pertanto previene il *firing* ripetitivo. Studi funzionali hanno dimostrato che le diverse mutazioni determinano una riduzione della corrente inibitoria del potassio di circa il 20-30%. L'espressione età-dipendente delle crisi potrebbe essere correlata al processo maturativo del sistema nervoso centrale.

1.2.4.2 Epilessia generalizzata con discinesia parossistica.

Sebbene alcune manifestazioni motorie delle crisi epilettiche e la discinesia parossistica siano difficili da distinguere sul piano clinico, è ormai evidente che si tratti di manifestazioni cliniche diverse dal punto di vista fisiologico. Tuttavia sempre più frequentemente epilessia e discinesie ricorrono nelle stesse famiglie e anche nello stesso individuo¹⁷. Recentemente è stata descritta una famiglia caratterizzata da diversi membri affetti da assenze generalizzate dell'infanzia con complessi punta-onda a 3-2,5 Hz o discinesia parossistica non chenesigenica o da entrambe le sintomatologie¹¹. Lo studio molecolare ha consentito l'identificazione di una mutazione nel gene *KCNMA1*, codificante il canale del potassio sensibile al potassio della famiglia BK. Tale canale è attivato sia dalla variazione di voltaggio che dall'innalzamento della concentrazione citosolica del calcio. Ad oggi tuttavia è stata descritta una sola famiglia con questo tipo di alterazione.

1.2.4.3 Epilessia temporale-laterale autosomica dominante (ADLTE)

L'ADLTE è una sindrome epilettica ad ereditarietà di tipo autosomico dominante con penetranza intorno al 70%⁴. L'espressività clinica e l'età di insorgenza sono variabili. Tuttavia il sintomo più caratteristico sono le aure uditive e l'esordio è più frequentemente nella tarda adolescenza. Tuttavia alcuni pazienti presentano allucinazioni visive, olfattive o crisi afasiche. Circa la metà delle famiglie ADLTE presentano mutazione nel gene *LGI1*, codificante una proteina

inizialmente coinvolte nell'insorgenza dei glioblastomi²². Tuttavia recentemente è stato dimostrato che LGI1 codifica per una nuova subunità del canale del potassio KV1.1. LGI1 sembra influire sull'inattivazione dei canali del potassio pre-sinaptici di tipo A²⁸. Mutazioni nel gene LGI1 sembrano accelerare l'inattivazione dei canali del potassio, ritardare la ripolarizzazione del neurone in seguito a depolarizzazione e promuovere pertanto l'attività epilettica.

1.2.5 Recettori del GABA_A ed epilessia idiopatica generalizzata

I recettori del GABA rappresentano uno dei maggiori "strumenti" molecolari per l'inibizione dell'attività elettrica neuronale. I recettori del GABA sono caratterizzati da un segmento recettoriale che si estende all'esterno della cellula e che consente di legare il GABA e un segmento transmembrana che forma un poro in cui filtra in maniera selettiva il Cloro.

Mutazioni in due diverse subunità del recettore del GABA sono state associate ad epilessia idiopatica generalizzata.

In una famiglia con epilessia mioclonica giovanile è stata identificata una mutazione nel gene GABRA1, codificante la subunità alfa1 del recettore del GABA⁹. Tuttavia lo studio di famiglie con più casi affetti e da casi sporadici si è rivelato negativo, dimostrando così che mutazioni in GABRA1 costituiscono una causa molto rara di epilessia mioclonica giovanile.

Inoltre mutazioni nel gene GABRG2, codificante la subunità gamma2 del recettore del GABA sono state identificate in alcune famiglie con fenotipo GEFS+^{2,39}.

Questi studi hanno consentito di dimostrare che un meccanismo patofisiologico dell'epilessia è "l'inibizione dell'inibizione".

1.2.6 Recettori dell'acetilcolina nell'epilessia notturna del lobo frontale autosomica dominante (ADNFLE)

ADNFLE è una sindrome ad ereditarietà autosomica dominante caratterizzata da brevi crisi notturne di tipo motorio in cluster. Questa sintomatologia è stata per lungo tempo confusa con parassonie²⁷. Questa patologia ereditaria non è rara, tuttavia si riscontrano più frequentemente casi sporadici clinicamente sovrapponibili alle forme familiari. L'età di insorgenza è tipicamente nell'adolescenza per quanto esista una notevole variabilità. Per quanto le crisi siano abbastanza stereotipate esiste una notevole variabilità nella gravità dei sintomi e nella risposta ai farmaci antiepilettici.

