



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TRATTAMENTI
INNOVATIVI

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof.ssa Elisabetta Teodori

**SEQUENZIAMENTO MASSIVO PARALLELO
APPLICATO ALLO STUDIO DELLE
ENCEFALOPATIE EPILETTICHE AD
ESORDIO PRECOCE**

Settore Scientifico Disciplinare MED/39

Dottorando

Dott. Laura Chiti

Tutore

Prof. Renzo Guerrini

Coordinatore

Prof.ssa Elisabetta Teodori

Anni 2012/2014

INDICE

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Classificazione e forme cliniche di Epilessia	7
1.2 Epilessie idiopatiche con base genetica nota	9
1.2.1 Epilessia generalizzata con crisi febbrili "plus" (GEFS+)	11
1.2.2 Epilessia mioclonica severa dell' infanzia (SMEI) o sindrome di Dravet	13
1.3 Encefalopatie epilettiche	14
1.3.1 <i>ARX</i> (Aristaless related)	18
1.3.2 <i>CDKL5</i> (Cyclin-dependent, kinase-like 5)	19
1.3.3 <i>SLC25A22</i> (solute carrier family 25, mitochondrial carrier, glutamate, member 22)	20
1.3.4 <i>STXBP1</i> (Syntaxin binding protein 1, noto anche come <i>MUNC18-1</i>)	20
1.3.5 <i>SPTAN1</i> (spectrin, alpha, nonerythrocytic 1)	21
1.3.6 <i>KCNQ2</i> (potassium channel, voltage-gated, subfamily Q, member 2)	21
1.3.7 <i>ARHGEF9</i> (Rho guanine nucleotide exchange factor 9)	22
1.3.8 <i>PCDH19</i> (Protocadherin 19)	22
1.3.9 <i>PNKP</i> (polynucleotide kinase 3-prime phosphatase)	23
1.3.10 <i>SCN2A</i> (sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit)	24
1.3.11 <i>PLCB1</i> (phospholipase C, beta-1)	24
1.3.12 <i>SCN8A</i> (sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha subunit)	24
1.3.13 <i>KCNT1</i> (potassium channel, subfamily T, member 1)	25
1.3.14 <i>CHD2</i> (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 2)	25
1.3.15 <i>SYNGAP1</i> (Synaptic RAS-GTPase-Activating Protein 1)	25
1.3.16 <i>MAGI2</i> (Membrane-Associated Guanylate Kinase Inverted- 2 Gene)	26
1.3.17 <i>ALDH7A1</i> (Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1)	26
1.3.18 <i>PNPO</i> (Pyridoxamine-5'-Phosphate Oxidase)	27
1.3.19 <i>POLG</i> (Polymerase, DNA, gamma)	27
1.4 Epilessie Focali	28
1.4.1 Epilessie benigne del primo anno di vita	28
1.4.2 Epilessia neonatale familiare benigna	28
1.4.3 Epilessia neonatale-infantile familiare benigna	29
1.4.4 Epilessia infantile familiare benigna	29
1.4.5 Epilessia familiare notturna del lobo frontale	30
1.4.6 Epilessia familiare del lobo temporale laterale	31
1.4.7 Epilessia familiare con foci variabili	32
1.5 Crisi Febbrili	32
1.6 Epilessie Generalizzate Idiopatiche Con Modello Di Ereditarietà Complesso	33

1.7 Epilessie Sintomatiche/Criptogenetiche	34
1.8 Epilessie Secondarie Ad Anomalie Dello Sviluppo Della Corteccia Cerebrale	35
1.9 Epilessie con disordini metabolici	37
1.10 Approcci terapeutici alle epilessie	38
1.11 Nuove tecnologie applicate alla genetica: Next Generation Sequencing (NGS)	42
1.11.1 Roche 454	44
1.11.2 AB SOLiD	46
1.11.3 Illumina Ga/ HiSeq System	48
1.11.4 Sequenziatori di terza generazione	50
2. SCOPO DELLA RICERCA	53
3. MATERIALI E METODI	54
3.1 Selezione dei pazienti	54
3.2 Estrazione del DNA da sangue	54
3.3 Determinazione della concentrazione del DNA	54
3.3 Analisi molecolare mediante sistema Roche/454	56
3.3.1 Selezione geni target	56
3.3.2 Preparazione delle libraries	60
3.3.3 Ibridazione delle libraries	62
3.3.4 emPCR: amplificazione clonale in emulsione	63
3.3.5 Sequenziamento con GS FLX Titanium 454 Roche	64
3.3.6 Analisi dei dati	65
3.4 Analisi delle varianti con potenziale ruolo causativo	71
3.5 Interpretazione dei risultati	74
4. RISULTATI	75
4.1 Pazienti portatori di mutazioni identificate con il pannello NGS	79
5. DISCUSSIONE	95
6. CONCLUSIONE	100
7. REFERENZE	101

RIASSUNTO

L'encefalopatia epilettica ad esordio precoce (EOEE) è una condizione in cui le crisi, le anomalie epilettiformi elettroencefalografiche o entrambe determinano un progressivo disturbo delle funzioni cerebrali. Le basi molecolari e lo spettro clinico associato alle EOEEs sono in continua espansione. Il lavoro svolto in questo studio consiste quindi nell'identificazione delle alterazioni genetiche causative di epilessia in soggetti che presentano un fenotipo difficilmente correlabile ad uno dei geni per l'epilessia attualmente conosciuti. Per questa tipologia di pazienti i test genetici disponibili, eseguiti mediante metodiche convenzionali (analisi genetica con sequenziamento Sanger), rappresentano un iter diagnostico molto lungo poiché l'estrema eterogeneità genetica si traduce in una frequente sovrapposizione dei fenotipi clinici osservabili nei pazienti, limitando quindi il clinico nella formulazione di un algoritmo diagnostico molecolare specifico. Questo comporta quindi la necessità di analizzare in modo sequenziale più geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi molecolare dell'epilessia. È stato effettuato un sequenziamento massivo parallelo utilizzando la tecnologia *Roche 454 FLX Sequencing platform*, in 157 pazienti con epilessia ad insorgenza precoce. L'utilizzo delle nuove metodiche di Next Generation Sequencing (NGS), applicate nello studio diagnostico di pazienti con forme di epilessia a forte eterogeneità genetica, permette un notevole risparmio sia in termini di costi che di tempo di analisi, offrendo la possibilità di analizzare più geni contemporaneamente.

È stato allestito un pannello con 36 geni, appositamente disegnato in modo da permettere di esaminare le regioni codificanti dei geni associati ad epilessia e in particolare alle EOEEs. Questo studio ha portato all'identificazione di 31 mutazioni (31/157 pazienti, 19.7%). Di queste, il 67.7% (21/31) sono state riscontrate in geni con un'associazione nota con le EOEEs. Il 9.7% (3/31) delle varianti invece sono state identificate in geni che sono associati con le EOEEs, ma che non sono analizzati di routine con i metodi standard per il basso tasso di mutazione oppure per la complessità dell'analisi. Cinque varianti (16.2%) sono state individuate in geni noti per essere associati a fenotipi diversi da quelli presentati dai nostri pazienti, in 4 dei quali tali alterazioni sono risultate ereditate da genitori sani; dunque il loro significato patogenetico rimane

ancora da definire. Due pazienti (2/31, 6.4%) sono risultati portatori di varianti in geni catturati per omologia a porzioni di geni inclusi nel pannello.

I risultati del nostro studio confermano i vantaggi della metodica NGS rispetto al convenzionale sequenziamento Sanger, il "gold standard" per qualità delle sequenze ottenute, ma con una serie di limitazioni relative ai tempi e ai costi di processazione. L'analisi mediante NGS si è, infatti, rivelata un rapido ed economico metodo di screening per definire le basi genetiche delle EOEEs.

1. INTRODUZIONE

L'epilessia è la più comune malattia neurologica dopo la cefalea, con una prevalenza di 5-10/1000 persone ed un'incidenza di 50-120/100.000 persone per anno. Secondo la definizione teorica formulata nel 2005 dall'International League Against Epilepsy (ILAE), l'epilessia è un disturbo cerebrale caratterizzato da una predisposizione a sviluppare crisi epilettiche e dalle conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali di questa condizione. La definizione di epilessia richiede il verificarsi di almeno una crisi epilettica. Una crisi epilettica consiste nell'occorrenza transitoria di segni e/o sintomi dovuti a una attività neuronale anomala, eccessiva o sincronizzata, originante nella maggior parte dei casi nella corteccia cerebrale, nelle strutture ipocampali o nel tronco cerebrale. Le crisi si presentano con fenomeni eterogenei: con o senza perdita di coscienza, con "convulsioni" generalizzate o movimenti involontari limitati a parti del corpo, con episodi di confusione mentale e comportamenti inadeguati o con disturbi avvertiti esclusivamente dal paziente (manifestazioni "psichiche" della crisi epilettica). Per la diagnosi di epilessia è necessaria un'accurata valutazione dei sintomi e della storia clinica, che deve possibilmente comprendere anche le osservazioni dettagliate da parte di terzi, in quanto l'alterazione o la perdita di coscienza spesso precludono una descrizione dei sintomi da parte del paziente stesso. L'elettroencefalogramma (EEG) rileva l'attività elettrica del cervello ed è un'analisi fondamentale nella diagnosi dell'epilessia, perché le alterazioni elettriche, spesso molto indicative, possono essere presenti anche in assenza dei sintomi. Al di fuori delle crisi epilettiche, però, le alterazioni elettriche possono mancare, pertanto un EEG normale registrato al di fuori di una crisi non esclude la diagnosi di epilessia. Altri esami diagnostici includono la risonanza magnetica o TAC cerebrale ed esami di laboratorio, e sono indicati per accertare o escludere cause specifiche. Le crisi epilettiche sono favorite da fattori che aumentano l'eccitabilità delle cellule nervose e ne abbassano la soglia di scarica spontanea, come l'uso o la sospensione improvvisa di certi farmaci, febbre, privazione di sonno, alterazioni degli elettroliti, fattori genetici e metabolici (1). Nel caso si verifichino come conseguenza di una pura disfunzione di popolazioni neuronali, in assenza di ogni alterazione

morfologica, si definiscono epilessie idiopatiche e nella maggior parte dei casi sono dovute a fattori genetici e metabolici per lo più ancora sconosciuti. Le epilessie idiopatiche si manifestano prevalentemente durante l'infanzia (2).

La ricerca delle cause genetiche delle epilessie è un'area di grande interesse sia per la diagnostica clinica sia per comprenderne le basi molecolari, in quanto la loro comprensione è di fondamentale importanza nell'individuare potenziali nuovi approcci terapeutici. Durante la metà del XX secolo, in seguito al lavoro di Lennox con l'identificazione di geni specifici con eredità mendeliana legati all'epilessia, è stato dimostrato che l'eterogeneità dell'eziologia delle epilessie è dovuta ad un forte contributo genetico. Negli ultimi venti anni sono state identificate numerose epilessie geneticamente determinate grazie all'eccezionale progresso della ricerca genetica, oltre che allo sviluppo di nuove strategie interdisciplinari che combinano la biologia molecolare con le tecniche neurofisiologiche. Gli studi genetici hanno quindi permesso negli anni una comprensione sempre più fine dei meccanismi molecolari alla base dell'epilessia, aiutando il clinico nell'individuare nuove forme sindromiche e nel delinearne con maggior rigore una classificazione delle varie forme. Grazie agli studi su modelli genetici animali e di genetica molecolare è stato compreso che molti geni associati a epilessia sono implicati nel controllo dell'eccitabilità neuronale, che dipende dai flussi di correnti ioniche attraverso i canali della membrana cellulare (3). Inoltre, in seguito alla definizione della struttura molecolare dei canali e dei geni che codificano le proteine che li costituiscono, oggi siamo in grado di conoscere le conseguenze delle modificazioni strutturali dei canali sulla loro funzione di controllo dei flussi ionici, regolata da variazioni del potenziale elettrico della membrana (canali voltaggio-dipendenti) o dall'effetto dei neurotrasmettitori (canali associati ai recettori) (4). Questi studi hanno aperto nuove prospettive di trattamento, per cui è possibile affermare che la capacità di identificare i geni implicati in diverse forme sindromiche, permette al clinico di utilizzare la genetica molecolare come strumento diagnostico. Conoscere la base genetica dell'epilessia di un paziente può essere utile non solo per la diagnosi, ma anche per indirizzare il trattamento farmacologico e per stimare il rischio di ricorrenza in successive gravidanze. In particolare sono oggi disponibili test genetici per l'epilessia mioclonica severa dell'infanzia, per le crisi neonatali familiari benigne dell'infanzia, per l'epilessia autosomica dominante notturna del lobo frontale,

per l'epilessia familiare del lobo temporale con sintomi uditivi e per l'epilessia familiare con crisi febbrili di tipo "plus". Inoltre, è possibile una diagnosi molecolare di numerose epilessie miocloniche progressive legate a malattie neurodegenerative o mitocondriali.

1.1 Classificazione e forme cliniche di Epilessia

Nell'ambito dell'epilessia si distinguono forme cliniche diverse per eziologia, presentazione clinica e prognosi (5) (6) (7). In base alla sintomatologia clinica e al tracciato EEG si osservano:

- epilessie generalizzate: le crisi epilettiche si originano simultaneamente dai due emisferi cerebrali;
- epilessie parziali o focali: le crisi epilettiche si originano in una determinata parte del cervello;
- manifestazioni secondariamente generalizzate: quando le scariche epilettiche iniziano localmente per poi diffondersi a tutto il cervello.

Molte delle cosiddette crisi generalizzate (per lo più di tipo convulsivo) sono in realtà crisi parziali generate da una scarica locale, che si diffonde in maniera così rapida da non permettere l'identificazione di fenomeni parziali iniziali.

Tra le crisi generalizzate si possono osservare:

- assenze: caratterizzate da una perdita del contatto di breve durata (10-30 secondi);
- crisi generalizzate tonico-cloniche: iniziano spesso con un grido, continuano con perdita di coscienza e caduta a terra, con contrazioni toniche e poi cloniche dei muscoli degli arti e del tronco. Si può avere incontinenza. Le crisi durano di solito da 1 a 2 minuti e sono seguite da sopore o da sonno post-critico. Le crisi tonico-cloniche secondariamente generalizzate iniziano con una crisi semplice parziale;
- crisi cloniche: prevalentemente osservate nei bambini, sono caratterizzate da scosse ritmiche ripetitive degli arti che si protraggono per minuti e si accompagnano a perdita di coscienza. Possono

coinvolgere tutta la muscolatura o prevalere da un lato del corpo. Sono quasi sempre seguite da depressione post-critica della coscienza. Molte convulsioni febbrili e le crisi associate a numerose sindromi epilettiche del bambino hanno carattere clonico;

- crisi atoniche: brevi crisi generalizzate dei bambini, caratterizzate da perdita completa del tono muscolare e dello stato di coscienza: il bambino cade al suolo improvvisamente, rischiando traumatismi anche gravi, in particolare traumi cranici;
- crisi miocloniche: brevi sussulti fulminei di un arto, di più arti o del tronco. Possono determinare una oscillazione o una caduta seguita da recupero rapido. Possono essere ripetitive ed evolvere in una crisi tonico-clonica.

Si definisce, inoltre, sindrome epilettica la condizione clinica contraddistinta da un insieme di crisi di tipologia diversa, un'età di insorgenza caratteristica e un tracciato EEG specifico (8). Si possono distinguere due tipologie di sindromi epilettiche:

- a. Sindromi di epilessia parziale (o focale): sono caratterizzate da crisi epilettiche che hanno origine da una precisa regione dell'encefalo (corteccia o regione ippocampale). Ad esempio, nell'epilessia del lobo frontale le crisi sono generate dal lobo frontale, e si associano sia ad attacchi ipercinetici che a crisi tonico-posturali asimmetriche. Altro esempio tipico sono le epilessie del lobo temporale mesiale, che originano dalla regione ippocampale e sono caratterizzate tipicamente da una sensazione soggettiva iniziale epigastrica, seguita spesso da perdita del contatto (se la crisi diffonde ad altre aree, sottraendole alla loro funzione fisiologica e limitando la capacità dell'encefalo a relazionarsi con l'ambiente e memorizzare) e spesso da automatismi della sfera oro-alimentare (masticazione, deglutizione).
- b. Sindromi di epilessia generalizzata: sono caratterizzate da un tracciato EEG con punte-onde generalizzate. I pazienti affetti presentano crisi di assenza, crisi miocloniche e crisi tonico-cloniche generalizzate, come manifestazioni isolate o fra loro associate. Esempi di sindromi di

epilessia generalizzata sono l'epilessia con assenze dell'infanzia ("piccolo male", insorgenza di sole assenze dai 4 agli 8 anni e successiva remissione), l'epilessia mioclonica giovanile (insorgenza nell'adolescenza di crisi miocloniche e crisi generalizzate tonico-cloniche e talvolta di brevi assenze) e l'epilessia generalizzata con crisi febbrili "plus".

