

I canali del potassio e la genetica delle BFNC

Potassium channels and genetics of BFNC

G. COPPOLA

Clinica di Neuropsichiatria Infantile, Seconda Università di Napoli

PAROLE CHIAVE. — Convulsioni neonatali familiari benigne - KCNQ2 - KCNQ3 - Correnti M - Mutazioni

KEY WORDS. — *Mental frontal benign convulsions - KCNQ2 - KCNQ3 - Corrents malformations*

*Per invito
Invited article*

Summary

*Benign familial neonatal convulsions (BFNC) are linked to mutations in coding genes for subunits of potassium channels KCNQ2 and KCNQ3, mapping chromosomes 20q13.3 and 8q24, respectively. Potassium channels are present in all animal and vegetable cells, and play a role in both modulating neuronal resting potential and repolarizing membrane potential. Therefore, they play a leading role in regulating electrical excitability of nerves and muscular fibers, including heart. Disorders of Q2/Q3 lead to dysfunction of M current, that acts controlling neuronal excitability. Most mutations reported so far, regard KCNQ2, while only three have been found in KCNQ3. The mutations are mostly deletions/insertions or splice site causing frame-shifts or premature stop codons. More than half mutations interest the C-terminus of KCNQ2 subunit, that may be variably truncated. The functional consequences of these mutations, weighed by means of techniques of molecular mutagenesis in *Xenopus oocytes* or in mammalian cells, consist basically of a variable decrease of maximal currents carried on by Q2/Q3 channels. The different degree of current reduction allows to explain genotype/phenotype relationships. The age-dependency of BFNC has been linked to the inhibitory role of potassium channels (KCNQK+) in the central nervous system of newborns, while GABAergic neurotransmission plays an inhibitory role only in the course of the first year of life.*

Studies are ongoing on the modulating action of potassium channels of molecules such as retigabine and flupirtine, thus allowing for specific drugs for the treatment of these channelopathies.

Clinica delle BFNC

Le convulsioni neonatali familiari benigne (BFNC) costituiscono una rara (I: 1/100.000) forma di epilessia geneticamente determinata, inserita nella attuale classificazione internazionale delle epilessie e sindromi epilettiche (ILAE, 1989) tra le epilessie generalizzate idiopatiche. Le BFNC però, in base a considerazioni elettrocliniche, vengono attualmente incluse tra le epilessie focali dalla recente proposta di revisione della Classificazione delle epilessie¹⁶.

I criteri diagnostici delle BFNC sono i seguenti: 1) ricorrenza di crisi brevi e frequenti a partire dal 2° giorno di vita, che scompaiono spontaneamente in poche settimane (generalmente 4); 2) una storia familiare positiva per convulsioni neonatali secondo un pattern di eredità autosomico dominante; 3) esclusione di altre cause di convulsioni neonatali; 4) esame obiettivo nella norma così come il successivo sviluppo psicomotorio. Spesso le crisi possono essere precedute da una componente motoria tonica diffusa, seguita da diverse componenti motorie (essenzialmente cloniche) e vegetative (apnea), sia unilaterali che bilaterali, più o meno simmetriche. Nell'intervallo tra le crisi, i neonati sono in genere partecipi, si alimentano e di regola non è necessario alcun trasferimento in patologia neonatale intensiva.

L'EEG intercritico può essere normale, discontinuo o includere anomalie focali o multifocali, o ancora un teta puntuto alternante³⁷. Spesso le crisi iniziano con un appiattimento diffuso dei bioritmi di fondo, seguito da punte focali o generalizzate oppure onde lente della durata pari alla manifestazione clinica. Il riscontro video-EEG di reperti francamente focali, così come le crisi, ha fatto dunque ridiscutere il carattere generalizzato di queste crisi, sicché nella revisione di Engel et al.¹⁶ le BFNC sono state ricollocate tra le epilessie focali idiopatiche. Quanto alle convulsioni neonatali benigne (non familiari), anche definite BINC (*benign idiopathic neonatal convulsions*), esse si differenzerebbero dalle BFNC per la mancanza di familiarità per convulsioni neonatali, per un esordio tardivo rispetto alle BFNC (4°-5° giorno di vita rispetto al 2°-3° giorno nelle BFNC), per una tendenza chiara ad essere più prolungate (> 20 ore). Nelle BINC, inoltre, sarebbe meno frequente il verificarsi di una epilessia successiva (0,5% rispetto al 10-11% per le BFNC). Infine, problemi neurologici minori sarebbero più frequenti nelle BINC rispetto alle BFNC.

Quanto al tipo di crisi nelle BINC, esse sono state descritte come cloniche, soprattutto parziali, con o senza apnea, ma mai toniche.

Genetica delle BFNC

Il primo locus di suscettibilità per le BFNC è stato mappato sul cromosoma 20, in una famiglia italiana (4 generazioni; 19 membri affetti)²⁵. Un secondo locus è stato identificato sul cromosoma 8²⁸. Successivamente è stato riportato che mutazioni nei geni *KCNQ2* e *KCNQ3*, che mappano rispettivamente i cromosomi 20q13.3 ed 8q24, causano BFNC^{3 4 9 19 24 26 43}. Le BFNC pertanto vengono distinte in due gruppi: BFNC1 (MIM121200) che è legata al cromosoma 20 e rappresenta il fenotipo più frequente, mentre BFNC2 (MIM 121201) è legata al cromosoma 8. Le alterazioni sinora descritte, causa del fenotipo BFNC, sono nella maggior parte delezioni, inserzioni o mutazioni *splice-site*, molte delle quali inducenti *frame-shifts* o codoni di stop prematuri nelle proteine rispettive. In *KCNQ2* sono state identificate, al momento, 49 mutazioni: quattro all'N-terminale, una nel dominio S1, una nel dominio S2, una nel *loop* citoplasmatico S2-S3, cinque nel sensore del voltaggio S4, una nel *loop* citoplasmatico S4-S5, quattro nel quinto dominio transmembrana S5, tre nella porzione del poro nel *loop* S5-S6, una nel dominio S6; la maggior parte, ventotto, giacciono nella regione C-terminale (sette coinvolgono siti di *splicing*) (Tab. I, Fig. 1)^{1 3 4 7 10 12 14 15 24 26 27 31 32 34 43 44 50}. Sono state invece descritte solo tre mutazioni missenso nella regione del poro in *KCNQ3*^{9 19 44}. La prevalenza di almeno dieci volte di mutazioni sul *KCNQ2* rispetto al *KCNQ3* suggerisce che il *KCNQ3* può avere un ruolo funzionale maggiore. Infatti, gli studi in vitro che dimostrano che il *KCNQ3*, e non il *KCNQ2*, coassembla con il *KCNQ5* a formare unità eteromeriche alla base delle correnti M confermano questa ipotesi²⁷.