Mutazioni in due diversi geni codificanti le subunità alfa4 e beta2 del recettore neuronale dell'acetilcolina (CHRNA4 e CHRNB2) sono state identificate in numerose famiglie ADNFLE^{34,10}.

I recettori nicotinici dell'acetilcolina sono canali pentamerici attivati dall'acetilcolina che consentono il flusso di alcuni cationi bivalenti (calcio, magnesio). Ad oggi sono state identificate 12 subunità che si combinano in manie-

ra diversa. Il recettore più espresso nel sistema nervoso centrale è proprio quello formato dalle subunità alfa4 e beta2. Studi elettrofisiologici hanno dimostrato che l'alterazione comune alle diverse mutazioni è rappresentato dall'aumentata sensibilità del recettore a bassi dosi di acetilcolina. Tuttavia non è chiaro come questa alterazione determini ipereccitabilità. Inoltre non sono note le ragioni per cui un canale espresso in maniera ubiquitaria nella corteccia cerebrale e nel talamo sia coinvolto in una epilessia di tipo frontale.

1.3 Altri geni per le epilessie idiopatiche

Ad oggi esiste un unico gene responsabile di epilessia idiomatica che non codifica per una proteina direttamente coinvolta nella formazione di canali ionici neuronali.

Mutazioni nel gene EFHC1 sono state riscontrate in famiglie con epilessia mioclonica giovanile³⁶. Tuttavia anche in questo caso lo studio di ulteriori famiglie ha evidenziato come EFHC1 sia comunque mutato in una piccola porzione di casi.

La funzione del gene EFHC1 è ignota, sebbene studi preliminari suggeriscano un coinvolgimento del gene nei processi apoptotici. Tuttavia saranno necessari ulteriori studi per chiarire la funzione di questo gene ed il suo ruolo nell'epilettogenesi.

1.4 Le epilessie sintomatiche

Molte malattie genetiche includono l'epilessia come sintomo principale. Le crisi in queste patologie si manifestano usualmente come epilessie generalizzate sintomatiche associate a lesioni strutturali del cervello o a disturbi metabolici. Tra queste ricordiamo le Epilessie Miocloniche Progressive e le malformazioni della corteccia cerebrale. Per molte di queste forme sono stati identificati i geni responsabili ed è pertanto possibile eseguire test genetici mirati e offrire una consulenza genetica appropriata.

1.4.1 Le epilessie miocloniche progressive

Le epilessie miocloniche progressive (PME) sono un gruppo di patologie caratterizzate da crisi miocloniche, crisi tonico-cloniche e decadimento neurologico progressivo, in particolare atassia e demenza. Le forme classiche di PME includono la malattia di Unverricht-Lunborg (EPM1), la malattia di Lafora (EPM2), l'epilessia con fibre "ragged red" (MERRF), le sialidosi e le ceroido lipofuscinosi neuronali. Il pattern ereditario di tali patologie è sempre autosomico recessivo ad esclusione delle MERRF che si trasmette per via materna attraverso il DNA mitocondriale²⁹.

1.4.2 Le malformazioni della corteccia cerebrale

Le malformazioni della corteccia cerebrale rappresentano circa il 40% delle epilessie farmacoresistenti dell'infanzia.

L'eterotopia periventricolare bilaterale è caratterizzata da noduli subependimali di sostanza grigia associata a mutazioni nel gene X-linked FLN1¹⁴, nella maggior parte dei casi e, più raramente, nel gene ARGEF2³⁰.

Mutazioni nei geni LIS1 e DCX sono state invece identificate nelle sindromi con agiria o pachigiria e nell'eterotopia subcorticale a banda¹⁶. Più raramente sono state identificate mutazioni nei geni della Reelina e ARX in famiglie caratterizzate da spasmi infantili^{19 23}.

Nella polimicrogiria frontoparietale autosomica recessiva sono state invece identificate mutazioni nel gene GPR56²⁴.

Infine nella sclerosi tuberosa sono state identificate nei geni TSC1 e TSC2¹⁵.

2. Test genetici ed epilessia

2.1 Mutazioni

Si definisce mutazione qualsiasi variante nella sequenza o nella struttura del DNA nel genoma. Tradizionalmente le varianti con effetto fenotipico deleterio venivano definite mutazioni, mentre le varianti con effetti positivi o prive di effetto venivano considerate polimorfismi. Tuttavia i recenti sviluppi nel campo delle malattie multifattoriali hanno permesso di verificare che i polimorfismi possono essere causa di patologia quando si associno ad altri fattori genetici o ambientali. Così risulta più semplice classificare le varianti polimorfismi quando la frequenza dell'allele minore nella popolazione generale supera l'1% e mutazioni quando la frequenza dell'allele minore è inferiore all'1%.