1.2 Epilessie idiopatiche con base genetica nota

Come precedentemente accennato, le epilessie idiopatiche rappresentano le forme dove sono presenti alterazione di una popolazione neuronale, senza nessun'altra alterazione morfologica. Il profilo clinico è caratterizzato da un'insorgenza in età infantile o adolescenziale, assenza di danno neurologico e normale sviluppo neurologico e cognitivo (9). La diagnosi di questa classe di patologie è incentrata sullo studio delle anomalie nel pattern EEG in stato di veglia e di sonno. Le epilessie idiopatiche comprendono il 30% di tutte le epilessie, ed è ormai noto che sono determinate da un difetto genetico, come nelle epilessie monogeniche a trasmissione mendeliana (10). Il grado di complessità resta tuttavia decisamente elevato in quanto altri modificatori genetici, come polimorfismi o geni modulatori, insieme ai fattori ambientali, possono essere decisivi nell'influenzare la variabilità fenotipica di alcune famiglie (11). Le alterazioni genetiche finora individuate sono responsabili di forme rare a trasmissione prevalentemente dominante, che si esprimono con convulsioni ripetute in epoca neonatale o infantile precoce, con convulsioni febbrili o con crisi parziali che spesso persistono in età adulta. Queste forme riguardano solo un numero limitato di pazienti, ma sono di enorme interesse in quanto causate, nella maggior parte dei casi, da alterazioni in geni che codificano subunità di canali ionici voltaggio-dipendenti o subunità recettoriali. Le mutazioni identificate interessano i recettori nicotinici in forme familiari di epilessia frontale, i canali K^+ nelle crisi familiari neonatali benigne, i canali Na^+ in una forma particolare di epilessia generalizzata con crisi febbrili, e il recettore GABA in una sua variante e in una sotto forma di epilessia mioclonica giovanile (12). Per le forme più comuni di epilessia idiopatica non si è ancora giunti alla definizione delle basi molecolari ed è possibile che mutazioni diverse possano determinare fenotipi simili in differenti famiglie o aree geografiche (Tabella 1).

Tabella 1: Geni associati a sindromi epilettiche.

Sindrome epilettica	Tipologia delle crisi epilettiche	Gene	Proteina	Regione Cromosomica	Numero OMIM
Epilessia generalizzata con crisi febbrili plus (GEFS)	Con o senza febbre, assenze, miocloniche, tonico-cloniche, generalizzate	<i>SCN1A</i>	Subunità α (tipo 1) del canale Na^+ voltaggio dipendente	2q24.3	*182389
		<i>SCN1B</i>	Subunità β del canale Na^+ voltaggio dipendente	19q13.1	*600235
		<i>GABRG2</i>	Subunità $\gamma 2$ del recettore GABA_A	5q31.1-q33.1	*137164
Epilessia mioclonica severa dell'infanzia (SMEI) o di Dravet	Febbrile, parziali, assenze, miocloniche, tonico-cloniche generalizzate	<i>SCN1A</i>	Subunità α (tipo 1) del canale Na^+ voltaggio dipendente	2q24.3	*182389
Convulsioni familiari benigne neonatali (BFNS)	Convulsioni neonatali multifocali o generalizzate	<i>KCNQ2</i>	Canale K^+ voltaggio dipendente, sottotipo KQT-like, membro 2	20q13.3	*602235
		<i>KCNQ3</i>	Canale K^+ voltaggio dipendente, sottotipo KQT-like, membro 3	8q24	*602232
Convulsioni neonatali infantili familiari benigne (BFNIS)	Convulsioni multifocali o generalizzate	<i>SCN2A</i>	Subunità α (tipo 2) del canale Na^+ voltaggio dipendente	2q23-q24.3	*182390
Convulsioni infantili familiari benigne (BFIS) con emicrania emiplegica	Convulsioni multifocali o generalizzate, emicrania emiplegica	<i>ATP1A2</i>	ATPase, Trasportatore Na^+/K^+	1q21-q23	*182340
Epilessia familiare notturna del lobo frontale (ADNFLE)	Crisi parziali motorie complesse durante il sonno	<i>CHRNA4</i>	Recettore nicotino per l'acetilcolina, polipeptide- $\alpha 4$	20q13.2-q13.3	*118504
		<i>CHRNA2</i>	Recettore nicotino per l'acetilcolina, polipeptide- $\beta 2$	1q21	*118507

		<i>CHRNA2</i>	Recettore nicotinico per l'acetilcolina, polipeptide- α -2	8p21	*118502
Epilessia familiare del lobo temporale laterale (ADTLE)	Crisi parziali accompagnate da allucinazioni uditive e visive	<i>LGI1</i>	Leucine-rich, glioma inactivated 1	10q24	*604619
Epilessia con assenze dell'infanzia (CAE)	Assenze, tonico-cloniche	<i>GABRG2</i>	Subunità γ 2 del recettore GABA _A	5q31.1-q33.1	*137164
		<i>CLCN2</i>	Canale 2 del Cl ⁻	3q26	*600570
Epilessia mioclonica giovanile (JME)	Miocloniche, tonico-cloniche	<i>GABRA1</i>	Subunità α 1 del recettore GABA _A	5q34-q35	*137160
Spasmi Infantili, Sindrome di West	Spasmi infantili, ipsaritmia	<i>ARX</i>	Gene homeobox Aristaless related	Xp21.3	*300382
Encefalopatia epilettica ad insorgenza precoce	Miocloniche, spasmi infantili	<i>CDKL5</i>	Cyclin dependent kinase 5	Xp22.13	*300203
Epilessia con ritardo mentale limitato alle femmine	Febbrili, parziali, assenze, miocloniche, tonico-cloniche generalizzate	<i>PCDH19</i>	Protocaderin a 19	Xq22.1	*300460
Encefalopatia epilettica	toniche, spasmi infantili	vedi tabella 3			

1.2.1 Epilessia generalizzata con crisi febbrili "plus" (GEFS+)

L'epilessia generalizzata con crisi febbrili "plus" (GEFS+) è una sindrome epilettica familiare con crisi epilettiche di varia natura, le più frequenti sono le crisi febbrili ordinarie e le crisi febbrili "plus", così chiamate quando continuano a manifestarsi anche dopo i 6 anni di età, accompagnate o meno da crisi non febbrili (13). In casi più rari sono state riscontrate crisi febbrili con assenze, crisi miocloniche o atoniche, crisi parziali. In alcuni pazienti le crisi non febbrili possono manifestarsi raramente, oppure scomparire dopo alcuni anni di evoluzione della malattia, mentre in altri soggetti della stessa famiglia l'epilessia è grave e resistente al trattamento farmacologico. La GEFS+ si trasmette con modalità autosomica dominante e penetranza incompleta (70-

80%) ed è geneticamente eterogenea, infatti si riscontra una elevata variabilità fenotipica, sottolineata dalla varia natura delle crisi, dal differente decorso della malattia tra gli individui, e dalla risposta eterogenea ai farmaci, anche all'interno della stessa famiglia (14). Le mutazioni associate a GEFS+ riguardano i geni (*SCN1A* e *SCN1B*) che codificano le subunità α e β del canale voltaggio-dipendente del Na^+ (15) (16). Grazie a recenti studi su modelli di topi transgenici per *SCN1A*, è stato compreso che le epilessie dovute ad alterazioni del gene *SCN1A*, dipendono anche da una diminuzione dell'eccitabilità degli interneuroni GABAergici (17) (18). Da molto tempo si sospettava un coinvolgimento dei recettori GABA nelle epilessie, ma solo ultimamente sono state trovate in alcune famiglie con GEFS+ mutazioni nel gene *GABRG2* (subunità 2 γ del recettore GABA_A) (19) (20). La riduzione del principale meccanismo di inibizione neuronale nel cervello, causata da mutazioni in *GABRG2*, può spiegare la ricorrenza delle crisi nei pazienti con queste mutazioni. Le alterazioni molecolari più frequenti ritrovate nei pazienti affetti da GEFS+ sono mutazioni missenso del gene *SCN1A*, la variabilità riscontrata nelle varie famiglie potrebbe essere spiegata dall'azione combinata di più geni mutati. I canali neuronali del sodio (Na^+) consistono di due subunità: una subunità α e una subunità β . Studi funzionali *in vitro* hanno dimostrato che mutazioni nel gene che codifica la subunità $\beta 1$ del canale Na^+ inducono una corrente Na^+ persistente che determina ipereccitabilità dei neuroni (vedi figura 1). Le mutazioni nel gene *SCN1A*, anche se localizzate in diversi domini funzionali della proteina canale, determinano tutte una depolarizzazione persistente della corrente Na^+ con conseguente ipereccitabilità neuronale (21) (22).

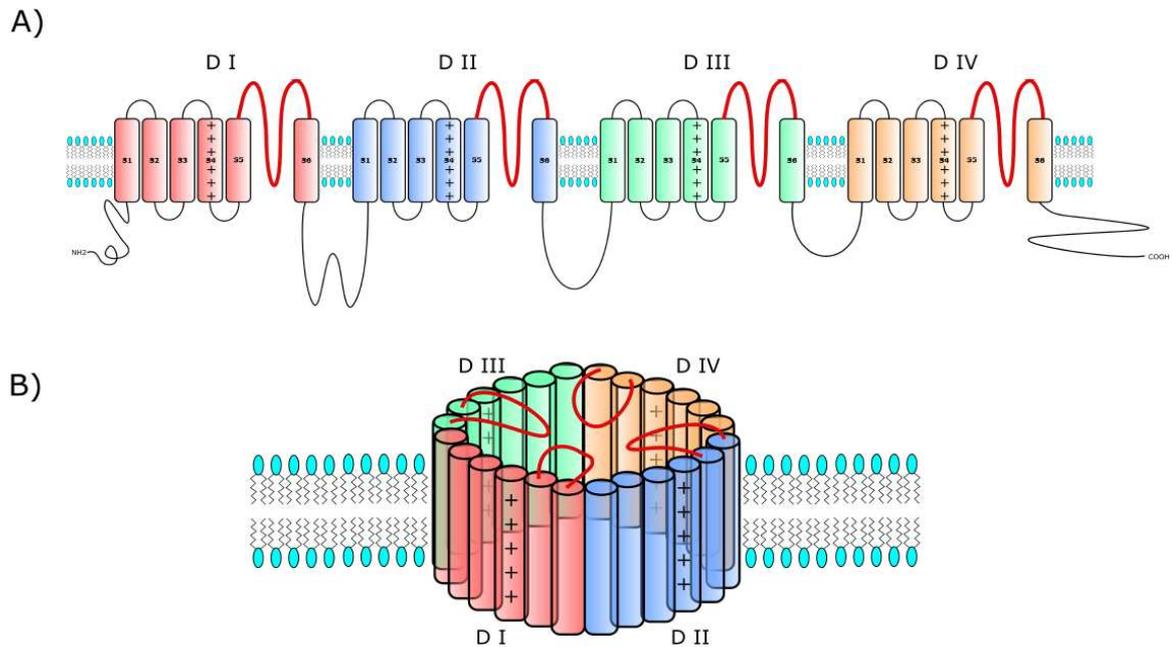


Figura 1: (A) Schema della struttura linearizzata della subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente. La subunità α è costituita da quattro domini ripetuti (D I - D IV); ciascuno di questi domini è a sua volta costituito da 6 segmenti transmembrana a α elica (S1-S6). Il segmento S4 corrisponde al sensore del voltaggio mentre i segmenti S5 e S6 sono responsabili della formazione del poro che rappresenta il filtro di selettività agli ioni. Le subunità β , qui non rappresentate, modulano la cinetica e la voltaggio-dipendenza del canale. (B) Struttura del canale del sodio nella sua configurazione tridimensionale. I segmenti rossi evidenziano le strutture deputate alla formazione del poro.

1.2.2 Epilessia mioclonica severa dell'infanzia (SMEI) o sindrome di Dravet

La sindrome di Dravet compare in neonati precedentemente sani a partire dal sesto mese di vita, generalmente con crisi unilaterali, generalizzate e crisi febbrili. Tra il primo e il quarto anno di vita, si possono verificare altri tipi di crisi: crisi miocloniche, crisi parziali complesse, assenze atipiche. L'ipertermia, come la febbre o un bagno caldo, spesso innescano la crisi (23). Lo sviluppo risulta normale fino al primo anno di vita, dopo si osserva un rallentamento dello sviluppo con progressivo ritardo psicomotorio e comparsa di disturbi del comportamento (24). Il pattern EEG può risultare normale fino ai primi 2 anni di vita, quando generalmente cominciano a notarsi delle anomalie nei tracciati. Inoltre il 10% dei pazienti è fotosensibile, infatti la luce intermittente può essere una causa dell'innescarsi della crisi. Un'altra caratteristica di questa sindrome è la ricorrenza di crisi convulsive, per lo più cloniche, spesso

prolungate in corso di rialzo febbrile, durante l'infanzia. Nel 25% di pazienti si riscontra una storia familiare di epilessia o di convulsioni febbrili. In due terzi dei casi la SMEI è legata a mutazioni del gene *SCN1A*, nel 90% dei casi si tratta di una mutazione *de novo*, nel 50% di mutazioni troncanti, nei restanti casi di mutazione missenso o di splicing (25) (26). Circa il 2-3% dei casi di SMEI è dovuto a delezioni/duplicazioni che coinvolgono il gene *SCN1A*, che possono essere identificate mediante MLPA (Multi-plex Ligation-dependent Probe Amplification) o array-CGH, specifici per la regione del cromosoma 2 in cui è localizzato il gene. In alcuni pazienti con SMEI sono state identificate mutazioni nel gene *GABRG2* (27). Data l'elevata variabilità fenotipica tipica delle forme GEFS+ è difficile stabilire il rischio di ricorrenza anche per i casi in cui è stata identificata una mutazione di *SCN1A*, *SCN1B* o *GABRG2*. Il rischio di ricorrenza familiare è quindi molto basso, anche se leggermente superiore a quello di popolazione, in quanto resta possibile l'occorrenza di mosaicismo germinale per mutazioni di *SCN1A*, in un genitore (28) (29). Sembra identificabile una certa correlazione genotipo-fenotipo: mutazioni troncanti, nonsense, frameshift e delezioni sono correlate con la Sindrome di Dravet "classica" con una precoce età d'esordio delle crisi (30). Inoltre, la gravità del fenotipo sembra anche dipendere dalla localizzazione delle mutazioni all'interno del gene: quelle che cadono nella regione formante il poro del canale del sodio causano la sindrome di Dravet; mentre mutazioni fuori dalla regione del poro sono associate in genere al fenotipo GEFS+ (31). Dello spettro fenotipico legato a mutazioni del gene *SCN1A* fanno parte inoltre l'emicrania emiplegica, l'epilessia con crisi parziali maligne dell'infanzia (MMPSI) e una severa forma di encefalopatia epilettica con crisi ad esordio tra il primo giorno e i 6 mesi di vita (EOEE tipo 6). Quest'ultima grave patologia è caratterizzata da crisi farmacoresistenti, a cui seguono regressione dello sviluppo psicomotorio, microcefalia progressiva e, frequentemente, morte precoce (32).

1.3 Encefalopatie epilettiche

L'encefalopatia epilettica è una condizione in cui le crisi, le anomalie epilettiformi elettroencefalografiche o entrambe determinano un progressivo disturbo delle funzioni cerebrali (33). Circa il 40% di tutte le epilessie che si

manifestano nei primi tre anni di vita corrispondono a questa definizione (34). Nella classificazione ILAE sono state descritte otto diverse encefalopatie epilettiche associate all'età in cui insorgono, che differiscono l'una dall'altra in termini di eziologia, deficit neuropsicologici, pattern EEG, tipi di crisi e prognosi. Queste sindromi includono l'encefalopatia mioclonica precoce, la sindrome di Ohtahara nel periodo neonatale, la sindrome di West, la sindrome di Dravet nell'infanzia, lo status mioclonico nell'encefalopatia non progressiva (MSNE), la Sindrome di Lennox-Gastaut, la Sindrome di Landau-Kleffner e l'epilessia con scariche punta-onda continue durante il sonno ad onde lente (CSWS) (35). I pazienti presentano epilessia grave spesso a insorgenza precoce e sotto forma di spasmi infantili, ritardo dello sviluppo neurologico e cognitivo e disturbi del comportamento. Alcune sindromi, come la Sindrome di West, la Sindrome di Dravet, l'epilessia con punte-onde continue durante il sonno e la Sindrome di Lennox-Gastaut si manifestano sempre come encefalopatie epilettiche, indipendentemente dall'eziologia e dalla gravità delle anomalie elettroencefalografiche. Altre sindromi con un decorso generalmente favorevole, come l'epilessia rolandica benigna, possono avere una fase complicata da importanti anomalie EEG, deficit cognitivo, disturbi dell'apprendimento e del linguaggio. Anche l'epilessia mioclono-astatica può evolvere imprevedibilmente verso un'encefalopatia epilettica o andare rapidamente in remissione senza conseguenze sull'outcome cognitivo, indipendentemente dalle sue caratteristiche cliniche ed EEG iniziali (36). In questi casi non è del tutto chiaro quali siano i fattori responsabili di un certo outcome.