Dalla Tabella I emerge che la maggioranza (55%) delle mutazioni nel *KCNQ2* si riscontrano nel C-terminus. Da notare l'assenza di mutazioni nel dominio di transmembrana S3, così come nel *loop* extracellulare S1-S2, in entrambe le proteine *KCNQ2* e *KCNQ3*. Un dato analogo si riscontra anche per il *KCNQ1*⁴⁷. Il tipo più frequente di mutazione nel *KCNQ2* identificata attualmente è il troncamento (*truncation*) del C-terminus causato sia da mutazioni nonsense che frameshift. L'estremità carbossi-terminale è importante nel co-assemblaggio delle subunità, così come emerso dallo studio di canali chimerici costruiti mediante scambio di questa regione tra le subunità *KCNQ1*, *KCNQ2* e *KCNQ3*⁴². Due domini della regione C-terminus hanno dimostrato di interagire con la calmodulina, per cui la riduzione di legame con quest'ultima comporta una ipoattività del canale⁵⁵. Mutazioni di tipo *truncating* (Q232X e R448X) o tipo *insertion* (es. 867insGGGCC), interessanti il C-terminus, causano riduzioni di corrente maggiori rispetto ad altre mutazioni a carico di segmenti di transmembrana.

Sono state inoltre descritte alcune famiglie^{43 44} con mutazioni sul *KCNQ2* in cui vi è aggregazione di casi con crisi ad esordio nel periodo neonatale tipiche della BFNC e di casi con crisi ad esordio dopo il 4° mese di vita, caratteri-

Tab. I. Elenco delle mutazioni attualmente riportate in letteratura.

Regione	Cambiamento aminoacidico
Proteica	M1V (Richards et al., 2004); MIT (Richards et al., 2004); codone 68insC Frameshift (proteina troncata) (Richards et al., 2004); codone 78deIC Frameshift (proteina troncata) (Claes et al., 2004)
N-terminale	105deICCT In-frame deletion (Claes et al., 2004)
S1	codone 129 ⁺ G/T Frameshift (Singh et al., 2003)
S2	codone 153insT Frameshift (Moulard et al., 2001)
S2-S3	A196V/L197P (Moulard et al., 2001); R207V (Dedek et al., 2001); M208V (Singh et al., 2003); R214W (Miraglia del Giudice et al., 2000)
S4	R214W (Miraglia del Giudice et al., 2000)
S4-S5	H228Q Singh et al., 2003
S5	L243F (Singh et al., 2003); S247W (Dedek et al., 2003); V250G (Moulard et al., 2001); 254deI10insA Frameshift (proteina troncata) (Bassi et al., 2005)
S5-S6	W269X Singh et al., 2003
Poros	283insGT Frameshift (proteina troncata) (Singh et al., 1998); Y284C (Singh et al., 1998)
S6	A306T Singh et al., 1998
c-terminale	494deI13 Frameshift (Lerche et al., 2001); codone516 Variante di splicing (Lerche et al., 2001); 522deI13 Frameshift (proteina troncata) (Singh et al., 1998); K526N (Borgatti et al., 2004); 534ins5bp Frameshift (proteina troncata) (Biervert et al., 1998); 544-1G/A Variante di splicing (Singh et al., 1998); R553Q (Moulard et al., 2001); R570; Variante di splicing (Richards et al., 2004); R581X (Singh et al., 2003); 616deIT Frameshift (proteina allungata) (Biervert and Steinlein, 1999); L619R (Richards et al., 2004); 644deI1 Frameshift (proteina allungata) (Tang et al., 2004); 653deI1 Frameshift (Singh et al., 2003); 678deIT Frameshift (proteina allungata) (Coppola et al., 2003); 838deIG Frameshift (proteina allungata) (Lerche et al., 1999 Singh et al., 2003)