Lo sviluppo e l'esecuzione di test genetici è fortemente influenzata dal tipo di mutazioni che si riscontrano nella patologie di interesse. Studi genetici hanno messo in evidenza che le epilessie ereditarie si associano a una vastissima gamma di mutazioni in geni diversi. Le mutazioni possono essere classificate secondo diversi schemi:

- *cellula bersaglio*: le *mutazioni somatiche* colpiscono selettivamente le cellule somatiche. Talvolta possono colpire un solo organo o tessuto (ad esempio nei tumori). Le *mutazioni germinali* colpiscono le linee germinali, generalmente non hanno un effetto fenotipico ma possono essere trasmesse alle generazioni successive;

- *conseguenza funzionale/fenotipica*: le *mutazioni vantaggiose* determinano un miglior adattamento dell'organismo al proprio ambiente. Le *mutazioni neutre* non hanno alcun effetto fenotipico ed evolutivo. Le *mutazioni svantaggiose* determinano un peggior adattamento dell'organismo all'ambiente (come nel caso delle patologie genetiche). Tra queste vi sono mutazioni letali che non consentono la riproduzione nel 100% dei casi, le mutazioni subletali che con-

sentono la riproduzione in una frazione di casi, le mutazioni condizionali che esprimono un fenotipo normale in condizioni *permissive* od una condizione patologica in condizioni *restrittive* (ad esempio rialzo febbrile GEFS+);

– estensione/struttura: le *aberrazioni cromosomiche* coinvolgono il numero di cromosomi (poliploidie, monosomie, trisomie) oppure la loro struttura (traslocazioni, inversioni, delezioni, duplicazioni, ring). Le *mutazioni geniche* colpiscono la funzione di un singolo gene alterandone la trascrizione dell'RNA o la sua stabilità o struttura, oppure alterando la sequenza aminoacidica del prodotto proteico codificato dal gene stesso. Le mutazioni geniche possono essere poi ulteriormente classificate sulla base del tipo di variazione nucleotidica che avviene nella sequenza di DNA. Nelle mutazioni puntiformi una singola base viene sostituita da un'altra. Se la mutazione puntiforme determina a valle un cambio aminoacidico si chiamerà mutazione dissenso, se determina l'introduzione di un codone di stop si chiamerà mutazione nonsense. Le mutazioni di *splicing* invece determinano la produzione di mRNA instabili o aberranti. Nelle inserzioni o delezioni invece vengono inserite o eliminate una o più basi nucleotidiche. Il numero di nucleotidi coinvolti varia tra uno a diverse migliaia o milioni. Le inserzioni/delezioni determinano lo *shift* del codice di lettura con conseguente produzione di una proteina aberrante. Nelle duplicazioni invece un tratto di DNA coinvolgente un gene o più geni o parte di esso viene duplicato determinando la produzione eccessiva di mRNA oppure un mRNA aberrante.

2.2 Metodi di Indagine

I test genetici si avvolgono di molteplici tecniche laboratoriali in relazione al difetto genetico che si vuole rilevare.

– Cariotipo: analisi microscopica dei cromosomi umani al fine di rilevare alterazioni di numero o struttura. Il cariotipo costituisce "l'emocromo" dell'indagine genetica. Il 60% dei soggetti portatori di anomalie cromosomiche sbilanciate manifestano un quadro sindromico complesso che include epilessia. Poiché le alterazioni cromosomiche coinvolgono spesso un numero elevato di geni, il cariotipo è particolarmente indicato quando l'epilessia si manifesta in concomitanza con ritardo mentale, dismorfismi e altri difetti multisistemici.

– "*Fluorescence in situ hybridization*" (FISH): permette l'analisi microscopica ad elevata risoluzione di sequenze specifiche su cromosomi in metafase. La FISH rappresenta il test di elezione nelle sindromi da microdelezione (es. Sindrome di Angelman, Sindrome di Smith-Magenis), in cui le alterazioni non sono visibili al cariotipo. L'analisi delle delezioni subtelomeriche basata su test FISH multipli è particolarmente importante nelle epilessie associate a ritardo mentale. Alcune delezioni subtelomeriche rappresentano ormai entità sindromiche definite (ad esempio delezione 6qter).

– *Multiple ligation probe amplification* (MLPA): attraverso l'amplificazione di sonde specifiche è possibile rilevare delezioni o duplicazioni nell'ordine di poche paia di basi.