I fattori eziologici responsabili delle encefalopatie epilettiche ad esordio precoce, infantile o infantile tardivo sono numerosi ed eterogenei (Tabella 2, adattata da Guerrini & Pellock, 2012)

Tabella 2: Eziologie delle encefalopatie epilettiche

Categorie eziologiche	Eziologia specifica
Malformazioni dello sviluppo corticale	displasia corticale focale
	sclerosi tuberosa
	lissencefalia
	eterotopia a bande sottocorticale
	polimicrogirie
	emimegalencefalia
	disordini neurocutanei
	Sindrome di Aicardi
	schizencefalia
	oloprosencefalia
Danno pre, peri o post natale	Ipossico-ischemico
	emorragico
	infezioni fetali
	infezioni postnatali (encefaliti e meningiti)
	traumi
Anomalie cromosomiche	del 1p36
	4p- (Sindrome Wolf-Hirshhorn)
	del 7q11.23-q21.1
	Sindrome di Pallister-Killian
	ring 14
	invdup 15
	duplicazione 15q11.2-q13.1
	Sindrome di Angelman
	Sindrome di Miller-Dieker
	Sindrome di Down
Errori congeniti del metabolismo	malattia di Menkes
	fenilchetonuria
	malattie mitocondriali (NARP)
	deficit complesso I
	ipoglicemia
	Sindrome di PHEO
	iperglicinemia non chetotica
	altri disordini degli acidi organici
	dipendenza dalla piridossina
	dipendenza dalla biotinidasi
disordini congeniti della glicosilazione	
Malformazioni vascolari	Sturge-Weber
Tumori cerebrali	Tutti i tumori cerebrali
Monogeniche: non malformative- non metaboliche	EOEE 1-26 (vedi tabella 3)
Cause non identificate	Circa il 40% ha storia familiare positiva per epilessia

Alcune gravi forme di epilessia hanno una base monogenica. I pazienti presentano epilessia grave spesso a insorgenza precoce e sotto forma di spasmi infantili, ritardo dello sviluppo neurologico e cognitivo e disturbi del

comportamento. Finora nel database OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.omim.org/>) sono descritti 26 tipi di encefalopatie epilettiche ad insorgenza precoce (EOEE) in cui è stato identificato il ruolo patogenetico di mutazioni in geni coinvolti nella sinaptogenesi, nella migrazione neuronale e nella differenziazione, nella sintesi e nel rilascio dei neurotrasmettitori, nella struttura e nella funzione dei recettori di membrana e dei trasportatori. Si può osservare dalla letteratura che le basi molecolari e lo spettro clinico associato alle encefalopatie epilettiche sono in continua espansione (tabella 3).

Tabella 3 Elenco OMIM delle EOEE

EOEE	Gene	Locus	Epilessia / Sindrome	Anno
1	<i>ARX</i>	Xp21.3	Sindrome degli spasmi Sindrome di Ohtahara, X-Linked	1986
2	<i>CDKL5</i>	Xp22.13	EOEE con spasmi, crisi focali, secondariamente generalizzate e miocloniche	2007
3	<i>SLC25A22</i>	11p15.5	Epilessia neonatale con suppression-burst Epilessia mioclonica ad esordio precoce	2005
4	<i>STXBP1</i>	9q34.11	Sindrome degli spasmi infantili Sindrome di Ohtahara	2008
5	<i>SPTAN1</i>	9q34.11	Crisi intrattabili con ipsaritmia Crisi con febbre e ritardo mentale severo	2010
6	<i>SCN1A</i>	2q24.3	Sindrome di Dravet	2002
7	<i>KCNQ2</i>	20q13.33	Crisi focali refrattarie ad esordio precoce	2011
8	<i>ARHGEF9</i>	Xq11.1-q11.2	EOEE ed iperreflessia	2006
9	<i>PCDH19</i>	Xq22.1	Epilessia e ritardo mentale limitato alle femmine (EFMR)	1997
10	<i>PNKP</i>	19q13.33	Crisi ad esordio precoce, microcefalia primaria	2011
11	<i>SCN2A</i>	2q24.3	EOEE con fenotipo variabile	2013
12	<i>PLCB1</i>	20p12	EOEE autosomica recessiva	2011
13	<i>SCN8A</i>	12q13.13	EOEE con pattern EEG caratterizzato da punte multifocali	2012
14	<i>KCNT1</i>	9q34.3	EOEE con crisi parziali migranti dell'infanzia (MMPSI)	2012
15	<i>ST3GAL3</i>	ST3GAL3	EOEE autosomica recessiva con ipsaritmia	2013
16	<i>TBC1D24</i>	16p13.3	EOEE autosomica recessiva (epilessia mioclonica progressiva con distonia)	2013
17	<i>GNAO1</i>	16q12.2	EOEE con suppression-burst	2013
18	<i>SZT2</i>	1p34.2	EOEE autosomica recessiva con punte-onda anomale	2013

19	<i>GABRA1</i>	5q34	Sindrome "Dravet-like"	2014
20	<i>PIGA</i>	Xp22.2	EOEE variabilmente associata ad anomalie congenite multiple e ipotonia (Sindrome MCAHS2)	2014
21	<i>NECAP1</i>	12p13.31	EOEE autosomica recessiva	2014
22	<i>SLC35A2</i>	Xp11.23	EOEE con crisi farmacoresistenti ed ipsaritmia	2014
23	<i>DOCK7</i>	1p31.3	EOEE autosomica recessiva	2014
24	<i>HCN1</i>	5p12	EOEE con crisi febbrili intrattabili	2014
25	<i>SLC13A5</i>	17p13.1	EOEE autosomica recessiva	2014
26	<i>KCNB1</i>	20q13.13	EOEE con ipsaritmia	2014

Di seguito, sono riportati alcuni esempi di geni per i quali negli ultimi anni sono state identificate mutazioni in pazienti con un quadro clinico di EOEE grave.

1.3.1 ARX (Aristaless related)

Il gene *ARX*, localizzato sul cromosoma X e composto da 5 esoni (37), codifica per un fattore di trascrizione che appartiene ad una famiglia di proteine che giocano un ruolo importante nell'embriogenesi, specialmente nello sviluppo del sistema nervoso centrale (38). La proteina ARX contiene vari domini funzionali altamente conservati:

- un omeodominio che presenta un residuo di glutamina in posizione 50 responsabile della specificità di interazione dell'omeodominio con il DNA;
- un dominio aristaless (peptide C), che svolge il ruolo di dominio di attivazione;
- un octapeptide con funzione di repressore trascrizionale;
- quattro tratti di polialanina, la cui funzione non è stata ancora chiarita.

Nel topo il gene *ARX* è espresso, a partire da stadi precoci di sviluppo, nel talamo ventrale, nel telencefalo dorsale e nelle eminenze gangliari laterale emediale, che daranno origine a neuroni che migrano tangenzialmente nella corteccia cerebrale e si differenziano in interneuroni GABAergici. Nel cervello adulto l'espressione di *ARX* persiste a livello di una sotto popolazione di interneuroni GABAergici corticali. Questo suggerisce che *ARX* sia coinvolto nel

differenziamento di specifici tipi neuronali e che possa avere un ruolo nella generazione e nel mantenimento di reti neuronali funzionali. Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che mutazioni a carico del gene *ARX* sono responsabili dell'insorgenza di gravi patologie, che presentano fenotipi apparentemente non correlati. Si possono distinguere sindromi caratterizzate dalla presenza di malformazioni, come la XLAG (Lissencefalia X-linked con anomalie dei genitali) o la sindrome di Proud (ritardo mentale, agenesia del corpo calloso e genitali ambigui), dovute a mutazioni missenso nell'omodominio di *ARX* o mutazioni nonsense, oppure sindromi che non presentano malformazioni, causate da mutazioni missenso al di fuori dell'omodominio o da espansioni delle triplette ripetute codificanti i due tratti di polialanina, come la sindrome di Partington o la sindrome di West (39) (40). La sindrome di West si manifesta nei bambini al di sotto di un anno di età, è caratterizzata da spasmi in estensione o in flessione, da ipsaritmia (grave perturbazione dell'elettrogenesi cerebrale) e conseguente arresto o ritardo dello sviluppo psicomotorio (41) (42). Circa il 6% dei maschi con spasmi isolati o X-linked e nessuna lesione cerebrale presenta una mutazione di *ARX* (43). I maschi portatori della mutazione *ARX* sono gravemente colpiti; le femmine portatrici possono essere non affette o presentare un fenotipo più lieve (40) (44).

1.3.2 *CDKL5* (Cyclin-dependent, kinase-like 5)

Il gene *CDKL5* (chinasi ciclina dipendente 5), localizzato sul cromosoma X, costituito da 20 esoni (45), codifica per una proteina (STK9) con attività di protein chinasi, oltre che di autofosforilazione (46). Mutazioni di questo gene causano epilessia gravissima a insorgenza precoce (dai primi giorni ai 4 mesi di vita), con crisi farmacoresistenti, microcefalia acquisita e grave ritardo dello sviluppo con regressione evidente dopo l'insorgenza delle crisi. Sono spesso presenti crisi multifocali e spasmi infantili, o crisi toniche seguite da spasmi e mioclono, con un pattern elettroclinico peculiare in alcuni casi associato a crisi focali migranti (47). Mutazioni di questo gene sono riscontrate fino al 28% delle femmine con crisi ad esordio precoce e epilessia intrattabile, mentre nei maschi è spesso letale (48). Tuttavia sono descritti maschi con quadri clinici

simili alle bambine (49), riportando casi di mosaicismo germinale parentale (50).

1.3.3 *SLC25A22* (solute carrier family 25, mitochondrial carrier, glutamate, member 22)

Il gene *SLC25A22* (solute carrier family 25, mitochondrial carrier, glutamate, member 22) è localizzato sul cromosoma 11 ed è costituito da 9 esoni (51). Codifica per un cotrasportatore mitocondriale glutammato/H⁺. Mutazioni del gene determinano un quadro caratterizzato da esordio nel primo mese di vita di crisi farmaco-resistenti migratorie, cioè che investono settori limitati degli emisferi trasferendosi da una regione all'altra e determinando movimenti clonici che interessano ora un arto ora l'altro anche in differenti lati del corpo, generalmente miocloniche e accompagnate da un quadro EEG di suppression-burst. La prognosi è severa, solitamente con decesso fra il primo e il secondo anno di vita o sopravvivenza in uno stato vegetativo (52).

1.3.4 *STXBP1* (Syntaxin binding protein 1, noto anche come *MUNC18-1*)

Il gene *STXBP1* (syntaxin-binding protein gene 1), localizzato sul cromosoma 9, è costituito da 20 esoni (53) e codifica per una proteina con un ruolo essenziale nel rilascio e nella secrezione del neurotrasmettitore dalle vescicole presinaptiche (54). Questo gene è associato ad un quadro di encefalopatia epilettica grave con caratteristiche compatibili con la sindrome di Otahara, una forma rara, nota da diverso tempo e caratterizzata da esordio molto precoce, nelle prime settimane o nei primi mesi di vita, con frequenti spasmi tonici e un quadro di suppression-burst (55). Fino al 37% dei bambini con tale sindrome presenta mutazioni di *STXBP1* (54). Possono manifestarsi anche crisi parziali motorie (56). L'imaging cerebrale evidenzia, nella maggior parte dei casi, anomalie strutturali. Un quadro sovrapponibile può essere causato da malattie neurometaboliche. Il decorso è decisamente variabile. In letteratura sono riportati casi di morte prematura o marcato ritardo psicomotorio e crisi intrattabili che evolvono spesso nella sindrome di West (55) (56). Si osservano

inoltre casi in cui l'outcome dell'epilessia è relativamente benigno, in cui raramente le crisi continuano dopo il primo anno di vita (57), mentre persiste un grave ritardo di sviluppo ed eventuali disturbi del movimento a tipo atassia, tremore, discinesia (57) (58). Per questa forma di encefalopatia epilettica è stata recentemente descritta un'associazione con un quadro neuroradiologico abbastanza caratteristico di ipoplasia frontale con corpo calloso sottile e dismorfico (59).

1.3.5 *SPTAN1* (spectrin, alpha, nonerythrocytic 1)

Il gene *SPTAN1* (spectrin, alpha, nonerythrocytic 1) è localizzato sul cromosoma 9 (60) ed è costituito da 57 esoni (61). Codifica per la alpha II spectrina, appartenente alla famiglia delle spectrine, proteine citoscheletriche ampiamente distribuite nei tessuti, le cui funzioni includono la regolazione del legame ai recettori e il crosslinking. In letteratura sono descritti tre pazienti con mutazioni di questo gene. Tohyama e i suoi collaboratori hanno descritto 2 pazienti con un quadro di crisi intrattabili, ipsaritmia e grave ritardo (62). Hamdan ha descritto un paziente con un quadro epilettico più lieve, ma associato comunque con ritardo severo (63).

1.3.6 *KCNQ2* (potassium channel, voltage-gated, subfamily Q, member 2)

Il gene *KCNQ2* (potassium channel, voltage-gated, subfamily Q, member 2) è localizzato sul cromosoma 20 ed è costituito da 18 esoni (64). Codifica per un canale del potassio voltaggio-dipendente espresso a livello cerebrale (65). Nella maggior parte dei casi mutazioni di *KCNQ2* si associano a crisi neonatali familiari benigne (66) (67), dove la maggior parte dei pazienti è già libero da crisi all'età di sei mesi e lo sviluppo psicomotorio è solitamente nella norma (68). Tuttavia, studi recenti (69) hanno descritto come mutazioni di questo gene possono anche essere associate ad una epilessia ad esordio precoce (70), nei primi giorni di vita, con crisi toniche, resistenti al trattamento e un pattern EEG iniziale tipo suppression-burst o anomalie multifocali e associata a ritardo dello sviluppo psicomotorio. Tale forma di encefalopatia mostra nella maggior parte dei pazienti un decorso relativamente buono per le crisi, con

scomparsa entro i 3 anni, ma persistenza di gravi disabilità intellettive e motorie.

1.3.7 *ARHGEF9* (Rho guanine nucleotide exchange factor 9)

Il gene *ARHGEF9* (Rho guanine nucleotide exchange factor 9) è localizzato sul cromosoma X (71) ed è costituito da 11 esoni (72). Codifica per la collibistina, un fattore di scambio del nucleotide guanina (GEF) cervello-specifico. Mutazioni del gene determinano lo sviluppo di una encefalopatia epilettica ad esordio precoce (EOEE) associata ad ipereflessia (72) (73). Altre possibili caratteristiche fenotipiche possono essere dismorfismi, macrosomia (74) e disturbi del comportamento, quali aggressività ed ansia (75).

1.3.8 *PCDH19* (Protocadherin 19)

Il gene *PCDH19* (protocadherin 19), localizzato sul cromosoma X (76), costituito da 6 esoni (77), codifica per la protocaderina 19, una proteina transmembrana della famiglia delle caderine, molecole di adesione intercellulare calcio-dipendenti, fortemente espressa nel sistema nervoso centrale dove ha un ruolo nello stabilire connessioni neuronali e nel segnale di trasduzione alle membrane sinaptiche (78). Mutazioni di questo gene negli individui di sesso femminile causano epilessia, spesso associata a ritardo mentale con tratti autistici. Le pazienti presentano caratteristiche cliniche simili a quelle della SMEI, con crisi epilettiche che insorgono intorno al primo anno di vita generalmente in associazione a febbre. Le crisi possono essere focali o, più spesso, di tipo generalizzato (tonico-cloniche, miocloniche, assenze). Lo sviluppo psicomotorio è inizialmente normale, per poi regredire all'insorgenza delle crisi o anche successivamente (79). Le bambine affette in forma più grave possono avere caratteristiche cliniche simili a quelle della sindrome di Dravet, soprattutto per la tendenza delle crisi a comparire in corso di febbre. Tuttavia, le pazienti con sindrome da mutazioni *PCDH19* differiscono rispetto a quelli con sindrome di Dravet "classica" *SCN1A* positivi: l'età d'esordio è più tardiva, la presenza di stato epilettico e crisi miocloniche è meno frequente e l'outcome a lungo termine è più favorevole. Le pazienti con mutazioni di *PCDH19* presentano inoltre un pattern elettroclinico peculiare, con crisi focali

associate prevalentemente a manifestazioni affettive che fanno supporre un coinvolgimento del sistema limbico (78). Gli individui di sesso maschile emizigoti obbligati per mutazioni di *PCDH19* non presentano epilessia e hanno un livello cognitivo nella norma. Sono state proposte due ipotesi per spiegare la discrepanza di manifestazioni cliniche tra femmine eterozigoti per mutazione di *PCDH19* e maschi emizigoti (80). La prima ipotesi sostiene che l'assenza di *PCDH19* nei maschi possa essere compensata dal gene *PCDH11Y* localizzato sul cromosoma Y. Il gene *PCDH11Y* ha un paralogo sul cromosoma X, *PCDH11X*, che presenta elevata omologia di sequenza con il gene *PCDH19*. Secondo questa ipotesi le differenze nel pattern di espressione di *PCDH11Y* e *PCDH11X* potrebbero essere responsabili di una migliore capacità di compensazione della mancanza di *PCDH19* nei maschi rispetto alle femmine. La seconda ipotesi sostiene che il mosaicismo tissutale derivante dall'inattivazione del cromosoma X potrebbe alterare le comunicazioni cellula-cellula, causando la comparsa di manifestazioni cliniche nelle femmine eterozigoti. I soggetti di sesso femminile, infatti, hanno cellule in cui viene espresso l'allele *PCDH19* mutato e cellule in cui viene espresso l'allele *PCDH19* normale. Questo non succede nei maschi, clinicamente sani e emizigoti per mutazione della *PCDH19*, che presentano una popolazione omogenea di cellule mutate (80). Questa ipotesi suggerisce che se un individuo ha due popolazioni cellulari, una con *PCDH19* mutata ed una senza, questa determina la comparsa di un fenotipo patologico; mentre un maschio con *PCDH19* mutato ha una sola popolazione di cellule mutate e non presenta un fenotipo patologico. Lo sviluppo di modelli animali geneticamente modificati permetterà di esplorare meglio questo complesso meccanismo molecolare di malattia.