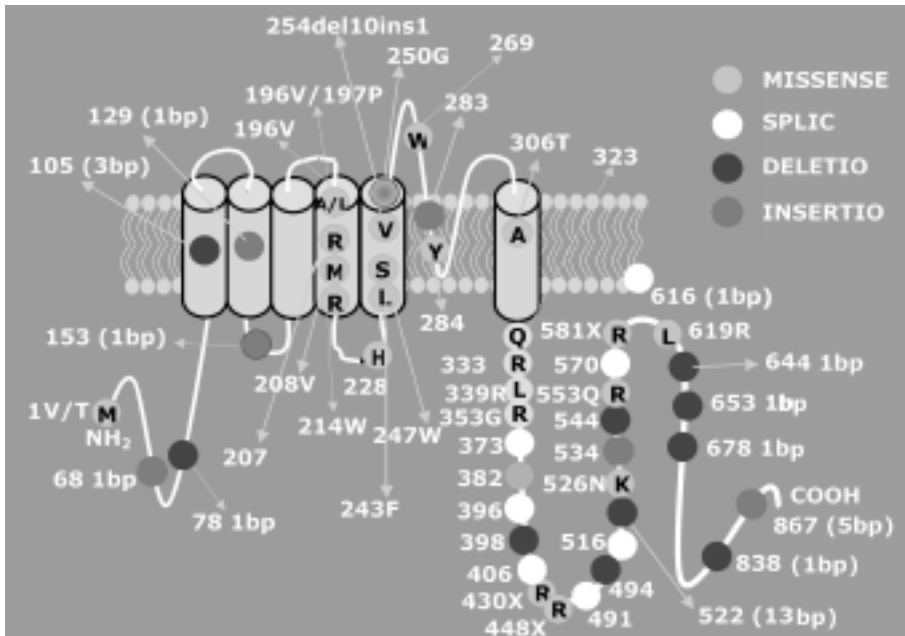


Fig. 1. Sede delle 49 mutazioni descritte fino ad ora a carico della subunità KCNQ2. KCNQ2 mutations and BFNC.

stiche della BFIS (convulsioni familiari benigne infantili). Da rilevare è che, almeno un individuo in ciascuna di queste famiglie, ha l'esordio delle crisi nella prima settimana di vita – caratteristica peculiare delle BFNC.

Sono poi state riportate altre due famiglie con mutazioni sul KCNQ2, in cui sono presenti caratteristiche cliniche peculiari. In una famiglia, Dedek et al.¹⁴ hanno riportato una mutazione (R207W) nel dominio S4 del canale KCNQ2 associata a convulsioni neonatali e sviluppo successivo di mioclimie. In tale studio, si dimostra che il KCNQ2 svolge un ruolo significativo sia nel sistema nervoso centrale che periferico. In un'altra famiglia con mutazione missenso nel gene KCNQ2 (K526N), che va a destrutturare la configurazione tridimensionale della regione del C-terminus, Borgatti et al.⁷ hanno riportato quattro membri di cui due affetti da BFNC tipica ed altri due rispettivamente da encefalopatia epilettica grave e da crisi focali con ritardo mentale. Questi Autori concludono ipotizzando che cause genetiche piuttosto che acquisite possano essere correlabili con la variabilità fenotipica dei sintomi neurologici in questa famiglia.

Un dato analogo è stato riportato da Dedek et al.¹⁵ in una famiglia in cui due soggetti (madre e figlio), rispettivamente con crisi neonatali farmacoresistenti o una franca encefalopatia epilettica, sono stati riscontrati portatori di una mutazione missenso S247W nella regione S5, associata ad una riduzione del

50% delle correnti di canale. Tali Autori ipotizzano che alcune mutazioni KCNQ2 possano essere associate ad un rischio aumentato di epilessia precoce severa infantile, per cui studi di mutazione sul KCNQ2 non andrebbero tralasciati in bambini con encefalopatie epilettiche precoci e storia familiare positiva per convulsioni neonatali.

Va infine citata la possibilità di riscontrare mutazioni de novo del KCNQ2 in soggetti con convulsioni neonatali benigne non familiari o anche in piccole famiglie con BFNC¹⁰. Questo riscontro suggerisce che è opportuno fare uno studio di mutazione per il KCNQ2/KCNQ3 anche in casi isolati ben tipizzati.

Va sottolineato come l'incapacità di identificare altre mutazioni possa derivare dai limiti delle attuali metodiche ad identificare nuove larghe delezioni o duplicazioni, inversioni, mutazioni in regioni regolatrici del KCNQ2 e KCNQ3, oppure dal ruolo possibile di altri geni. Il recente riscontro di mutazioni nella subunità alfa2 del canale del sodio voltaggio-gated in due famiglie con convulsioni familiari benigne neonatali-infantili, supporta quest'ultima ipotesi¹⁸.

Ne consegue che, in caso di assenza di mutazioni del KCNQ2 e KCNQ3, lo studio genetico delle BFNC va esteso comunque al sequenziamento del SCN2A.

Canali ionici del potassio

I canali del potassio si trovano virtualmente in tutte le cellule sia animali che vegetali. In base alla struttura si suddividono in due famiglie: quelli che possiedono 6 domini transmembrana e quelli con 2 domini. Il primo gruppo può ulteriormente essere suddiviso in 6 famiglie di geni conservati. Essi comprendono i canali voltaggio-gated (*Kvchannels*), i canali KCNQ, gli *eag-like* canali del potassio ed i tre tipi di canali del potassio attivati dal calcio. Mutazioni nei geni che codificano membri di queste subfamiglie di canali del potassio portano ad un numero di malattie, come l'ataxia episodica, la sindrome del QT lungo ed epilessia (BFNC).

I canali KCNQ2 e KCNQ3 appartengono, infatti, ad un sottogruppo di geni dei canali del potassio che sono stati implicati in diverse affezioni. Il KCNQ1 è risultato mutato nella sindrome di Romano Ward del QT lungo associata a ripolarizzazione prolungata del muscolo cardiaco e, ancora, alla sindrome Jervell e Lange-Nielsen, caratterizzata dall'intervallo QT-lungo e sordità⁴⁷. Il KCNQ4 risulta mutato nel deficit uditivo autosomico dominante non sindromico¹³. L'ultimo membro di questa famiglia di geni, il KCNQ5, che è espresso nel cervello e nel muscolo scheletrico, resta da essere implicato in una malattia²⁷.

Questi canali del potassio sono tipicamente chiusi in condizioni di potenziale di riposo della cellula, ma si aprono allorché la membrana si depolarizza. Essi partecipano al controllo del potenziale di riposo neuronale ed alla ripolarizzazione del potenziale dopo periodi prolungati di attività elettrica, nonché al-

l'accomodazione della frequenza di scarica; essi hanno inoltre un ruolo nel regolare l'eccitabilità elettrica del nervo e delle fibre muscolari, incluso il cuore. Essi modulano, altresì, la trasmissione sinaptica e la secrezione dalle cellule endocrine (es. cellule beta-pancreatiche) e nervose.