– *Array-CGH*: rappresenta l'ultima frontiera della citogenetica molecolare. L'esistenza di molteplici delezioni submicroscopiche distribuite lungo tutto il genoma e non visibili attraverso lo studio dei cromosomi ha indotto all'utilizzo di scanner laser per lo studio quantitativo di migliaia di sequenze specifiche in contemporanea. Tale tecnologia sarà fondamentale per lo studio di microriarrangiamenti "genome-wide" in soggetti con cariotipo normale. Tale tecnica probabilmente sostituirà le tecniche FISH e MLPA.

– Sequenziamento: è il metodo più utilizzato per lo studio di mutazioni geniche puntiformi. Il test prevede l'amplificazione del tratto di DNA del paziente che si ritiene responsabile del fenotipo osservato e la determinazione della sequenza nucleotidica per le identificazioni di eventuali variazioni rispetto alla sequenza consenso. Tali test sono malattia-specifici. Pertanto devono essere prescritti sulla base di precise indicazioni cliniche e non possono essere usati come metodi di screening.

– *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC): è una tecnica che permette lo screening rapido per l'identificazione di mutazioni a posizione non nota lungo un tratto di DNA di dimensioni discrete. Il DNA del paziente viene amplificato, denaturato, rinaturato lentamente e fatto passare in una colonna cromatografia. La presenza della mutazione determina la creazione di frammenti a doppia elica con *mismatch* e di frammenti normali. La presenza di due specie di frammenti viene rilevata da doppi picchi. La mutazione deve essere poi caratterizzata attraverso sequenziamento.

2.3 Test genetici nelle epilessie

La diagnosi clinica di una epilessia a carattere ereditario rimane spesso priva di una conferma diagnostica molecolare. Infatti ad oggi sono noti geni per forme rare, il cui impatto nella popolazione generale è estremamente ridotto.

Nel campo della consulenza genetica pertanto è possibile fornire una probabilità di rischio sulla base del pattern di segregazione della malattia. Per le epilessie comuni ad ereditarietà complessa rischi empirici sono stati calcolati sulla base di dati osservati attraverso studi epidemiologici. Per le epilessie ad ereditarietà mendeliana i rischi genetici seguono schemi definiti e consentono stime di rischio precise. Tuttavia l'assenza di test genetici specifici non consente l'esecuzione di screening di portatori e diagnosi prenatale per la maggior parte delle epilessie.

Inoltre per molte sindromi epilettiche i geni correlati consentono di spiegare un ridotto numero di casi. Per taluni geni è stata descritta una sola mutazione.

Con molta fatica la difficile strada verso la comprensione delle basi genetiche delle diverse forme di epilessia è stata imboccata e nel prossimo futuro sarà possibile usufruire di strumenti diagnostici adeguati per molte epilessie ereditarie.

Riassunto

Il meccanismo fisiologico più importante alla base dell'eccitabilità neuronale prevede l'attivazione e l'inattivazione di correnti ioniche attraverso la membrana neuronale. Studi recenti di genetica molecolare hanno evidenziato la presenza di mutazioni in geni codificanti subunità di canali ionici neuronali in diverse forme di epilessia idiomatica ad ereditarietà autosomica dominante. Inoltre sono stati identificati i geni responsabili di diverse condizioni genetiche associate ad epilessia sintomatica quali le epilessie miocloniche progressive e le malformazioni della corteccia cerebrale. Le mutazioni genetiche alla base delle epilessie comprendono aberrazioni cromosomiche, microdelezioni e mutazioni geniche puntiformi. Lo studio molecolare dell'epilessia richiede pertanto l'utilizzo di tecniche laboratoriali diverse: la citogenetica per l'analisi del cariotipo, la citogenetica molecolare per l'individuazione di microriarrangiamenti genomici, la genetica molecolare per la caratterizzazione delle mutazioni puntiformi.

Le nuove conoscenze hanno consentito lo sviluppo di test laboratoriali per la diagnosi di alcune forme di epilessia, anche in ambito prenatale. Ad oggi tuttavia mutazioni genetiche si riscontrano in forme monogeniche rare. Pertanto le basi genetiche delle forme più comuni di epilessia rimangono ampiamente sconosciute e l'impatto della ricerca genetica nella gestione clinica delle epilessie è ancora limitato.