1.3.9 PNKP (polynucleotide kinase 3-prime phosphatase)

Il gene *PNKP* (polynucleotide kinase 3-prime phosphatase) localizzato sul cromosoma 19 (81) (82) è costituito da 17 esoni (83). Codifica per una proteina con importante funzione nella riparazione del DNA in seguito a radiazioni ionizzanti e danno ossidativo (81). Mutazioni a carico di questo gene determinano lo sviluppo di una EOEE associata a microcefalia (83).

1.3.10 *SCN2A* (sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit)

Il gene *SCN2A* (sodium channel, voltage-gated, type II, alpha subunit) è localizzato sul cromosoma 2 ed è costituito da 26 esoni (84). Codifica per la subunità α II del canale del sodio voltaggio-dipendente. Sono stati descritti 4 pazienti giapponesi con mutazioni di questo gene ed una encefalopatia epilettica con severità variabile (85) (86). Recentemente sono stati riportati altri due casi tra le cui caratteristiche fenotipiche sono comprese atrofia ottica, ipotonia e anomalie cerebrali (87), movimenti coreoatetosici ed ipersonnia (88). Mutazioni di *SCN2A* possono determinare anche crisi familiari benigne intermedie con esordio tra il periodo neonatale ed infantile (89) (90).

1.3.11 *PLCB1* (phospholipase C, beta-1)

Il gene *PLCB1* (phospholipase C, beta-1) è localizzato sul cromosoma 20 (91) ed è costituito da 33 esoni (92). Codifica per la proteina fosfolipasi C β 1, che è presente nel nucleo ed è coinvolta nel controllo del ciclo cellulare (93). Sono stati descritti due pazienti portatori di mutazioni in omozigosi di questo gene: una bambina che ha sviluppato una grave EOEE, con crisi toniche, severa ipotonia assiale, quadriparesi spastica e grave ritardo mentale (94) ed un bambino palestinese che ha sviluppato una EOEE manifestatasi clinicamente con crisi parziali maligne migranti dell'infanzia (MMPSI) (95). Recentemente è stato riportato un caso di EOEE causata da due mutazioni (eterozigosi composta) in *PLCB1* in una paziente con un fenotipo caratterizzato da epilessia a insorgenza precoce, con crisi farmacoresistenti, pattern EEG anomalo e compromissione dello sviluppo neurologico e cognitivo a lungo termine (96).

1.3.12 *SCN8A* (sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha subunit)

Il gene *SCN8A* (sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha subunit), localizzato sul cromosoma 12, costituito da 28 esoni, codifica per la subunità alpha VIII del canale del sodio voltaggio dipendente (97) ed è ampiamente espressa nei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico (98). Le mutazioni a carico di questo gene finora identificate sono tutte missenso ad

insorgenza *de novo*, che causano nella maggior parte dei casi crisi intrattabili ad esordio precoce (anche a distanza di tre giorni dalla nascita), ritardo dello sviluppo nell'infanzia o regressione in seguito alla comparsa delle crisi, risultanti in una grave compromissione dello sviluppo cognitivo (99) (100) (101).

1.3.13 *KCNT1* (potassium channel, subfamily T, member 1)

Il gene *KCNT1* (potassium channel, subfamily T, member 1) è localizzato sul cromosoma 9 (76) e codifica per un canale del K⁺ attivato dal Na⁺, largamente espresso a livello del sistema nervoso (102). Mutazioni eterozigoti *de novo* a carico di questo gene sono state associate a "crisi parziali migranti maligne dell'infanzia" (MMPSI), una rara forma di encefalopatia epilettica dell'infanzia descritta per la prima volta da Coppola nel 1995 (103) e caratterizzata da esordio di crisi motorie focali migranti farmaco-resistenti prima dei 6 mesi di vita, profondo ritardo psicomotorio, quadriplegia con importante ipotonia assiale (104).

1.3.14 *CHD2* (Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 2)

Il gene *CHD2* è localizzato sul cromosoma 15, ed è costituito da 39 esoni di cui 38 codificati. Questo gene è associato a encefalopatia epilettica con insorgenza delle crisi da 1 a 3 anni. I pazienti presentano ritardo da medio a grave e diverse tipologie di crisi epilettiche tra cui crisi miocloniche, tonico-cloniche, assenze ed episodi di stato epilettico (105) (106). Il gene *CHD2* codifica per una proteina coinvolta nel rimodellamento della cromatina e del nucleosoma (100).

1.3.15 *SYNGAP1* (Synaptic RAS-GTPase-Activating Protein 1)

Il gene *SYNGAP1* è localizzato sul cromosoma 6 ed è costituito da 19 esoni. Mutazioni di questo gene causano un quadro di encefalopatia epilettica con insorgenza delle crisi dai 6 mesi ai 3 anni. I pazienti presentano crisi tonico-cloniche, miocloniche o assenze in varie combinazioni. Generalmente si osserva un precoce ritardo dello sviluppo con successiva regressione (107). Il

gene *SYNGAP1* codifica per il recettore AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) coinvolto nella trasmissione sinaptica. L'aploinsufficienza di *SYNGAP1* nel modello murino determina un'accelerazione della maturazione delle sinapsi glutammatergiche nelle prime settimane dello sviluppo dell'ippocampo con conseguenti disturbi dello sviluppo cerebrale, come ritardo mentale, epilessia, schizofrenia e disturbo dello spettro autistico (108).

1.3.16 *MAGI2* (Membrane-Associated Guanylate Kinase Inverted- 2 Gene)

Il gene *MAGI2* è localizzato sul cromosoma 7 ed è costituito da 22 esoni. Questo gene codifica per una proteina scaffold sinaptica che interagisce con differenti recettori pre e post sinaptici. Marshall e i suoi collaboratori (109) hanno descritto una delezione di questo gene in emizigosi di 1,4Mb in 15 dei 16 pazienti analizzati con spasmi infantili, mentre non è stata trovata in 11 pazienti su 12 che non presentavano una storia clinica di crisi epilettiche. Rothlisberger e i suoi collaboratori (110) invece hanno riportato recentemente che in bambini con spasmi infantili, questo gene non è necessariamente coinvolto in tale delezione, quindi ulteriori studi sono necessari per avere maggior chiarezza.

1.3.17 *ALDH7A1* (Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1)

Il gene *ALDH7A1* è localizzato sul cromosoma 5, costituito da 18 esoni e codifica per un'aldeide deidrogenasi. Mills e i suoi collaboratori nel 2006 (111) hanno determinato che la proteina è l'aldeide α -aminoadipica (α -AASA) deidrogenasi (antiquitin) coinvolta nel pathway di degradazione della lisina cerebrale. Hanno identificato, inoltre, che mutazioni in questo gene in omozigosi o in eterozigosi composta sono la causa dell'epilessia piridossina responsiva, una malattia autosomica recessiva. La mutazione più comune responsabile di circa il 30% degli alleli mutati è la E399Q (112). La possibilità di dosare metaboliti specifici come l' α -AASA e di effettuare la ricerca di mutazioni del gene *ALDH7A1* permette di diagnosticare questo disordine

metabolico senza ricorrere alla soppressione del trattamento con piridossina (113).

1.3.18 *PNPO* (Pyridoxamine-5'-Phosphate Oxidase)

Il gene *PNPO* è localizzato sul cromosoma 17 ed è costituito da 7 esoni. Questo gene codifica per un enzima che sintetizza l'ossidasi- 5'- pirofosfato nella via di attivazione delle piridossine (importanti cofattori nella sintesi di neurotrasmettitori) (114). Mutazioni di questo gene sono responsabili di un'encefalopatia epilettica ad esordio neonatale, con un quadro EEG di suppression-burst e crisi rispondenti alla somministrazione di 5'-piridossalfofosfato (115). Uno studio recente dello stesso gruppo di ricerca ha mostrato che alcuni pazienti con determinati genotipi rispondono anche alla piridossina (116).

1.3.19 *POLG* (Polymerase, DNA, gamma)

Il gene *POLG* (polymerase, DNA, gamma) è localizzato sul cromosoma 15 e codifica per un enzima coinvolto nella replicazione del DNA mitocondriale (117). La proteina *POLG* è composta da un dominio C-terminale della polimerasico ('pol') e un dominio ammino-terminale esonucleasico ('exo'), che conferisce l'attività proofreading per l'enzima (118). Mutazioni a carico di questo gene si manifestano con un'ampia variabilità fenotipica, ma alcune manifestazioni cliniche sono relativamente caratteristiche e comprendono una oftalmoplegia esterna progressiva, crisi farmacoresistenti con anomalie EEG, insufficienza epatica, alterata motilità gastrointestinale, neuropatia periferica, atassia (119) (120). La combinazione di uno o più di tali sintomi può determinare quadri sindromici quali la sindrome Alpers (121) e la sindrome PEO (119). Studi di ampie casistiche in pazienti adulti riportano una prevalenza di mutazioni del gene *POLG* nel 10% dei pazienti con caratteristiche suggestive di malattie mitocondriali (122). L'analisi del gene dovrebbe essere presa in considerazione nei bambini con una presentazione tipo encefalite che rapidamente evolve verso un'encefalopatia epilettica con interessamento epatico anche se la RMN encefalo, l'attività della catena

respiratoria e il quantitativo di DNA mitocondriale a livello del muscolo scheletrico è nella norma (123).

1.4 Epilessie Focali

1.4.1 Epilessie benigne del primo anno di vita

Le epilessie benigne del primo anno di vita costituiscono un gruppo di sindromi epilettiche in cui le manifestazioni cliniche, che si presentano in pazienti altrimenti asintomatici, regrediscono fino a scomparire spontaneamente (124). Per tale motivo queste forme vengono definite "benigne". Esse sono piuttosto rare e trasmesse con modello autosomico dominante. La diagnosi molecolare e la consulenza genetica sono molto importanti nell'iter clinico di queste forme in quanto permettono di evitare indagini non necessarie (125). Quando la base familiare è chiara, l'inquadramento diagnostico è più facile. In un certo numero di casi tuttavia l'assegnazione di una forma di epilessia a una categoria benigna può avvenire solo retrospettivamente, a meno che non sia possibile una diagnosi molecolare. Le manifestazioni cliniche di queste forme di epilessia sono simili, e la principale differenza è rappresentata dall'età di insorgenza.

1.4.2 Epilessia neonatale familiare benigna

L'epilessia neonatale familiare benigna (BFNS, Benign Familial Neonatal Seizures) è caratterizzata da crisi multifocali o generalizzate convulsive che generalmente insorgono dai primi giorni di vita fino ai 3 mesi e regrediscono spontaneamente entro poche settimane dall'esordio. Nel 15% dei pazienti possono comparire crisi più tardive, in particolare crisi febbrili (126). La maggior parte dei pazienti presenta mutazioni nel gene *KCNQ2* (canale K⁺ voltaggio-dipendente, sottotipo KQT-like, membro 2) o delezioni/duplicazioni che coinvolgono uno o più esoni di *KCNQ2* (65) (127). Un piccolo gruppo di casi familiari presenta mutazioni nel gene *KCNQ3* (canale K⁺ voltaggio-dipendente, sottotipo KQT-like, membro 3) (66). I geni *KCNQ2* e *KCNQ3* codificano proteine che vanno a formare un canale K⁺ eteromero,

responsabile della stabilizzazione del potenziale di membrana a riposo, e sono quindi importanti per la regolazione dell'eccitabilità neuronale (128). Non è ancora chiaro perché la BFNS si manifesti solo nelle prime settimane/mesi di vita. Un'ipotesi è che il cervello del neonato sia più vulnerabile ai cambiamenti, anche piccoli, dell'eccitabilità neuronale. Una alternativa è che i canali KCNQ2 e KCNQ3 mutati vengano sostituiti da altri canali K^+ , che diventano funzionanti dopo i primi mesi di vita.

1.4.3 Epilessia neonatale-infantile familiare benigna

L'epilessia neonatale-infantile familiare benigna (BFNIS, Benign Familial Neonatal-Infantile Seizures) è caratterizzata da crisi epilettiche simili a quelle osservate nei bambini con BFNS. L'età di insorgenza delle crisi è in media intorno ai 3 mesi e può variare nei diversi membri di una famiglia. La remissione delle crisi avviene entro i 12 mesi con un rischio molto basso di recidiva (89). Nella maggior parte delle famiglie sono state identificate mutazioni nel gene *SCN2A* (subunità α tipo 2 del canale Na^+ voltaggio-dipendente). In alcuni casi mutazioni di *SCN2A* sono associate a EOEE (129).

1.4.4 Epilessia infantile familiare benigna

L'epilessia infantile familiare benigna (BFIS, Benign Familial Infantile Seizures) è caratterizzata da crisi epilettiche simili alla BFNS, con età di insorgenza intorno ai 6 mesi. Alcuni casi familiari di BFIS presentano discinesie parossistiche con insorgenza più tardiva rispetto alle crisi (130). Mutazioni nel gene *PRRT2* (proline-rich transmembrane protein 2), localizzato sul cromosoma 16, sono state identificate in pazienti con convulsioni benigne dell'infanzia familiari e non (131). In alcuni pazienti erano anche presenti discinesie parossistiche chinesigeniche o indotte dall'esercizio. Mutazioni in *PRRT2* sono state inoltre identificate in pazienti con emicrania emiplegica o con atassia episodica. La mutazione frameshift c.649-650insC (p.R217Pfs-8) è quella che ricorre con maggior frequenza (131) (132). Sono stati anche descritti casi familiari con crisi infantili benigne e emicrania emiplegica e mutazioni del gene *ATP1A2* (133).

1.4.5 Epilessia familiare notturna del lobo frontale

L'epilessia familiare notturna del lobo frontale (ADNFLE, Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy) è trasmessa con modalità autosomica dominante ed è caratterizzata da crisi parziali di tipo motorio durante il sonno che insorgono nell'infanzia (134). Alcuni casi familiari di ADNFLE presentano mutazioni nei geni che codificano le subunità $\alpha 4$ (*CHRNA4*), $\beta 2$ (*CHRNA2*) e $\alpha 2$ (*CHRNA2*) dei recettori neuronali nicotinici per l'acetilcolina (nAChR) (135) (136) (137). Questi recettori sono eteropentameri costituiti da diverse combinazioni di subunità α e β (vedi figura 2); la combinazione $\alpha 4 - \beta 2$ è quella più rappresentata nel talamo e nella corteccia cerebrale. Nonostante l'esatto meccanismo che sottende l'epilettogenesi in questa forma non sia ancora chiaro, studi elettrofisiologici hanno dimostrato che in presenza di una mutazione questi canali hanno una aumentata sensibilità all'acetilcolina. Studi di linkage hanno portato all'identificazione di un nuovo locus nella regione 9q34.3 per l'epilessia familiare notturna del lobo frontale. L'analisi di sequenziamento esomico ha identificato nello stesso locus mutazioni del gene *KCNT1* (Potassium channel, subfamily T, member 1) (138).