La struttura della subunità KCNQ comprende sei segmenti transmembrana (S1-S6) con un dominio tipico S4, un *loop* del poro che collega il segmento S5-S6 e i terminali intracellulari N e C (Fig. 2a).

L'identificazione delle mutazioni nei geni omologhi KCNQ2 e KCNQ3 dei canali del potassio in uno stesso disordine (BFNC) supporta l'ipotesi che questi due canali del potassio possano costituire una singola entità funzionale. Infatti, la coespressione del KCNQ2 e del KCNQ3 forma un canale funzionale del potassio eteromero, che genera correnti 11 volte superiori a quelle di ciascun canale omomero⁵⁴ (Fig. 2b-d). Ulteriore evidenza della co-localizzazione e del ruolo associato funzionale deriva dalla evidenza istochimica, che mostra che il KCNQ2 ed il KCNQ3 co-immuno precipitano in lisati di cervello umano¹¹. Importante è che Wang et al.⁵² hanno dimostrato che la corrente M, una corrente del potassio tonica inibitoria, è generata dalle proteine KCNQ2 e KCNQ3. La corrente M ha un ruolo principale nel controllare l'eccitabilità, in quanto regola la capacità del neurone di generare un potenziale di azione³⁰. La riduzione farmacologica della corrente M produce un *firing* eccessivo dei potenziali tipici di una crisi epilettica.

L'espressione di alcune mutazioni suggerisce che una perdita parziale di funzione nelle correnti del potassio è sufficiente a produrre un fenotipo epilettico e che mutazioni dominanti negative sia nel KCNQ2 che KCNQ3 possono determinare un fenotipo anche più severo²¹. Ciò è confermato dal topo *knock-out* omozigote per il KCNQ2, che muore subito dopo la nascita⁵³, nonché da un modello murino transgenico per l'espressione di una proteina mutante di KCNQ2, che provoca un effetto dominante-negativo³⁶. La scoperta di nuove mutazioni per la BFNC, che alterino le correnti M con nuovi meccanismi e modalità, potrebbe portare alla comprensione della regolazione della eccitabilità nel sistema nervoso centrale dei mammiferi.

Analisi funzionale delle mutazioni/correlazione genotipo-fenotipo

Fino ad oggi, 49 mutazioni sul KCNQ2 e tre sul KCNQ3 sono state riscontrate in famiglie affette da BFNC. Le conseguenze funzionali causate da queste mutazioni possono essere studiate riproducendo le stesse mutazioni nel cDNA codificante per il KCNQ2 e KCNQ3, mediante tecniche di mutagenesi molecolare, ed esprimendo i canali con queste mutazioni in sistemi di espressione eterologhi. Questo consente di paragonare la funzione di canali, composti da subunità mutate, con quelli con subunità *wild-type*, mediante tecniche elettrofisiologiche o biochimiche. I sistemi di espressione eterologa impiegati at-

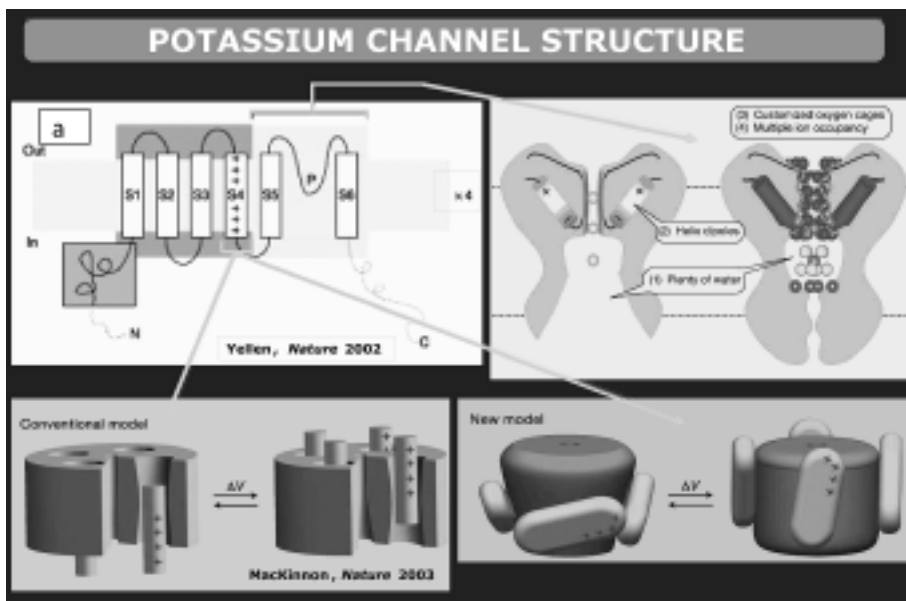


Fig. 2. Struttura del canale del potassio KCNQ. La struttura eteromerică, che funziona come un canale attivo del potassio, è determinata dall'assemblaggio delle subunità KCNQ2-KCNQ3 e KCNQ3-KCNQ5. La formazione di canali eteromerică è fondamentale per una sufficiente espressione dei canali attivi sulla membrana cellulare.

tualmente comprendono gli oociti di *Xenopus*, che possono essere iniettati con il cRNA trascritto in vitro da questi cDNA mutati, o le cellule di mammifero, che possono essere forzate ad esprimere i canali specifici mediante tecniche di transfezione.