Bibliografia

- ¹ Avanzini G, Franceschetti S. *Cellular Biology of epileptogenesis*. Lancet Neurol 2003;2:33-42.
- ² Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, et al. *First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene*. Nat Genet 2001;28:46-8.
- ³ Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, et al. *Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy*. Ann Neurol 2004;55:550-7.
- ⁴ Berkovic SF, McIntosh A, Howell RA, Mitchell A, Sheffield LJ, Hopper JL. *Familial temporal lobe epilepsy: A common disorder identified in twins*. Ann Neurol 1996;40:227-35.
- ⁵ Burgess DL, Noebels JL. *Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models*. Epilepsy Res 1999;36:111-22.
- ⁶ Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, et al. *A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family*. Nat Genet 1998;18:53-5.
- ⁷ Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. *De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy*. Am J Hum Genet 2001;68:1327-32.

- ⁸ Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes*. *Epilepsia* 1989;30:389-99.
- ⁹ Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, et al. *Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy*. *Nat Genet* 2002;31:184-9.
- ¹⁰ De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, Annesi G, Gambardella A, Quattrone A, et al. *The nicotinic receptor $\beta 2$ subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy*. *Nat Genet* 2000;26:275-6.
- ¹¹ Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, et al. *Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder*. *Nat Genet* 2005;37:733-8.
- ¹² Escayg AP, De Waard M, Lee DD. *Coding and noncoding variation of the human calcium-channel $\beta 4$ -subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia*. *Am J Hum Genet* 2000;66:1531-9.
- ¹³ Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, et al. *Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+ 2*. *Nat Genet* 2000;24:343-5.
- ¹⁴ Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, et al. *Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia*. *Neuron* 1998;21:1315-25.
- ¹⁵ Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, et al. *Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs*. *Am J Hum Genet* 2001;68:64-80.
- ¹⁶ Gleeson JG. *Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin*. *Curr Opin Neurol* 2000;13:121-5.
- ¹⁷ Guerrini R, Sanchez-Carpintero R, Deonna T, Santucci M, Bhatia KP, Moreno T, et al. *Early-onset absence epilepsy and paroxysmal dyskinesia*. *Epilepsia*. 2002;43:1224-9.
- ¹⁸ Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramirez A, Poser B, et al. *Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies*. *Nat Genet* 2003;33:527-32.
- ¹⁹ Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, et al. *Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations*. *Nat Genet* 2000;26:93-6.
- ²⁰ Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, Davies NP, Herd C, Robertson R, et al. *Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia*. *Brain* 2004;127:2682-92.
- ²¹ Jouvenceau A, Eunson LH, Spauschus A, et al. *Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel*. *Lancet* 2001;358:801-7.
- ²² Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, et al. *Mutations in LGII cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features*. *Nat Genet* 2002;30:335-41.
- ²³ Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, et al. *Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans*. *Nat Genet* 2002;32:359-69.
- ²⁴ Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, et al. *G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex*. *Science* 2004;303:2033-6.
- ²⁵ Scheffer IE, Berkovic SF. *Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes*. *Brain* 1997;120:479-90.
- ²⁶ Scheffer IE. *Severe infantile epilepsies: molecular genetics challenge clinical classification*. *Brain* 2003;126:513-4.
- ²⁷ Scheffer IE, Bhatia KP, Lopes-Cendes I, Fish DR, Marsden CD, Andermann F, et al. *Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder*. *Lancet* 1994;343:515-7.
- ²⁸ Schulte U, Thumfart JO, Klockner N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, et al. *The Epilepsy-Linked Lgi1 Protein Assembles into Presynaptic Kv1 Channels and Inhibits Inactivation by Kvb1*. *Neuron* 2006;49:697-706.
- ²⁹ Shahwan A, Farrell M, Delanty N. *Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects*. *Lancet Neurol* 2005;4:239-48.

- 30 Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, et al. *Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex*. Nat Genet 2004;36:69-76.
- 31 Singh R, Andermann E, Whitehouse WP, Harvey AS, Keene DL, Seni MH, et al. *Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+?* Epilepsia 2001;42:837-44.
- 32 Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, et al. *A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns*. Nat Genet 1998;18:25-9.
- 33 Staley KJ. *The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition*. J Neurophysiol 1994;72:273-84.
- 34 Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, et al. *A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Nat Genet 1995;11:201-3.
- 35 Striano P, Bordo L, Lispi ML. *A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures*. Epilepsia 2006;47:218-20.
- 36 Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, et al. *Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy*. Nat Genet. 2004;36:842-9.
- 37 Vigeveno F, Fusco L, Di Capua M, Ricci S, Sebastianelli R, Lucchini P. *Benign infantile familial convulsions*. Eur J Pediatr 1992;151:608-12.
- 38 Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, et al. *Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B*. Nat Genet 1998;19:366-70.
- 39 Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, et al. *Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures*. Nat Genet 2001;28:49-52.