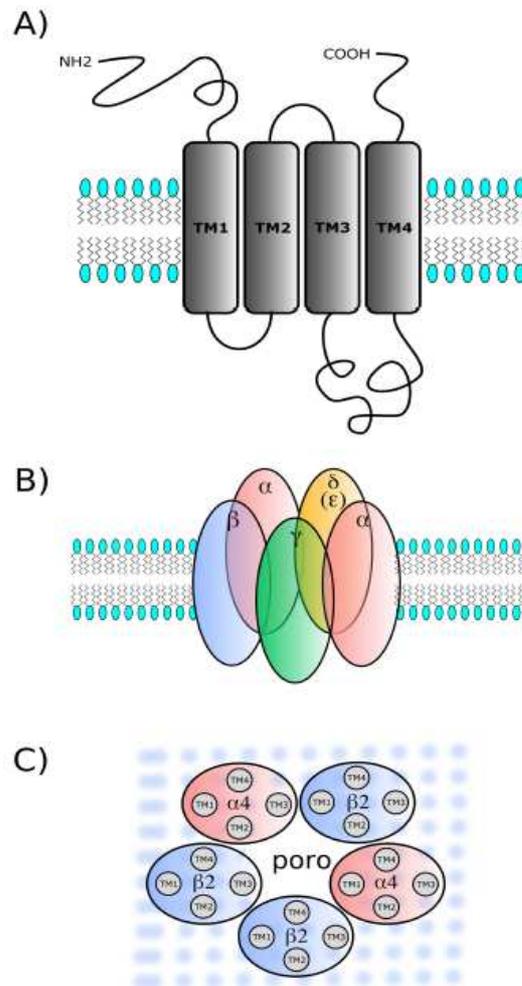


Figura 2: (A) Struttura generica di una singola subunità del recettore nicotinico. (B) I recettori nicotinici sono costituiti da 5 subunità (pentameri), arranziate simmetricamente in modo da costituire un poro attraverso il quale avviene il flusso di cationi, Na^{2+} e Ca^+ in entrata, K in uscita. Sono noti 9 diversi tipi di subunità α , 4 di subunità β , ma non ci sono isoforme per le subunità δ , γ e ϵ . Dalle molteplici combinazioni delle diverse tipologie di subunità si realizzano numerosi sottotipi recettoriali che presentano specifiche localizzazioni anatomiche (per esempio, muscolare o neuronale). Nel sistema nervoso centrale le strutture pentameriche del recettore sono formate da omodimeri di subunità α o da combinazioni di subunità α con subunità β . (C) Vista dall'alto della struttura di uno dei recettori nicotinici neuronali composto da 2 subunità $\alpha 4$ (*CHRNA4*) e da 3 subunità $\beta 2$ (*CHRNA2*). Alterazioni di questo recettore, dovute a mutazioni delle sue subunità, sono responsabili dell'epilessia notturna del lobo frontale.

1.4.6 Epilessia familiare del lobo temporale laterale

L'epilessia familiare del lobo temporale laterale (ADTLE, Autosomal Dominant Lateral Temporal Epilepsy) è una forma di epilessia parziale autosomica dominante associata a sintomi uditivi (139). Le prime manifestazioni cliniche con esordio nell'infanzia o adolescenza sono allucinazioni uditive, talvolta accompagnate da manifestazioni visive, olfattive o da vertigini (140). I

pazienti con questa forma di epilessia possono avere mutazioni nel gene *LGI1* (Leucine Rich Glioma Inactivated 1, noto anche come epitempina) (141). Il meccanismo patogenetico che porta all'epilessia è ancora sconosciuto. È stato dimostrato che l'aploinsufficienza di *LGI1* determina ADTLE, mentre l'inattivazione biallelica a livello somatico dello stesso gene è frequentemente osservata nei gliomi di alto grado (142). La proteina LGI1 ha un dominio funzionale costituito da una ripetizione di 44 aminoacidi denominato EAR (Epilepsy- Associated Repeat) (143). Questo dominio è presente anche nella proteina MASS1 (un "G-protein coupled receptor"), che è mutata nel modello animale murino di epilessia audiogenica (144).

1.4.7 Epilessia familiare con foci variabili

L'epilessia familiare con foci variabili (FFEVF, Familial focal epilepsy with variable foci) è trasmessa con modalità autosomica dominante ed è caratterizzata da crisi che originano in diverse regioni della corteccia cerebrale in diversi individui della stessa famiglia: frontali, temporali, parietali o occipitali (145). L'età di insorgenza delle crisi varia dall'infanzia all'età adulta. Gli individui affetti presentano generalmente un livello cognitivo normale, anche se alcuni pazienti possono avere deficit cognitivo e disturbi psichiatrici o dello spettro autistico. Studi di linkage hanno identificato un locus di 5.3 Mb nella regione 2q12. Successivamente sono state identificate mutazioni nel gene *DEPDC5* (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP), domain containing protein 5), localizzato nella stessa regione, in famiglie con diversi membri affetti (146). *DEPDC5* codifica per una proteina che sembra essere coinvolta nella trasduzione del segnale neuronale (147).

1.5 Crisi Febrili

Le crisi febbrili (FS, Febril Seizure) sono classificate come entità nosologica distinta rispetto alle sindromi epilettiche. Le crisi febbrili colpiscono il 2-4% dei bambini dai 3 mesi ai 6 anni nel corso di una malattia febbrile intercorrente (148). Uno dei pochi fattori di rischio per le crisi febbrili è la presenza di storia familiare positiva per lo stesso tipo di crisi. Il rischio di epilessia successiva

varia dal 4% al 7% (149). Studi di segregazione hanno dimostrato che la maggior parte delle crisi febbrili sono trasmesse con modalità poligenica e in alcuni casi con modalità autosomica dominante. Studi di linkage hanno permesso l'identificazione di diversi loci cromosomici (FEB1-FEB11) anche se finora non sono stati individuati i geni malattia (150).

1.6 Epilessie Generalizzate Idiopatiche Con Modello Di Ereditarietà Complesso

Le epilessie generalizzate idiopatiche (IGE, Idiopathic Generalized Epilepsy) rappresentano il 20-30% di tutte le epilessie e costituiscono un continuum di sindromi per le quali si suppone il coinvolgimento di due o più geni che presumibilmente interagiscono tra di loro (151). Tra le forme principali di IGE, ricordiamo l'epilessia con assenze del bambino (CAE, Childhood Absence Epilepsy), l'epilessia con assenze giovanile o dell'adolescente (JAE, Juvenile Absence Epilepsy), e l'epilessia mioclonica giovanile (JME, Juvenile Myoclonic Epilepsy) (151). Questi sottogruppi di IGE hanno caratteristiche cliniche che si sovrappongono in parte, con forme di transizione. Le IGE si prestano a studi genetici in quanto sono relativamente frequenti e spesso osservabili in famiglie con più membri affetti. I familiari dei pazienti con IGE hanno un rischio di sviluppare epilessia che varia dal 4% al 10% . Il rischio di ricorrenza è però più alto nei figli o nei fratelli dei pazienti affetti. Una eredità poligenica come quella tipica dell'IGE determina un decremento nel rischio di ricorrenza con l'allentarsi del grado di parentela rispetto al probando. Gli studi effettuati su gemelli con IGE hanno dimostrato una concordanza più alta per i gemelli monozigoti rispetto a quelli dizigoti (0,76 contro 0,33) (152). Anche questo dato è in accordo con un modello di ereditarietà poligenica. Ci sono alcune evidenze che il rischio sia maggiore per i figli di donne con IGE, in particolare se affette da epilessia mioclonica giovanile. Generalmente circa un terzo di tutti gli individui affetti di una famiglia in cui il probando ha un determinato sottotipo di IGE presentano la stessa tipologia di epilessia del probando. Gli altri individui affetti della stessa famiglia presentano altri tipi di IGE. Sono stati identificati vari loci cromosomici potenzialmente associati a diverse forme di IGE, anche se spesso questi sono stati individuati in singole famiglie e non

confermati in ulteriori studi (153). Data la complessità di questo tipo di epilessia sembra probabile che l'interazione di due o più loci di suscettibilità contribuisca alla determinazione del fenotipo. Studi di linkage su un numero elevato di famiglie con IGE hanno portato all'identificazione di diversi loci di suscettibilità (6p, 18q, 2q, 3q e 14q) (154) (155). In rare famiglie sono state osservate mutazioni patogenetiche a carico di singoli geni; questo fa supporre che alcune tipologie di IGE potrebbero avere una ereditarietà monogenica o, alternativamente, che potrebbero essere dovute all'interazione di un gene a effetto maggiore con altri geni. Mutazioni nel gene *GABRG2* (subunità γ 2 del recettore $GABA_A$) sono state identificate in famiglie con epilessia con assenze dell'infanzia associata a crisi febbrili, e una mutazione del gene *GABRG1* (subunità γ 1 del recettore $GABA_A$) è stata identificata in una famiglia con una forma dominante di epilessia mioclonica giovanile (156). Sono state osservate mutazioni nel gene *CLCN2* (canale 2 del cloro) in famiglie con diverse forme di IGE tra cui l'epilessia con assenze dell'infanzia (157). Vi sono, infine, evidenze che anche *GABRD* (158), *ME2* (159), *BR2* (160) e *NEDD4L* (161) siano geni di suscettibilità per le IGE.

1.7 Epilessie Sintomatiche/Criptogenetiche

Le epilessie sintomatiche o presunte sintomatiche rappresentano la maggioranza delle epilessie che si protraggono nel tempo e che resistono al trattamento farmacologico. L'evoluzione della diagnostica strumentale mediante risonanza magnetica ha permesso di identificare anomalie strutturali cerebrali in un notevole numero di pazienti con epilessia. Un esempio importante è rappresentato dall'identificazione di malformazioni generalizzate o regionali della corteccia cerebrale. Per essere efficaci, gli esami di immagine devono essere condotti in modo mirato, in base a uno specifico quesito posto sulla base della valutazione clinica della forma di epilessia. Tra le cause più importanti di epilessia sintomatica di interesse genetico sono da ricordare, oltre ai disturbi della migrazione neuronale, le malattie neurocutanee, le malformazioni vascolari, le cromosomopatie (trisomia 18, sindrome di Down, sindrome di Angelman e di Prader-Willi, sindrome del cromosoma 20 ad anello, sindrome di Wolff-Hirschhorn), le encefalomiopatie mitocondriali, le acidurie

organiche, le aminoacidopatie e le malattie perossisomiali. Tutte queste forme hanno generalmente un esordio precoce. Tuttavia, anche forme a esordio relativamente tardivo (seconda- terza decade di vita) possono essere causate da mutazioni geniche o da lesioni malformative congenite.

1.8 Epilessie Secondarie Ad Anomalie Dello Sviluppo Della Corteccia Cerebrale

Queste forme sono spesso presenti in pazienti con malformazioni della corteccia cerebrale e sono generalmente gravi. È stato stimato che circa il 40% dei bambini con epilessia farmaco-resistente abbia una malformazione corticale (162). Le malformazioni della corteccia cerebrale consistono in una distribuzione, organizzazione o talvolta differenziazione anomala di componenti neuronali. Alcune malformazioni corticali associate a epilessia sono dovute ad alterazioni che si verificano durante lo sviluppo embrionale, in particolare durante la migrazione dei neuroni a formare la corteccia nella sua conformazione definitiva (163). Negli ultimi anni sono stati identificati diversi geni che, se mutati, causano anomalie dello sviluppo corticale sia in modelli animali che nella patologia umana (Tabella 4).

Tabella 4: Geni e loci cromosomici associati a malformazioni corticali.

Malformazione Corticale	Modalità di trasmissione	Gene	Locus	Numero OMIM
Lissencefalia				
Sindrome di Miller-Dieker	AD	<i>LIS1</i>	17p13.3	*601545
Lissencefalia isolata (ILS) o eterotopia a banda sottocorticale (SBH)	AD	<i>LIS1</i>	17p13.3	*601545
Lissencefalia isolata (ILS) o eterotopia a banda sottocorticale (SBH)	X-linked	<i>DCX</i>	xq22.3-q23	*300121
Lissencefalia isolata (ILS) o eterotopia a banda sottocorticale (SBH)	AD	<i>TUBA1A</i>	12q12-q14	*602529
Lissencefalia X-linked con anomalie dei genitali (XLAG)	X-linked	<i>ARX</i>	xp22.13	*300382
Lissencefalia con ipoplasia cerebellare	AR	<i>RELN</i>	7q22	*600514
Eterotropia periventricolare (PH)				
PH bilaterale classica	X-linked	<i>FLNA</i>	xq28	*300017
PH con sindrome di Ehlers-Danlos	X-linked	<i>FLNA</i>	xq28	*300017
PH con dismorfismi facciali e costipazione	X-linked	<i>FLNA</i>	xq28	*300017
PH con sindrome dell'X fragile	X-linked	<i>FMR1</i>	xq27.3	*309550
PH con anomalie degli arti (Sindattilia)	X-linked	ND	xq28	
PH con sindrome di Williams	AD	ND	7q11.23	
PH	AD	ND	5p15.1	
PH	AD	ND	5p13.33	
PH	AD	ND	sq26-qter	
PH	AD	ND	4p15	
PH	AD	ND	5q14.3-q15	
PH	AD	ND	1p36.22- pter	
PH con microencefalia	AR	<i>ARFGEF2</i>	20q13.13	*605371
PH con sindrome di Donnai-Barrow	AR	<i>LRP2</i>	2q24-q31	*600073
Polimicrogria (PMG)				
PMG con epilessia rolandica e disprassia del linguaggio	X-linked	<i>SRPX2</i>	xq21.33-q23	*300642
PMG con agenzia del corpo collasso e microcefalia	AD	<i>TBR2</i>	p21.3-p21.2	*604615
PMG con aniridia	AD	<i>PAX6</i>	11p13	*607108
PMG	AD	ND	11p36.3-pter	
PMG con microencefalia	AD	ND	1q44- qter	
PMG con dismorfismi facciali	AD	ND	2p16.1- p23	
PMG con microencefalia e idrocefalo	AD	ND	4q21-q22	
PMG	AD	ND	21q2	
PMG con microdelezione 22q11.2	AD	ND	22q11.2	
PMG con sindrome di Warburg Micro	AR	<i>RAB3GAP1</i>	2q21.3	*602536
PMG consindrome di Goldberg-Shprintzen	AR	<i>KIAA1279</i>	10q21.3	*609367
PMG asimmetrica	AD	<i>TUBB2B</i>	6p25.2	*612850
PMG bilaterale fronto-parietale (BFPP)	AR	<i>GPR56</i>	16q13	*604110

1.9 Epilessie con disordini metabolici

Spesso l'epilessia rappresenta una parte dello spettro di manifestazioni cliniche di un ampio numero di malattie metaboliche ereditarie (164) (165). Nella maggior parte dei pazienti con disordini metabolici l'epilessia è una manifestazione predominante e grave che solo in un numero limitato di casi può essere tenuta sotto controllo con un regime dietetico o farmacologico appropriato. L'epilessia piridossino-dipendente è una tipologia di epilessia dovuta a mutazioni nel gene *ALDH7A1* in cui le crisi si interrompono nel momento in cui al paziente viene somministrata la piridossina (vitamina B6) per via intravenosa, ma si ripresentano non appena il trattamento con piridossina viene sospeso. Questo disordine metabolico è infatti determinato da un difetto della semialdeide α -aminoadipica (α -AASA) deidrogenasi (antiquitin) nel pathway di degradazione della lisina cerebrale (166). La possibilità di dosare metaboliti specifici come l' α -AASA e di effettuare la ricerca di mutazioni del gene *ALDH7A1* permette di diagnosticare questo disordine metabolico senza ricorrere alla soppressione del trattamento con piridossina (113) (167). La sindrome da deficit del trasportatore di glucosio di tipo 1 (GLUT1-DS) è un altro esempio di disordine metabolico in cui l'epilessia rappresenta un tratto importante dello spettro fenotipico. I pazienti presentano crisi a insorgenza infantile, disturbi del movimento, atassia, deficit cognitivo e, in alcuni casi, microcefalia. In alcuni casi sono state osservate all'EEG scariche di punte onde generalizzate in combinazione con crisi generalizzate a tipo assenze, miocloniche e tonico-cloniche (168). La sindrome GLUT1-DS è associata a mutazioni del gene *SLC2A1* (Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter, member 1) che codifica la proteina GLUT1, coinvolta nel trasporto del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica (169). La valutazione del rapporto glicemia/glicorrachia permette di effettuare la diagnosi biochimica di questa sindrome. I pazienti affetti hanno, infatti, un valore del rapporto glicemia/glicorrachia ridotto rispetto al normale (170). Recentemente, mutazioni nel gene *SLC2A1* sono state identificate anche in pazienti con discinesia parossistica indotta dall'esercizio, in pazienti con epilessia con assenze a insorgenza precoce o con epilessia mioclonico-astatica (171).