Non tutte le mutazioni trovate nelle famiglie con BFNC sono state studiate in sistemi di espressione eterologhi; quelle mutazioni, le cui conseguenze funzionali sono state investigate^{4 26}, causano una piccola (< 25%) riduzione delle correnti massimali trasmesse dai canali Q2/Q3; soltanto due mutazioni hanno causato una riduzione più drammatica, consistente in un effetto dominante negativo^{14 44}. Il meccanismo, mediante il quale le mutazioni KCNQ2 inducono una riduzione nelle correnti massimali, è eterogeneo. In particolare, sono stati descritti cambiamenti nelle cinetiche di apertura e chiusura dei canali, che incorporano subunità mutanti, in risposta alle variazioni di potenziale. Una di queste mutazioni, la R214W³¹, che causa la sostituzione della arginina più interna del sensore di voltaggio nel segmento S4, quando espressa nell'oocita di *Xenopus*, causa una modesta riduzione nelle cinetiche di attivazione del canale con tutti i potenziali testati. Di interesse è che questi cambiamenti sono stati riscontrati sia in canali composti solo da subunità mutate

(configurazione omomerica) sia in canali in cui solo due o una subunità erano incorporate (configurazione eteromerica). Ciò è importante dal momento che, a causa del tipo dominante di trasmissione genetica, solo uno degli alleli KCNQ2 è mutato nei pazienti BFNC; perciò, pazienti con la mutazione si suppone esprimano soprattutto canali eteromerici, contenenti cioè subunità mutate e *wild type*.

Di interesse è, poi, un'altra mutazione riscontrata nella regione S4¹⁴; questa mutazione (R207W) causa la sostituzione della terza arginina nella regione dell'S4 ed induce, quando espressa nell'oocita di *Xenopus*, cambiamenti di *gating* simili, anche se più drammatici di quelli legati alla mutazione R214W. Il fatto che le conseguenze funzionali della mutazione R207W nel KCNQ2 siano più drammatiche di quelle descritte per il R214W solleva la stimolante possibilità che il fenotipo "miochimia" associato alla BFNC in pazienti con questa mutazione potrebbe essere causato dalla minore sensibilità dell'eccitabilità neuronale alla ridotta riserva di ripolarizzazione causata dalla mutazione. Questa ipotesi è anche supportata dalla abbondante presenza di subunità KCNQ2 nelle corna anteriori del midollo spinale¹⁴.

Una notevole percentuale di mutazioni che causano la BFNC nel Q2 sono rappresentate da inserzioni o delezioni che comportano cambiamenti nella sequenza primaria del lungo terminale C citosolico, dove sono stati riconosciuti rilevanti siti per la regolazione funzionale. Infatti, sequenze specifiche all'interno di questa regione (la cosiddetta "regione di interazione tra le subunità" o sid)⁴¹ determina la specificità dell'insieme di subunità del KCNQ, e fornisce siti dove altre proteine di segnale come la calmodulina⁵⁵, la proteinkinasi A e C e le proteine ancoranti la chinasi²⁰ interagiscono con le subunità KCNQ e modulano l'attività del canale.

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente descritto¹² una mutazione Q2 in un paziente con BFNC, che più tardi ha mostrato un tratto EEG caratterizzato da punte centrotorali all'età di 3 anni e, dopo alcuni mesi, crisi parziali motorie in sonno; la mutazione è una delezione 1-bp (2043_T) nell'esone 16 del Q2, che comporta la sostituzione dell'aminoacido 163 del C-terminale con conseguente estensione della subunità Q2 di altri 56 residui. Gli studi elettrofisiologici negli oociti di *Xenopus* e nelle cellule transfette di mammifero hanno rivelato che le subunità del canale del potassio con la mutazione 2043_T non danno origine a canali omomerici funzionali²⁶. In uno studio recente⁴⁶, sono stati investigati i meccanismi molecolari responsabili della mancanza di correnti voltaggio-dipendenti del potassio funzionali, osservata in seguito all'espressione delle subunità Q2 mutate per il 2043_T, mediante un approccio combinato biochimico, immunocitochimico ed elettrofisiologico in cellule di mammifero transfette. I risultati ottenuti mostrano che la mutazione 2043_T riduce i livelli cellulari allo stato stazionario delle subunità Q2, come conseguenza di un marcato incremento della loro degradazione. Quest'ultima sem-

bra verificarsi mediante le vie proteosomiche e porta ad una drastica riduzione dell'invio delle subunità mutate sulla membrana citoplasmatica. Inoltre, la coespressione con le subunità Q3, almeno parzialmente, contrasta l'aumentata degradazione causata dalla mutazione 2043_T nel Q2, inducendo l'espressione di canali funzionali eteromerici composti da subunità 2043_T Q2 e Q3 nella membrana citoplasmatica. Il presente risultato suggerisce che l'accelerata degradazione indotta dalla mutazione delle subunità Q2 può rappresentare un nuovo meccanismo molecolare che causa epilessia nei neonati. In aggiunta, questi risultati potrebbero contribuire alla comprensione delle correlazioni genotipo-fenotipo per alcune caratteristiche cliniche o elettroencefalografiche associate in alcune famiglie con BFNC. Infatti, il probando affetto dalla mutazione 2043_T in Q2 ha sviluppato un tratto CTS e successivamente crisi rolandiche all'età di 3 anni, alquanto prima dell'età media (7 anni) di comparsa di queste crisi nella popolazione generale¹². In un'altra recente mutazione nel C-terminale (1931_G), localizzata in prossimità della mutazione 2043_T, l'età di remissione (12-18 mesi) è risultata ritardata rispetto alla maggioranza dei pazienti con BFNC (3-6 mesi)⁵⁰. D'altro canto, la mutazione più distale 2513_G nel Q2 ha prodotto conseguenze funzionali meno drammatiche, dal momento che pazienti con questa mutazione hanno mostrato la classica sintomatologia della BFNC, senza alterazioni clinico-EEG successive²⁶. Sicché, si potrebbe ipotizzare che le mutazioni Q2 a carico delle porzioni più distali del C-terminale causano conseguenze meno rilevanti sulla eccitabilità neuronale con conseguente fenotipo clinico più lieve.