1.10 Approcci terapeutici alle epilessie

Nell'ambito dell'epilessia, l'opportunità o inopportunità di applicare un dato trattamento in una specifica condizione è stata acquisita, in alcuni casi, nella pratica clinica e solo in seguito è stata giustificata scientificamente dalle conoscenze genetiche. Ad esempio, il fatto che la lamotrigina, un bloccante del canale del sodio, possa potenzialmente aggravare le convulsioni causate dalla sindrome di Dravet fu inizialmente dimostrato molto prima che si scoprisse che le mutazioni loss of function nel gene *SCN1A* fossero la causa della sindrome. Ad ogni modo, da una prospettiva clinica, una migliore comprensione delle basi genetiche dell'epilessia, unita ad una maggiore conoscenza della patologia molecolare e delle caratteristiche elettrocliniche, permettono di scegliere il trattamento in modo più razionale ed efficace, il che risulta in una migliore gestione del paziente. Nei casi in cui le correlazioni genotipo-fenotipo suggeriscono che l'epilessia possa avere un decorso benigno, le analisi genetiche possono supportare la decisione di evitare terapie antiepilettiche che prevedano l'uso di farmaci durante periodi critici dello sviluppo del cervello. Esempi di questo tipo sono principalmente connessi a epilessie familiari benigne manifestantesi nei primi anni di vita a causa di mutazioni dei geni *PRRT2*, *KCNQ2* e *SCN2A*. Solo in condizioni molto rare, la scelta del trattamento è basata specificamente sui meccanismi patofisiologici ereditari. Un esempio interessante è rappresentato dall'epilessia notturna autosomico-dominante del lobo frontale (ADNFLE), causata da mutazioni della subunità alfa del recettore neuronale nicotinico dell'acetilcolina, in cui l'effetto terapeutico del trattamento con cerotti di nicotina sulle crisi refrattarie è stato dimostrato elegantemente seppur in modo aneddótico in un singolo caso studio, in cui i diversi trattamenti vengono valutati in un singolo paziente nel corso del tempo (125). Altri studi hanno confermato che la somministrazione transcutanea di nicotina possa essere un trattamento utile per pazienti affetti da ADNFLE e crisi gravi (172). In ogni caso, un'applicazione più ampia di queste osservazioni è limitata dal fatto che la nicotina crea dipendenza e può causare effetti cardiovascolari. Esempi più specifici derivano da condizioni cliniche in cui un approccio terapeutico razionale è richiesto con la somministrazione di una sostanza che può correggere un difetto metabolico che causa l'epilessia. Per esempio, l'epilessia piridossina-dipendente è una

malattia autosomica-recessiva in cui le crisi si manifestano nel periodo neonatale o nell'infanzia, può essere arginata solamente somministrando dosi elevate di piridossina (173). Se non curata, la malattia può portare a stati epilettici molto gravi. I pazienti affetti richiedono l'integrazione di piridossina per tutta la vita ma i farmaci antiepilettici risultano essere nella maggior parte dei casi, inutili. Mentre la prognosi per il controllo delle crisi è eccellente per la maggior parte dei pazienti, spesso si manifestano problemi nello sviluppo neurologico, e anche se è stato suggerito che i bambini sottoposti al trattamento il prima possibile abbiano migliori risultati, non è sempre così (174). L'epilessia piridossina-dipendente è diagnosticata verosimilmente in un numero minore di casi rispetto a quelli effettivi, e perciò la somministrazione di piridossina in molti centri è parte di un protocollo di trattamenti per crisi neonatali. Questa patologia è causata da mutazioni nel gene *ALDH7A1*, che codifica per un'aldeide deidrogenasi (antiquitina) che agisce nel pathway del catabolismo cerebrale della lisina (111). Gli individui affetti mostrano un accumulo di semialdeide α -aminoadipica (AASA), il che provoca una riduzione dell'attività intracellulare del cofattore piridossal-5'-fosfato (PLP) della vitamina B6, ed un concomitante sbilanciamento dei livelli di acido glutammico e acido γ -aminobutirrico (GABA). Le crisi acido folinico-sensibili sono molto simili all'epilessia piridossina-dipendente (175). Le crisi precoci possono essere causate anche da carenza di piridoss(am)ina 5'-fosfato ossidasi (PNPO), che risponde alla somministrazione di piridossal-5'-fosfato (174).

Un terzo esempio dell'interazione tra diagnosi genetica e scelta efficace del trattamento è rappresentato dall'uso della dieta chetogenica nel trattamento della sindrome da deficienza di GLUT1, una patologia autosomica-dominante dovuta ad una mutazione del gene *SLC2A1*. Il trasporto cerebrale del glucosio avviene per trasporto facilitato, massimamente via GLUT1, localizzato sull'endotelio della barriera ematico-encefalica: mutazioni in *SLC2A1* danno luogo ad un insufficiente trasporto di glucosio nel cervello. I pazienti con deficienza di GLUT1 inizialmente sono stati descritti come affetti da una grave sindrome neurologica, con crisi precoci intrattabili, seguite da ritardo dello sviluppo, microcefalia e discinesia parossistica o continua. Questa condizione fu prima identificata e in seguito diagnosticata nella pratica clinica, in base a bassi livelli di glucosio nel liquido cefalorachidiano (ipoglicorrachia) in casi con glicemia normale o con rapporto anomalo tra livelli di glucosio contenuto nel

liquido cefalorachidiano e glucosio sierico (169). Ad ogni modo, sono state descritte numerose varianti, che portano a gradi variabili di insufficienza di trasporto (176), il che complica l'utilità delle informazioni genetiche nella pratica clinica (177). Le conseguenze neurologiche della deficienza di GLUT1 presumibilmente dipendono da un disordine del metabolismo energetico cerebrale, dovuto al trasporto ridotto. Il D-glucosio è il principale carburante del cervello, anche se, ad esempio, possono essere usati in alternativa anche corpi chetonici. Il trattamento da scegliere per la sindrome da deficienza di GLUT1 consiste in una dieta che ricalchi lo stato metabolico a digiuno e dia chetoni come alternativa per il cervello, ripristinando il corretto metabolismo energetico. La dieta chetogena è ricca di grassi e proteine ed è povera di carboidrati, garantendo l'87-90% del fabbisogno giornaliero di calorie in grassi. È usata inoltre nel trattamento di epilessie infantili farmacoresistenti. Dato che il cervello in sviluppo necessita di molta più energia nei bambini, i pazienti con la sindrome da deficienza di GLUT1 dovrebbero iniziare con la dieta prima possibile e mantenerla minimo fino all'adolescenza. Anche se alcuni pazienti con crisi più lievi possono rispondere a trattamento antiepilettico, la maggior parte non lo fa e la risposta delle crisi alla dieta chetogena è notevole. In più, alcuni agenti farmacologici come fenobarbitale e diazepam alterano la funzione di GLUT1 e devono essere evitati (178). Negli ultimi anni, si sta espandendo il range dei fenotipi clinici di epilessie in cui si osservano mutazioni in *SLC2A1* e risposte positive alla dieta chetogena (25, 179-180), aumentando la possibilità che il gene agisca come modulatore di altre anomalie coesistenti. L'utilità della dieta chetogena nella sindrome da deficienza di GLUT1 è stata dimostrata prima che la sindrome fosse ricondotta a mutazioni di GLUT1, sulla base delle conseguenze fisiopatologiche di bassi livelli di glicorrachia, comunque, la possibilità di scoprire mutazioni in GLUT1 in pazienti con presentazioni cliniche atipiche di carenza di GLUT1 e persino livelli borderline o normali di glicorrachia, ha dato vantaggi incalcolabili per la diagnosi e la cura di questa malattia.

Gli studi genotipo-fenotipo su larga scala hanno determinato che la semplice corrispondenza tra fenotipo e genotipo può indebolirsi e dar luogo a differenti età di insorgenze e gravità delle condizioni cliniche (eterogeneità fenotipica) in soggetti portanti mutazioni a carico dello stesso gene. Questa debole correlazione può essere dovuta a possibili alterazioni strutturali nella proteina

mutante, che può portare a perdita o guadagno di funzione (mutazioni gain o loss of function). Tuttavia, anche in famiglie portatrici della stessa mutazione nello stesso gene si possono osservare diversi gradi di complessità, come evidenziato da casi sani portatori di una mutazione "causativa". La variabilità fenotipica in queste famiglie può essere attribuita alla presenza di polimorfismi in geni modificatori che influenzano l'espressione fenotipica o, in alternativa, in fattori ambientali. La farmacoresistenza può essere considerata come un tratto fenotipico in cui i meccanismi intrinseci sono influenzati, almeno in parte, dalle varianti genetiche. Studi farmacogenetici hanno cercato di capire se la resistenza ai farmaci possa essere influenzata da varianti di un singolo nucleotide in geni codificanti per il bersaglio terapeutico del farmaco, o in altri geni associati all'assorbimento e al metabolismo del farmaco, che potrebbero spiegare la resistenza al trattamento (181). Questi studi tuttavia sono ostacolati da serie difficoltà metodologiche, poiché non tengono conto della eterogeneità che sta alla base dell'epilessia nella popolazione studiata. Questa semplificazione si riflette sull'assunzione che un singolo meccanismo influenzerebbe l'efficacia del farmaco in relazione ai differenti meccanismi di epilettogenici, che dovrebbe essere replicata incrociando più studi di popolazione. Tuttavia i risultati di questo genere di studi non sono stati consistenti. Per esempio, in uno studio inglese un polimorfismo intronico di un singolo nucleotide nel gene *SCN1A* era associato ad una prescrizione di dose maggiore di fenitoina e carbamazepina (182) ma non in uno studio successivo austriaco (183) ed uno italiano (184). Allo stesso modo, sono osservabili risultati contrastanti in studi dove è stato esaminato come le varianti geniche possono influenzare l'assorbimento di farmaci anticonvulsanti nel cervello (185). Per comprendere a fondo la reale influenza di geni specifici sulla farmacoresistenza sarebbero quindi necessari studi su ampie popolazioni eziologicamente ed etnicamente omogenee.

1.11 Nuove tecnologie applicate alla genetica: Next Generation Sequencing (NGS)

Dalla metà del secolo scorso è noto che il programma genetico degli organismi biologici è codificato nella sequenza del DNA, ma solo gli avanzamenti tecnologici degli ultimi 30 anni hanno consentito di determinare la sequenza di interi genomi. Nel 1977 sono stati pubblicati 2 articoli importanti che descrivono i metodi per il sequenziamento del DNA. Allan Maxam e Walter Gilbert hanno riportato un approccio in cui frammenti di DNA con marcatura terminale sono stati sottoposti a scissione chimica base-specifica e i prodotti di reazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel (186). In un approccio alternativo, Frederick Sanger e colleghi hanno descritto l'uso di dideossinucleotidi di terminazione della catena analoghi che provocano la terminazione base-specifica della sintesi del DNA (187). L'affinamento e la commercializzazione del secondo metodo ha portato alla sua ampia diffusione in tutta la comunità di ricerca e in diagnostica clinica, e viene considerata come tecnologia di sequenziamento 'di prima generazione'. Nel 1987, dopo anni di ricerche, l'Applied Biosystems introdusse la prima macchina di sequenziamento automatica (AB370), che utilizzava un elettroforesi capillare che rendeva il sequenziamento più veloce e più accurato. AB370 poteva individuare 96 basi in una volta, e 500 K basi in un giorno, e poteva raggiungere una lunghezza di lettura di 600 basi. Nel 1998 gli strumenti di sequenziamento automatico con software associati che usavano macchine di sequenziamento capillare e la tecnologia di Sanger, diventarono i principali strumenti per il completamento del progetto genoma umano nel 2001, un'iniziativa durata 13 anni con un costo stimato di 2,7 miliardi di dollari. Questo progetto stimolò lo sviluppo di strumenti di sequenziamento più potenti, più veloci e più precisi riducendo allo stesso tempo i costi e l'impiego di manodopera. Nel 2008, in confronto, un genoma umano è stato sequenziato nell'arco di 5 mesi per circa 1,5 milioni di dollari (188). Questo dato mette in evidenza le capacità del settore in rapida evoluzione del sequenziamento di "prossima generazione" (Next Generation Sequencing, NGS), mediante tecnologie che sono emerse nel corso dell'ultimo decennio. Il maggiore vantaggio offerto dalle tecnologie NGS è la capacità di produrre un enorme volume di dati a basso costo. La prima piattaforma di NGS disponibile sul

mercato (a partire dal 2005) è stata la piattaforma 454 sviluppata da Life Sciences (ora di proprietà di Roche), l'anno successivo fu introdotto il Genome Analyzer realizzato da Solexa (poi acquisito da Illumina) e il Solid realizzato da Agentcourt (attualmente di Applied Biosystems). Questi sono i tre principali sistemi di sequenziamento massivo parallelo che condividono ottime performance, elevate velocità, precisione e costi comparabili con il sequenziamento Sanger. Dopo anni di sviluppo tecnologico questi sistemi mostrano performance migliori in termini di lunghezza della lettura, precisione, applicazioni, manodopera richiesta e infrastrutture informatiche. Queste tre piattaforme seguono gli stessi quattro steps per la procedura di sequenziamento, riassunti di seguito in termini molto generali:

- Preparazione delle Librerie: La preparazione dei templati consiste nella frammentazione delle grandi macromolecole di DNA in piccoli frammenti, ai quali verranno aggiunti degli adattatori specifici alle estremità, diventando così le cosiddette Libraries.
- Amplificazione dei singoli frammenti: Amplificazione clonale massiva e parallela dei singoli frammenti di DNA su vetrino o su biglie tramite PCR, con lo scopo di generare un sufficiente numero di copie dei frammenti marcati che verranno individuati grazie a un sistema ottico (189). L'immobilizzazione dei templati su supporti solidi e la loro separazione, è la caratteristica comune a tutte e tre le piattaforme che permette di eseguire migliaia di miliardi di reazioni di sequenziamento contemporaneamente.
- Sequenziamento propriamente detto: sequenziamento dei frammenti ottenuti dai diversi cicli di estensione e individuati automaticamente, creando le reads, ovvero milioni di brevi frammenti di sequenza che verranno allineati ad una sequenza di riferimento conosciuta o assemblati de novo (190).
- Analisi dati: i dati di queste letture vengono raccolti su un dispositivo, e tramite specifici software vengono allineate le singole reads con lo scopo di ricostruire la sequenza dell'iniziale template. Il sequenziamento ha due parametri fondamentali: il coverage e la lunghezza delle reads. Con coverage si intende il numero di reads che riescano ad avere per

porzione del genoma, cioè quante volte è stato sequenziato un nucleotide (valori bassi di questo parametro abbassano l'indice di qualità dell'analisi). La lunghezza delle reads invece è il numero di paia di basi che compongono le singole reads. Per aver un sequenziamento ottimale dovremo avere valori alti di entrambi questi parametri, perché un coverage alto e reads corte comportano dei gaps fra una read e l'altra, l'opposto porta sempre a dei gaps, perché il basso coverage fa sì che non ci siano sufficienti reads sotto ogni porzione del genoma.

Le tecnologie di NGS hanno avuto un notevole impatto sulla ricerca genomica in termini di tempo, costi ed esecuzione, anche se la grande quantità di dati di sequenza in uscita e l'interpretazione dei risultati rappresentano il principale collo di bottiglia di tale metodica. Un ulteriore limite di questa tecnica è l'impossibilità di analizzare le copy numbers variants (CNVs), piccole varianti strutturali che possono essere delezioni o duplicazioni che portano ad un cambiamento del numero di copie di una specifica regione cromosomica. Sebbene queste varianti strutturali in alcune regioni del genoma non hanno alcuna conseguenza fenotipica, altre influenzano il dosaggio di un gene, e di conseguenza possono causare malattie genetiche. Rendendo così necessarie per completare tale analisi un'integrazione con altre metodiche, cosa che potrebbe essere evitata se viene utilizzata una piattaforma NGS diversa.

Di seguito verrà trattato il confronto tra questi tre sistemi.

1.11.1 Roche 454

È stato il primo sistema di NGS ad entrare con successo sul mercato. Questo sequenziatore usa il metodo di pirosequenziamento, invece di usare i dideossinucleotidi per terminare la reazione di amplificazione a catena. La tecnologia del pirosequenziamento si basa sull'individuazione del pirofosfato rilasciato durante l'incorporazione dei nucleotidi (191). Il DNA genomico di grandi dimensioni viene frammentato mediante nebulizzazione in pezzi da 300/500bp. Le librerie 454 vengono formate grazie a degli adattatori specifici 454, vengono denaturate a singoli filamenti e catturate grazie a delle biglie complementari agli adattatori 454 durante l'amplificazione. Segue poi la PCR

in emulsione, in cui ogni micella contiene una biglia che si comporta come un micro reattore. Alla fine sulla superficie della biglia saranno presenti fino a 10 milioni di copie del frammento. Così facendo si può ottenere l'amplificazione di uno specifico frammento senza la necessità di effettuare clonaggio in batteri, infatti l'intera collezione di frammenti viene amplificata contemporaneamente in una stessa provetta. Successivamente saranno purificate tutte le "biglie produttive", ovvero quelle che effettivamente hanno legato il frammento di sstDNA (single stranded template DNA) e che sono andate incontro ad amplificazione. Le biglie vengono deposte in una piastra Pico Titer costituita da circa 1,6 milioni di pozzetti che hanno un diametro tale da poter accogliere un'unica biglia, la quale viene posizionata nello strumento di fronte ad una fotocamera ad alta risoluzione (CCD Camera) dove un dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) alla volta si completerà alla base corrispondente sul filamento del template e con l'aiuto dell'ATP solforilasi, la luciferasi, la luciferina, la DNA polimerasi e la 5'-adenosinafosfosolfato (APS) verrà rilasciato tanto pirofosfato (PPi) quanti nucleotidi verranno incorporati. L'ATP che si genererà dall'APS e il PPi, trasformerà la luciferina in ossiluciferina generando così il flash di luce visibile. Allo stesso tempo l'apirasi degraderà le basi che non si saranno appaiate, e la reazione di pirosequenziamento sarà pronta a ripetersi (Figura 3). Inizialmente nel 2005 con la tecnologia Roche 454 si ottenevano intorno alle 200000 reads di lunghezza variabile tra 100-150 bp, e un output per corsa di 20 MB (192). Nel 2008 dopo vari aggiornamenti è stato lanciato il sistema 454 GS FLX Titanium con il quale si ottengono reads con una lunghezza di 700bp, con una precisione del 99.9% dopo filtraggio dei dati, con un output di 0,7 G di dati per corsa in 24 ore. Il vantaggio maggiormente rilevante di questo sistema è la velocità, infatti impiega solamente 10 ore per completare il sequenziamento. D'altra parte i costi elevati dei reagenti, e l'errore relativamente alto che si riscontra quando si hanno più di 6 basi uguali vicine rimangono i principali difetti di questo sistema. Il software che viene utilizzato è il GS FIX Titanium Software, di cui il GS RunProcessor rappresenta la parte principale di tutto il software. Ad ogni corsa vengono prodotti una serie di file, uno dei quali è il file SFF (Standard Flowgram Format), che contiene il basecalling della sequenza (viene assegnato la base caratteristica per ogni picco del cromatogramma), il corrispondente valore di qualità per tutti gli individui, e le reads filtrate cioè le high-reads. Infine usando altri programmi

forniti nel GS FIX Titanium Software il file SFF può essere utilizzato in vari step e convertito nel formato fastq, necessario per analizzare ulteriormente i dati prodotti.

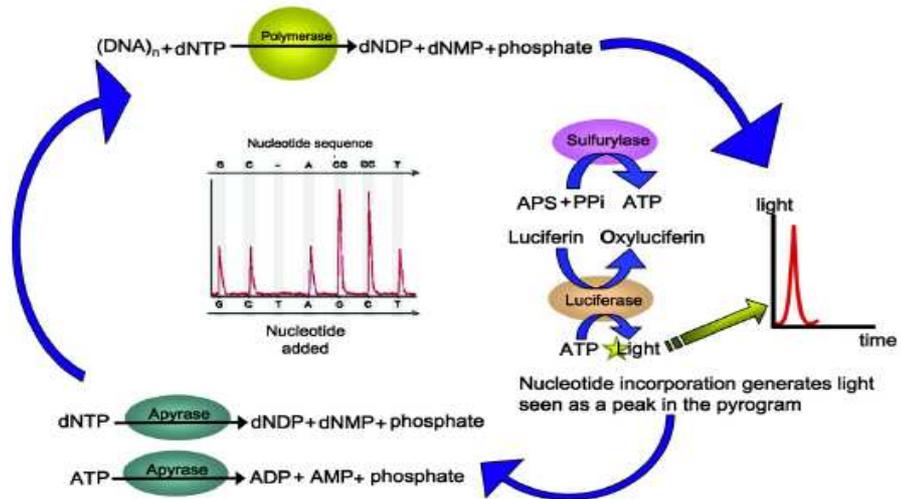


Figura 3: Chimica del Pirosequenziamento: reazioni biochimiche e enzimi coinvolti nella generazione del segnale luminoso durante il pirosequenziamento del DNA.

1.11.2 AB SOLiD

La Solid è stata acquistata nel 2006 dall'Applied Biosystems. Il sequenziatore adotta la tecnologia del sequenziamento a due basi e si basa sulla ligazione progressiva di oligonucleotidi in cui il risultato è una sequenza di colori ciascuno dei quali rappresenta uno specifico dinucleotide. Ai frammenti da sequenziare sono legati degli adattatori necessari per il legame alle biglie, e vengono successivamente amplificati mediante PCR in emulsione. Dopo la denaturazione le biglie vengono depositate su di un supporto di vetro (192). Viene utilizzata una sonda di ligazione di 8 basi che contiene: il sito di ligazione (la prima base), il sito di rottura (la quinta base), e 4 differenti marcatori fluorescenti colorati, legati all'ultima base. Come prima cosa il primer si appaia alla sequenza adattatrice, successivamente viene aggiunta la mix contenente le sonde di ottameri di DNA che si ibridano al frammento di DNA stampo che vengono legati per aggiunta di una ligasi. Questi ottameri sono caratterizzati da un doppietto di basi noto, ognuno accoppiato ad un fluoroforo. Dopo la rivelazione della marcatura si ha la determinazione della sequenza di 2 delle 8 basi appaiate. Dall'ottamero legato vengono rimosse le

ultime tre basi e quindi rimossa anche la marcatura. Il segnale fluorescente verrà registrato durante l'appaiamento della sonda con il filamento di template e svanirà quando la sonda si staccherà. Il ciclo di ibridizzazione e taglio si ripete permettendo la determinazione delle successive 2 basi note del seguente ottamero in sequenza. Quindi ad ogni ciclo si potranno sequenziare solamente 2 basi su 5. Per ottenere la sequenza completa è necessario ripetere il ciclo di sequenziamento utilizzando anche primers più corti. La lettura può arrivare fino a circa 35 nucleotidi (Figura 4). Questo sistema permette di minimizzare ulteriormente errori nella lettura della sequenza (193). Inizialmente la lunghezza delle reads era di 35bp, e aveva un output di 3G per corsa, e grazie al sequenziamento a due basi aveva una precisione del 99.85% dopo opportuno filtraggio. Dopo molti aggiornamenti è stata aumentata la lunghezza delle reads a 85 bp, la precisione è arrivata a 99.99% e l'output di 30G. Il tempo impiegato per completare una corsa completa e generare 7TB per corsa è circa 7 giorni. I maggiori difetti di questa metodologia sono la ridotta lunghezza delle reads e i campi limitati di applicazione di questo tipo di sequenziamento. Come nelle altre piattaforme NGS, i macchinari per l'elaborazione dati sono costosi e non banali nell'utilizzo. Sono necessari accorgimenti tecnici per la manutenzione dei macchinari, come stanze con aria condizionata, cluster per il calcolo dati, personale specializzato in informatica, networks molto veloci, piattaforme di memoria molto elevate, e sistemi di Batch queue (LSF). Il Software Solid come prima cosa converte le basi della sequenza analizzata in colori che rappresentano le basi della sequenza, e un algoritmo di mappaggio, MaxMapper, confronta il pattern di colori della sequenza analizzata con un pattern di colori di una sequenza di riferimento, per avere informazione sulla sequenza.

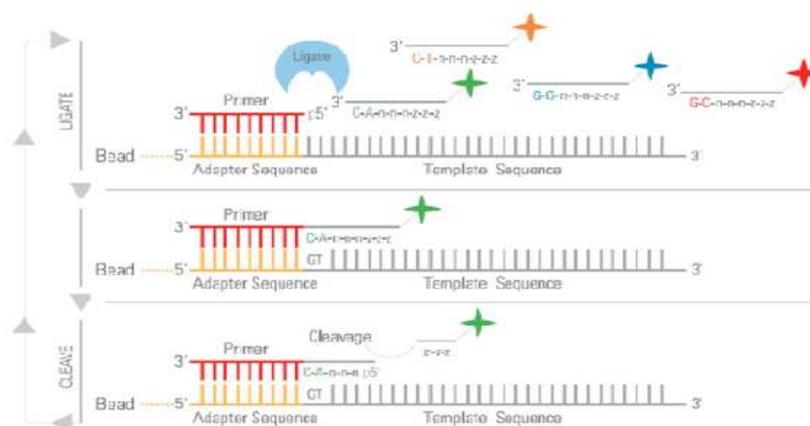


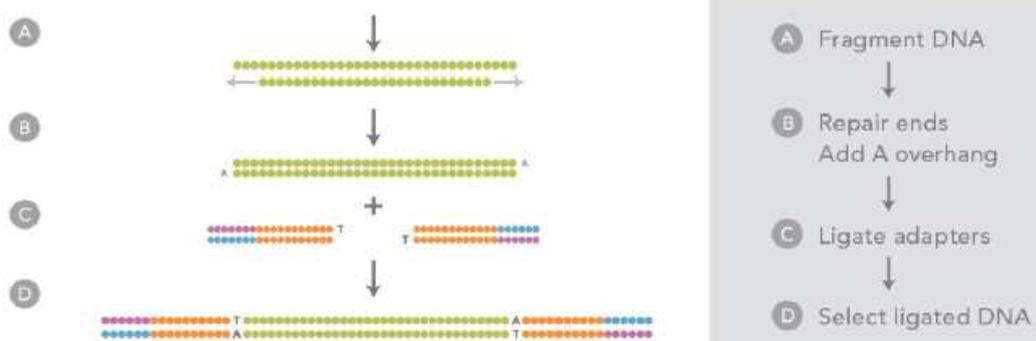
Figura 4: Sequenziamento tramite ligazione nella piattaforma ABI Solid.

1.11.3 Illumina GA/ HiSeq System

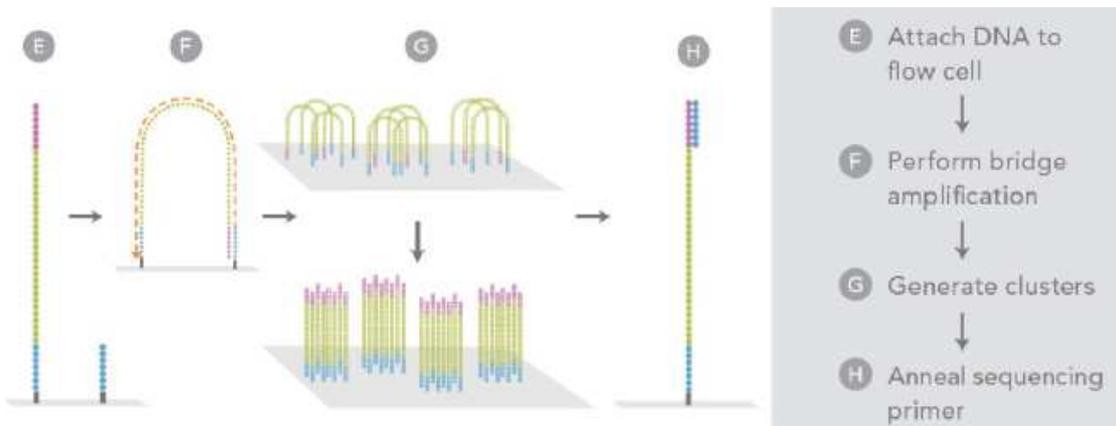
Nel 2006 Solexa realizzò Genome Analyzer (GA), che nel 2007 venne acquistato da Illumina. Il sequenziatore adotta la tecnica del sequenziamento per sintesi (SBS). Le librerie con i propri adattatori fissati all'estremità sono denaturate a singoli filamenti e fissate su un supporto solido, che serve come sito di legame per i primer di PCR. Successivamente l'amplificazione dei frammenti avviene tramite bridge PCR, che forma cluster che contengono circa 1000 copie dello stesso frammento da sequenziare. L'amplificazione mediante bridge PCR, come nel caso della PCR in emulsione per la 454 della Roche, è necessaria per rendere il segnale abbastanza forte da poter essere catturato dalla CCD Camera. La mix di reazione per il sequenziamento e la polimerizzazione viene depositata sulla superficie del supporto e contiene: primers, 4 nucleotidi marcati rispettivamente con 4 fluorofori in grado di interrompere temporaneamente la polimerizzazione e la DNA polimerasi (192). Prima del sequenziamento le librerie si dividono in singoli filamenti con l'aiuto di un enzima che le linearizza, dopo i 4 nucleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) che contengono ognuno un fluoroforo diverso, e un gruppo terminatore al 3', si associano a una base complementare alla volta. Incorporato il nucleotide avviene la lettura con una CCD camera, successivamente viene eliminato il fluoroforo ed il gruppo terminatore al 3' (che impedisce l'attacco di un altro nucleotide) e il ciclo si ripete (Figura 5). All'inizio GA Illumina aveva un output di 1G per run, dopo una serie di aggiornamenti nel 2010 Illumina ha lanciato sul mercato HiSeq2000, il quale utilizza la stessa strategia di sequenziamento del GA, ma con un output di 600G per corsa, e un tempo di 8 giorni per terminare il sequenziamento. Il tasso di errore è in media sotto il 2% dopo il filtraggio, e risulta essere anche molto più economica rispetto alla 454. HiSeq2000 utilizza un software di controllo HiSeq (HCS), e un software di analisi real time (RTA) per avere il base calling, necessita di un altro software CASAVA per analisi secondarie. I due software HCS e RTA calcolano a partire dalle prime 20 basi di ogni sequenza l'output e la qualità di ogni analisi. Il tipico file di output di questa piattaforma è il file.bcl, che contiene il base calling, e il valore di qualità dell'analisi. Successivamente tramite il BCL Converter questo file viene convertito nel file qseq.txt. ELAND è un programma di CASAVA che viene usato per confrontare le reads con il genoma. Nel 2011 oltre alla piattaforma HiSeq Illumina ha lanciato sul

mercato anche una piattaforma da banco, MySeq, la quale condivide gran parte della tecnologia HiSeq e risulta essere più conveniente per sequenziare ampliconi o campioni batterici.

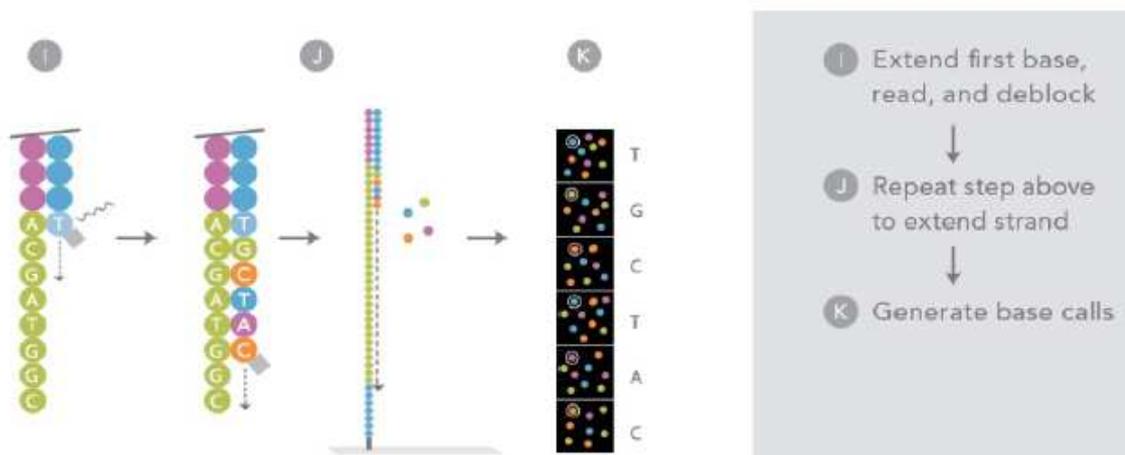
Concludendo i tre principali pregi di queste tre piattaforme di analisi sono: le dimensioni dell'output e il basso costo di reagenti per Illumina, la precisione per ABI Solid, e la lunghezza delle reads per Roche 454 (193).



(a) Preparazione delle library con piattaforma Illumina GA



(b) Bridge PCR con piattaforma Illumina GA



(c) Sequenziamento con piattaforma Illumina GA

Figura 5: Step principali della metodologia della piattaforma GA Illumina.

1.11.4 Sequenziatori di terza generazione

I sequenziatori di terza generazione offrono nuove idee per il sequenziamento e hanno principalmente due caratteristiche: la PCR non è più necessaria prima del sequenziamento, accorciando così il tempo impiegato nella preparazione dei campioni. Inoltre il segnale è catturato in tempo reale, quindi non è importante se il segnale è di tipo fluorescente o di tipo elettrico, viene semplicemente monitorato durante la reazione enzimatica di aggiunta dei nucleotidi nel filamento complementare (194). Esistono per ora due tipi di piattaforme: real time da singolo molecola (SMRT) sviluppato dalla PacBio Bioscience e il Nanopore (193).