Età-dipendenza delle BFNC

Rimane da comprendere l'esatto meccanismo dell'età-dipendenza e della tendenza allo sviluppo di crisi epilettiche nelle età successive in una minoranza di pazienti (11%). Di recente, è stato dimostrato che i canali del potassio (KCNQ-K+) svolgono un ruolo principalmente inibitorio nel sistema nervoso centrale dei neonati, dal momento che la neurotrasmissione gabaergica governa il sistema inibitorio nei mesi successivi³³. Sicché, un deficit di funzione dei canali del potassio causa convulsioni nel corso del periodo neonatale. Nei cervelli maturi, al contrario, la disfunzione dei canali del potassio non può di per sé influenzare la soglia epilettogena in condizioni basali, ma può comportare crisi convulsive in condizioni di ipereccitabilità neuronale.

Questi dati³³ sembrano confermare che un deficit di KCNQ-K+ è coinvolto nell'età-dipendenza delle BFNC e nella tendenza a poter sviluppare epilessia nelle età successive.

BFNC e sviluppo di altre epilessie

Nelle famiglie con BFNC vi è un rischio aumentato di sviluppare altre crisi nelle età successive^{2 39}. Questo dato è stato confermato di recente da Singh et al.⁴⁴ in otto di sedici famiglie con mutazione KCNQ2. Lo sviluppo di crisi rolandiche e del tratto rolandico è stato riportato da diversi Autori^{12 29 44}; le crisi rolandiche tendono a presentarsi precocemente (verso i 3-4 anni) ed in qualche caso si mostrano “resistenti” al trattamento. Scompaiono nell’adolescenza senza compromissione delle funzioni intellettive. Non è possibile attualmente stabilire la reale incidenza del tratto CTS in soggetti con BFNC; è auspicabile la ricerca sistematica, in questi soggetti, del tratto EEG rolandico in sonno a partire dai 3 anni d’età. In altre famiglie sono presenti convulsioni febbrili, crisi di assenza e convulsioni tonico-cloniche generalizzate, spesso ad esordio dopo il primo anno di vita^{34 44}. Vi è poi considerevole variabilità intrafamiliare quanto ad età d’esordio e tipo di crisi. In alcuni casi, le crisi ad esordio tardivo possono facilmente essere provocate da stimoli uditivi o da tensione emotiva³⁹. L’esordio delle crisi può infine essere davvero molto tardiva: in un famiglia³¹, il bisnonno materno (portatore di mutazione sul KCNQ2) della probanda ha manifestato crisi parziali in sonno all’età di 81 anni, in assenza di qualunque disordine neurologico evidente. Infine, dai dati della letteratura, emerge che mutazioni del KCNQ2, con effetti paragonabili sulle correnti del K+, si associano allo sviluppo di crisi tardive diverse per tipologia e frequenza.

Consiglio genetico

Considerando che le BFNC sono a trasmissione autosomico-dominante a penetranza incompleta (> 85%), il rischio di ricorrenza è ovviamente alto. In una famiglia da noi studiata, fu possibile prevedere il verificarsi delle convulsioni neonatali in una sorellina della probanda, sicché si raccomandò alla madre di partorire in un centro ospedaliero dotato di Patologia neonatale. Le BFNC sono una forma benigna, da alcuni non considerata epilessia, in considerazione della sua storia naturale, limitata al primo semestre di vita.

Implicazioni farmacologiche delle canalopatie del potassio

Il coinvolgimento dei canali del potassio KCNQ2 e KCNQ3 nelle BFNC, così come del KCNQ4 nella sordità congenita, e la scoperta che eteromultimeri neuronali del KCNQ sono tra i substrati molecolari delle correnti M, ha suscitato un notevole interesse per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Un numero di piccoli composti con caratteristiche di modulatori sono stati rapida-

mente identificati, comprendenti molecole attivatrici (*openers*) quali il farmaco antiepilettico retigabina e l'analgescico flupirtina, con caratteristiche strutturali analoghe, nonché un gruppo di inibitori (*blockers*) del KCNQ, inizialmente sviluppati come stimolanti l'apprendimento. Tutti questi dati hanno suggerito un target terapeutico ampio per i modulatori dei canali KCNQ neuronali, comprendenti una varietà di disordini che vanno dall'ipereccitabilità neuronale per gli attivatori (*openers*), quali le epilessie, il dolore acuto, il dolore neuropatico, la cefalea ed alcuni disturbi neurodegenerativi e psichiatrici. Gli inibitori (*blockers*) del KCNQ potrebbero altresì avere un ruolo utile in disordini caratterizzati da ipoattività neuronale, inclusi i disturbi dell'apprendimento e, forse, i disturbi dell'umore. Dati emergenti dalla letteratura suggeriscono un significativo interesse dell'industria farmaceutica per la modulazione neuronale del KCNQ.

La retigabina (D-23129; RT) è un nuovo farmaco antiepilettico attualmente in corso di valutazione in studi clinici sulle crisi parziali⁶. RT si è dimostrata efficace in un vasto numero di modelli sperimentali di epilessia e crisi sia in vitro che in vivo. RT è inoltre efficace nella terapia del dolore neuropatico⁵ e nella cura degli stati d'ansia in modelli sperimentali²³. La flupirtina (FP), un analogo strutturale della retigabina, appartiene alla classe delle triaminopiridine ed è impiegato con successo nella clinica come analgesico non-oppiaceo⁵⁰. A dosi simili a quelle analgesiche, la flupirtina agisce anche come anticonvulsivante²² e come miorilassante¹⁷.

Diverse modalità di azione sono state ipotizzate per spiegare gli effetti anticonvulsivanti ed analgesici della retigabina e flupirtina; tra queste, il potenziamento della corrente M (I_{km}), la cui attivazione riduce la eccitabilità neuronale. La corrente M è coinvolta in maniera critica nella epilettogenesi umana, come dimostrato dal suo coinvolgimento nella BFNC. Di recente, l'acido meclofenamico ed il diclofenac hanno mostrato di potenziare le correnti M, potendo svolgere in vivo una azione anticonvulsiva³⁵.

Conclusioni

Le BFNC rappresentano uno dei rari esempi di epilessie dell'uomo a trasmissione mendeliana, quindi di tipo semplice. I geni implicati fino ad ora sono due, anche se esistono famiglie con casi ben tipizzati, per le quali sono state escluse mutazioni sul KCNQ2 e KCNQ3. Ancora molto resta poi da spiegare sul complesso passaggio dalla mutazione genica al fenotipo clinico, così come al successivo sviluppo, in una minoranza di casi, di altre forme di epilessia nelle età successive.

Riassunto

Le convulsioni neonatali familiari benigne sono legate a mutazioni a carico dei geni che codificano per le subunità del canale del potassio KCNQ2 e KCNQ3, che mappano rispettivamente i cromosomi 20q13.3 e 8q24. I canali del potassio si trovano virtualmente in tutte le cellule animali e vegetali e partecipano al controllo del potenziale di riposo neuronale ed alla ripolarizzazione del potenziale di membrana, avendo pertanto un ruolo nel regolare l'eccitabilità elettrica del nervo e delle fibre muscolari, incluso il cuore. Anomalie sia di KCNQ2 che KCNQ3 comportano disfunzioni nella corrente M, che controlla la soglia di eccitabilità neuronale. La maggioranza delle mutazioni descritte interessano il KCNQ2, mentre solo tre sono le mutazioni riscontrate sul KCNQ3. Le mutazioni riportate sono in prevalenza delezioni, inserzioni o mutazioni *splice-site* inducenti *frame-shifts* o codoni di stop prematuri. Oltre la metà delle mutazioni sono a carico del terminale carbossilico della subunità KCNQ2, che può risultare troncato in misura più o meno marcata. Le conseguenze funzionali di queste mutazioni, studiate mediante tecniche di mutagenesi molecolare in oociti di *Xenopus* oppure in cellule di mammifero, consistono essenzialmente in una riduzione di entità variabile delle correnti massimali trasmesse dai canali Q2/Q3, evento che in taluni casi consente di poter spiegare correlazioni genotipo-fenotipo. L'età-dipendenza delle BFNC è stata inoltre correlata al ruolo essenzialmente inibitorio dei canali del potassio (KCNQK+) nel sistema nervoso centrale dei neonati, dal momento che la trasmissione GABAergica svolge un ruolo inibitorio solo nei mesi successivi. Sono in corso studi sul ruolo possibile di molecole modulatorie di questi canali, quali il farmaco antiepilettico retigabina e l'analgescico flupirtina, in modo da poter disporre di farmaci specifici per la terapia di queste canalopatie.

Bibliografia

- 1 Bassi MT, Balottin U, Panzeri C, Piccinelli P, Castaldo P, Barrese V, et al. *Functional analysis of novel KCNQ2 and KCNQ3 gene variants found in a large pedigree with benign familial neonatal convulsions (BFNC)*. Neurogenetics 2005;6:185-93.
- 2 Berkovic SF, Kennerson ML, Howell RA, Scheffer IE, Hwang PA, Nicholson GA. *Phenotypic expression of benign familial neonatal convulsions linked to chromosome 20*. Arch Neurol 1994;51:1125-8.
- 3 Biervert C, Steinlein OK. *Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for Benign Familial Neonatal Convulsions*. Hum Genet 1999;104:234-40.
- 4 Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C. *A potassium channel mutation in Neonatal Human Epil*. Science 1998;279:403-6.
- 5 Blackburn-Munro G, Jensen BS. *The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain*. Eur J Pharmacol 2003;460:109-16.
- 6 Blackburn-Munro G, Erichsen HK. *Antiepileptics and the treatment of neuropathic pain: evidence from animal models*. Curr Pharm Des 2005;11:2961-76.

- 7 Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, et al. *A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNc, drug resistant epilepsy, and mental retardation.* Neurology 2004;63:57-65.
- 8 Castaldo P, del Giudice EM, Coppola G, Pascotto A, Annunziato L, Tagliatela M. *Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels.* J Neurosci 2002;22:RC199.
- 9 Charlier C, Singh NA, Ryan SG. *A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family.* Nat Genet 1998;18:53-5.
- 10 Claes LR, Ceulemans B, Audenaert D, Deprez L, Jansen A, Hasaerts D, et al. *De novo KCNQ2 mutations in patients with benign neonatal seizures.* Neurology 2004;63:2155-8.
- 11 Cooper EC, Jan LY. *Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges.* PNAS 1999;96:4759-66.
- 12 Coppola G, Castaldo P, Miraglia A. *A novel KCNQ2 K+ channel mutation in benign neonatal convulsions and centrotemporal spikes.* Neurology 2003;61:131-4.
- 13 Coucke PJ, Van Hauwe P, Kelley PM. *Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families.* Hum Molecular Genet 1999;8:1321-8.
- 14 Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK. *Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K+ channel.* Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:12272-7.
- 15 Dedek K, Fusco L, Teloj N, Steinlein OK. *Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2.* Epilepsy Res 2003;54:21-7.
- 16 Engel J Jr. *International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology.* Epilepsia 2001;42:796-803.
- 17 Friedel HA, Fitton A. *Flupirtine. A review of its pharmacological properties, and therapeutic efficacy in pain states.* Drugs 1993;45:548-69.
- 18 Heron SE, Crossland KM, Andermann E. *Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures.* Lancet 2002;360:851-2.
- 19 Hirose S, Zenri F, Akiyoshi H. *A novel mutation of KCNQ3 (c.925T→C) in a Japanese family with Benign Familial Neonatal Convulsions.* Ann Neurol 2000;47:822-6.
- 20 Hoshi N, Zhang JS, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, et al. *AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M current by muscarinic agonists.* Nat Neurosci 2003;6:564-71.
- 21 Jentsch TJ. *Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease.* Nat Rev Neurosci 2000;1:21-30.
- 22 Kapetanovic IM, Yonekawa WD, Kupferberg HJ. *The effects of D-23129, a new experimental anti-convulsant drug, on neurotransmitter amino acids in the rat hippocampus in vitro.* Epilepsy Res 1995;22:167-73.
- 23 Korsgaard MP, Hartz BP, Brown WD, Ahring PK, Strobaek D, Mirza NR. *Anxiolytic effects of Maxipost (BMS-204352) and retigabine via activation of neuronal Kv7 channels.* J Pharmacol Exp Ther 2005;314:282-92.
- 24 Lee WL, Biervert C, Hallmann K, Tay A, Dean CS, Steinlein OK. *A KCNQ2 splice-site mutation causing Benign Neonatal Convulsions in a Scottish family.* Neuropediatrics 2000;31:9-12.
- 25 Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T. *Benign Familial Neonatal Convulsions linked to genetic markers on chromosome 20.* Nature 1989;337:647-8.
- 26 Lerche H, Biervert C, Alekov AK, Schleithoff L, Lindner M, Klinger W, et al. *A reduced K+ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes Neonatal Convulsions.* Ann Neurol 1999;46:305-12.
- 27 Lerche C, Scherer CR, Seeböhm G, Derst C, Wei AD, Busch AE, et al. *Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity.* J Biol Chem 2000;275:22395-400.
- 28 Lewis TB, Leach RJ, Ward K. *Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q.* Am J Hum Gen 1998;18:53-5.
- 29 Maihara T, Tsuji M, Higuchi Y, Hattori H. *Benign familial neonatal convulsions followed by benign epilepsy with centrotemporal spikes in two sibilings.* Epilepsia 1999;40:110-3.

- ³⁰ Marrion NV. *Control of M-current*. Annu Rev Physiol 1997;59:483-504.
- ³¹ Miraglia del Giudice E, Coppola G, Scuccimarra G, Cirillo G, Bellini G, Pascotto A. *Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor*: Eur J Hum Gen 2000;8:994-7.
- ³² Moulard B, Picard F, le Hellard S. *Ion channel variation causes epilepsies*. Brain Res Brain Res Rev 2001;36:275-84.
- ³³ Okada M, Zhu G, Hirose S, Ito KI, Murakami T, Wakui M, et al. *Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels*. Epilepsy Res 2003;53:81-94.
- ³⁴ Pereira S, Roll P, Krizova J. *Complete loss of the cytoplasmic carboxyl terminus of the KCNQ2 potassium channel: a novel mutation in a large Czech pedigree with benign neonatal convulsions or other epileptic phenotypes*. Epilepsia 2004;45:384-90.
- ³⁵ Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, et al. *Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties*. Mol Pharmacol 2005;67:1053-66.
- ³⁶ Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D. *Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior*: Nat Neurosci 2005;8:51-60.
- ³⁷ Pluoin P. *Benign familial neonatal convulsions and benign idiopathic neonatal convulsions*. In: Pedley ET jr, ed. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Chapter 214, pp. 2247-54.
- ³⁸ Robinson R, Gardiner M. *Genetics of childhood epilepsy*. Arch Dis Child 2000;82:121-5.
- ³⁹ Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, Anderson VE, Leppert M. *Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions*. Neurology 1993;43:1355-60.
- ⁴⁰ Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. *Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy*. Nature 1998;396:687-90.
- ⁴¹ Schwake M, Jentsch JJ, Friedeiche MA. *A carboxy-terminal domain determines subunit specificity of KCNQK⁺ channel assembly*. EMBO Rep 2003;4:76-81.
- ⁴² Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, Jentsch TJ. *Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy*. JBC 2000;275:13343-8.
- ⁴³ Singh NA, Charlier C, Stauffer D. *A novel potassium channel gene, KCNQ2 is mutated in an inherited epilepsy of newborns*. Nat Genet 1998;18:25-9.
- ⁴⁴ Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, et al. *BFNC Physician Consortium: KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum*. Brain 2003;126:2726-37.
- ⁴⁵ Smith JS, Iannotti CA, Dargis P, Christian EP, Aiyar J. *Differential expression of KCNQ2 splice-variants: implications to M current function during neuronal development*. J Neurosci 2001;21:1096-103.
- ⁴⁶ Soldovieri MV, Castaldo P, Iodice L. *Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a KCNQ2 C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions*. JBC 2006;281:418-28.
- ⁴⁷ Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, et al. *Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2*. Circulation 2000;102:1178-85.
- ⁴⁸ Steinlein OK, Stoodt J, Biervert C, Janz D, Sander T. *The voltage gated potassium channel KCNQ2 and idiopathic generalized epilepsy*. NeuroReport 1999;10:1163-6.
- ⁴⁹ Steinlein OK. *Idiopathic Epilepsies with a monogenic mode of inheritance*. Epilepsia 1999;40:9-11.
- ⁵⁰ Szelenyi I, Nickel B, Borbe HO, Brune K. *Mode of antinociceptive action of flupirtine in the rat*. Br J Pharmacol 1989;97:835-42.
- ⁵¹ Tang B, Li H, Xia K. *A novel mutation in KCNQ2 gene causes benign familial neonatal convulsions in a Chinese family*. J Neurol Sci 2004;22:31-4.
- ⁵² Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. *Position cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias*. Nat Genet 1996;12:17-23.
- ⁵³ Watanabe H, Nagata E, Kosokai A. *Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability*. J Neurochem 2000;75:28-33.

-
- ⁵⁴ Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Ramakrishnan P, Neubauer MG, et al. *Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy.* JBC 1998;273:19419-23.
- ⁵⁵ Yus-Najera E, Santana-Castro I, Villarroel A. *The identification and potassium channels. Characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ.* J Biol Chem 2002;277:28545-53.