- SMRT si basa sull'utilizzo di un enzima modificato e l'osservazione diretta in tempo reale della reazione enzimatica. Durante la reazione, l'enzima incorpora i nucleotidi sul filamento complementare ed espelle il fluoroforo precedentemente legato al nucleotide. La camera incorporata all'interno del macchinario quindi cattura il segnale in tempo reale in formato tipo film. Questo non solo rivela il segnale di fluorescenza, ma anche la differenza del segnale nel tempo, che potrebbe essere utile per la predizione di varianti nella struttura della sequenza in caso di uno studio epigenetico volto a valutare i profili di metilazione. I vantaggi di questa piattaforma sono in primo luogo la preparazione molto veloce dei campioni, si impiegano dalle 6 alle 8 ore, e non avendo bisogno della PCR si eliminano gli errori causati da questa reazione. Questa metodica consente inoltre un turnover abbastanza veloce in quanto le corse vengono finite in un giorno. La lunghezza media delle reads è di circa 1300bp, molto più lunghe di qualsiasi altra reads ottenuta con sistemi di seconda generazione, d'altro canto la velocità risulta più bassa (figura 6) (193).

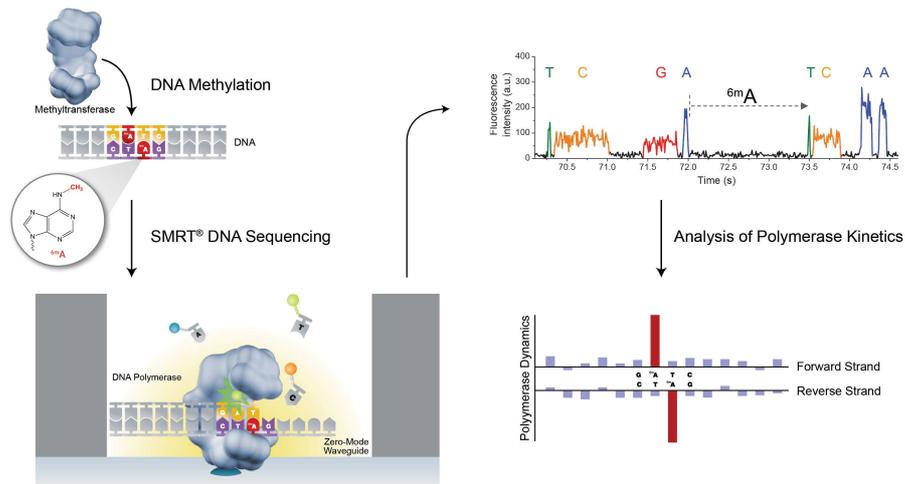


Figura 6: real time da singolo molecola (SMRT).

- Nanopore consiste in un piccolo bioporo dal diametro nell'ordine dei nanometri, che può essere trovato in proteine canale assemblate nel doppio strato fosfolipidico per facilitare lo scambio di ioni. Dato il ruolo biologico del nanoporo, qualsiasi movimento di particelle attraverso di esso altera il voltaggio del canale. Il concetto alla base di questo tipo di sequenziamento, è inserire il DNA a singolo filamento all'interno del poro del α emolisina (α HL). L' α HL è una proteina di 33kD isolata dallo *Staphylococcus aureus*, che viene assemblata per formare un canale transmembrana eptamerico. Questo canale può tollerare un voltaggio fino ai 100mV con una corrente di 100pA (195). Nel sequenziamento Nanopore viene applicato continuamente un flusso ionico, la distribuzione di corrente viene registrata con tecniche elettrofisiologiche. Le letture sono realizzate basandosi sulle differenti dimensioni dei 4 deossiribonucleotidi monofosfato, che provocano una modulazione di corrente caratteristica per ogni dNMP, permettendone così la discriminazione. I vantaggi di questo sistema sono principalmente quattro. Il primo è che raggiunge una lunghezza delle read maggiore di 5000bp con una velocità di 1bp/ns, secondo, la lettura delle basi non richiede l'utilizzo di fluorofori, terzo viene ridotto notevolmente l'utilizzo di enzimi, quarto, invece di sequenziare il filamento di DNA durante la polimerizzazione, il singolo filamento viene sequenziato nel nanoporo mediante depolimerizzazione di questo (figura 7) (193).

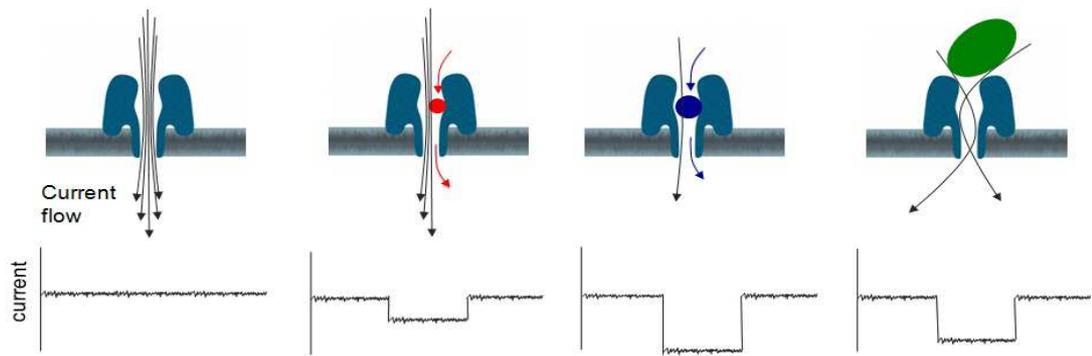


Figura 7: Nanopore.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di individuare alterazioni genetiche causative di epilessia in soggetti che presentano un fenotipo difficilmente correlabile ad uno dei geni per l'epilessia attualmente conosciuti. Per pazienti affetti da epilessia ed in particolare da encefalopatie epilettiche ad esordio precoce (EOEE) i test genetici disponibili, eseguiti mediante metodiche convenzionali (analisi genetica con sequenziamento Sanger), rappresentano un iter diagnostico molto lungo poiché l'estrema eterogeneità genetica si traduce in una frequente sovrapposizione dei fenotipi clinici osservabili nei pazienti, limitando quindi il clinico, nella formulazione di un algoritmo diagnostico-molecolare specifico.

L'utilizzo delle nuove metodiche di Next Generation Sequencing (NGS), applicate allo studio diagnostico di pazienti con una correlazione genotipo-fenotipo non chiara, permette un notevole risparmio sia in termini di costi che di tempo di analisi, offrendo la possibilità di analizzare più geni contemporaneamente.

Nell'ambito di questo studio è stato allestito un pannello contenente 36 geni, appositamente disegnato in modo da permettere di esaminare contemporaneamente le regioni codificanti dei geni associati ad epilessia e in particolare alle encefalopatie epilettiche precoci. Verrà quindi effettuato un sequenziamento massivo parallelo utilizzando la tecnologia *Roche 454-FLX Sequencing platform*, in 157 pazienti con EOEE e fenotipo eterogeneo.

La possibilità di effettuare una precoce e accurata diagnosi molecolare risulta di cruciale importanza per pianificare un protocollo assistenziale ottimizzato per il paziente e per i suoi familiari, permettendo l'accesso a trattamenti terapeutici mirati e ad una consulenza genetica adeguata.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione dei pazienti

Abbiamo sottoposto una coorte di 157 pazienti con un quadro di EOEE e fenotipo eterogeneo, non univocamente riconducibile ad uno dei geni epilessia-associati, all'analisi molecolare tramite NGS. La coorte analizzata include sia pazienti seguiti presso la Neurologia Pediatrica dell'Ospedale Pediatrico Meyer sia afferenti ad altri Istituti, che hanno provveduto ad inviarci un campione di sangue o DNA dei loro pazienti per l'esecuzione delle analisi genetiche. In 64 pazienti su 157 era stato in precedenza eseguito uno screening con tecniche di sequenziamento tradizionali che avevano dato esito negativo. Nei pazienti restanti, poiché il fenotipo non era riconducibile a nessun gene specifico, abbiamo effettuato direttamente il target resequencing dei 36 geni contenuti nel pannello da noi disegnato. Le analisi sono state effettuate su ogni paziente dopo aver ottenuto il consenso informato.

3.2 Estrazione del DNA da sangue

Si effettua un prelievo di sangue venoso di 5-10 ml in EDTA. I campioni devono essere conservati a 2-8 °C o congelati. L'estrazione degli acidi nucleici viene eseguita attraverso lo strumento QIAasympyphony SP (QIAGEN®), progettato per purificare in totale automazione gli acidi nucleici avvalendosi della tecnologia delle particelle magnetiche.

3.3 Determinazione della concentrazione del DNA

La concentrazione e la qualità del DNA ottenuto dal processo di estrazione, vengono valutate attraverso l'utilizzo dello strumento Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific), uno spettrofotometro UV-visibile che consente la misurazione accurata e rapida di piccole quantità di campione (0.5 ul - 2.0 ul),

sfruttando la tensione superficiale per mantenere il campione tra due fibre ottiche. Lo strumento fornisce tre valori: la concentrazione del DNA del campione in analisi, il rapporto A260/A280 e il rapporto A260/A230. La concentrazione del DNA del campione si ricava grazie alla legge di Lambert-Beer che sfrutta l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda specifica di assorbimento del DNA. La purezza e la qualità del DNA vengono rappresentate da i due rapporti 260/280 e 260/230, mostrando possibili contaminazioni con proteine o altre sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici, in quanto le prime assorbono preferibilmente a una lunghezza d'onda di 280nm, mentre le seconde hanno un'assorbanza a 230 nm. I valori consigliabili di questi due rapporti per essere sicuri di una buona qualità del DNA sono 1,8 per il rapporto A260/A280 e un valore sempre maggiore del primo rapporto e compreso tra 2 e 3 per il rapporto A260/A230. Un ulteriore metodo adoperato in questo studio per quantificare il DNA in modo molto più preciso è il sistema LightCycler ®480 (LC480, Roche), uno strumento ad elevata produttività per ogni applicazione in Real-Time PCR, che si distingue anche perché rende possibile una quantificazione diretta del DNA prodotto usando misure di fluorescenza. Questa quantificazione prevede tre passaggi principali: la preparazione della retta standard mediante diluizioni seriali, la preparazione dei DNA campione e la quantificazione con LC480. Per la preparazione della retta standard viene utilizzato il buffer TE 1X e trasferito in otto tubini da 1,5 ul numerati da 1 a 8, in questo modo: nel tubino 1, 594 ul, e dal tubino 2 a 8, 300 ul. In seguito viene aggiunto al primo tubino 6 ul di DNA standard (100 ng/ul) fornito nel kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit e vortexato per 10 secondi, si procede con il trasferimento di 300ul dal tubino 1 al 2, dal 2 al tre e così via fino al tubino 7, in quanto l'altro tubino rappresenta il bianco. La concentrazione dei campioni di DNA deve essere compresa tra 0,25 e 1 ng/ul, quindi vengono diluiti opportunamente con TE 1X, in modo che la loro fluorescenza sia all'interno del range di linearità della retta standard. Ultimo passaggio della quantificazione è la preparazione della piastra che verrà inserita nel LC 480. Vengono trasferiti 50ul dei rispettivi tubini della curva nella prima fila della piastra, 50ul di Quant-iT™ PicoGreen®, diluito precedentemente con una diluizione 1:200 e mescolato con i 50 ul di DNA dei campioni inseriti nei rispettivi pozzetti. La piastra viene sigillata con una pellicola apposta e inserita nello strumento, che effettuerà 5 letture per

campione fornendo delle misurazioni medie per campione. I dati verranno analizzati con un foglio di calcolo Excel controllando che il valore R2 della retta standard sia maggiore di 0,98 e che tutti i valori di fluorescenza dei campioni siano compresi nel range di linearità della retta.

3.3 Analisi molecolare mediante sistema Roche/454

Questa tecnica prevede 6 fasi principali:

1. Selezione geni target
2. Preparazione libraries
3. Ibridazione
4. EmPCR: amplificazione clonale in emulsione
5. Sequenziamento con GS FLX Titanium 454 Roche
6. Analisi dei dati

3.3.1 Selezione geni target

L'analisi tramite Next Generation Sequencing verrà effettuata utilizzando un pannello appositamente disegnato, calcolando le coordinate di start e stop dei geni selezionati, con i rispettivi cromosomi, tramite la sezione Tables di UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables?command=start>), inviando in seguito il file ottenuto alla Nimblegen® Roche, in modo da permettere di esaminare le regioni codificanti dei geni associati ad epilessia e in particolare alle encefalopatie epilettiche precoci (EOEEs). Durante la prima parte dello studio sono stati selezionati 36 geni per il pannello, fra i geni analizzati sono compresi i principali geni associati a EOEEs fino ad allora riportati in letteratura: *SCN1A*, *CDKL5*, *MECP2*, *SCN2A*, *FOXP1*, *ARX*, *PCDH19*, *STXBP1* e *GABRG2*. Oltre a questi è stato inserito anche un gene che recentemente è stato associato ad una forma di encefalopatia epilettica infantile refrattaria al

trattamento farmacologico, la sindrome di deficienza da GLUT1, questa forma è dovuta ad un trasporto deficitario del glucosio ed è correlata a mutazioni o delezioni/duplicazioni del gene *SLC2A1*. Inoltre verranno analizzati anche i geni *ALDH7A1* e *PNPO* responsabili delle encefalopatie piridossina e piridossal fosfato (PLP) dipendenti, due forme di epilessia molto grave, che solitamente si presentano nelle prime ore di vita e sono insensibili alle terapie standard, ma rispondono alla somministrazione immediata della piridossina (Vitamina B6) o del PLP. Sono stati inoltre inseriti nel pannello ulteriori geni (*ATP1A2*, *CACNA1A* e *KCNK18*) responsabili di diversi quadri di emicranie genetiche. Nella tabella 5 è riportato l'elenco dei geni analizzati.

Tabella 5: Geni analizzati con analisi NGS.

GENE	LOCUS	NOME	FUNZIONE	FENOTIPO
<i>ALDH7A1</i>	5q23.2	Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	Proteina coinvolta nel catabolismo della lisina	Crisi piridossina-dipendenti
<i>ARHGEF9</i>	Xq11.1-q11.2	Rho guanine nucleotide exchange factor 9	Fattore di scambio del nucleotide guanina cervello specifico	EOEE 8
<i>ARX</i>	Xp21.3	Aristaless-related homeobox	Fattore di trascrizione con ruolo cruciale nello sviluppo del SNC	EOEE 1
<i>ATP1A2</i>	1q23.2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, α -2 polipeptide	Subunità α catalitica della Na ⁺ /K ⁺ ATPasi	-Emicrania emiplegica familiare -Emiplegia alternante dell'infanzia
<i>CACNA1A</i>	19p13.2	Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha-1A subunit	Subunità formante il poro del canale del Ca ²⁺ voltaggio-dipendente	-Emicrania emiplegica familiare -Atassia episodica -Atassia spinocerebellare
<i>CDKL5</i>	Xp22.13	Cyclin dependent kinase-like 5	Proteina con attività chinasi e di autofosforilazione (STK9)	EOEE2
<i>CNTNAP2</i>	7q35-q36	Contactin associated protein-like 2	Proteina transmembrana neuronale della superfamiglia delle neurexine coinvolte nelle interazioni neuroni-glia e nel clustering dei canali	-Sindrome displasia corticale ed epilessia focale -Sindrome Pitt-Hopkins like 1 (grave ritardo mentale, crisi)
<i>EFHC1</i>	6p12.2	EF-hand domain (c-terminal)-containing protein 1	Proteina coinvolta nell'omeostasi del Ca ²⁺	-Epilessia mioclonica giovanile -Epilessia assenze dell'adolescente
<i>FOXG1</i>	14q12	Forkhead box G1	Fattore di trascrizione con attività di repressore	Sindrome di Rett

			coinvolto nello sviluppo cerebrale	
GABRG2	5q34	Gamma aminobutyric acid receptor, γ 2	Subunità γ 2 del recettore GABA _A coinvolto nella trasmissione nel SNC	-Epilessia generalizzata con crisi febbrili plus -Convulsioni febbrili familiari -Suscettibilità all'epilessia assenza infantile
GRIN2A	16p13.2	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D aspartate, subunit 2 α	Subunità 2 α di un canale ionico attivato dal glutammato nelle sinapsi eccitatorie cerebrali	-Epilessia focale con disordini del linguaggio con o senza ritardo mentale
GRIN2B	12p13.1	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D aspartate, subunit 2 β	Subunità 2 β di un canale ionico attivato dal glutammato nelle sinapsi eccitatorie cerebrali	-Ritardo mentale con o senza epilessia -Autismo
KCNJ10	1q23.2	Potassium channel, inwardly rectifying, subfamily j, member 10 (Kir4.1)	Membro della famiglia dei canali del K ⁺ espresso nelle cellule gliali del SNC	-Sindrome SESAME (crisi epilettiche, sordità neurosensoriale, atassia, ritardo mentale, squilibri elettrolitici) -Sordità autosomica recessiva
KCNJ16	17q24.3	Potassium channel, inwardly rectifying, subfamily j, member 16 (Kir5.1)	Membro della famiglia Kir, si assembla con Kir4.1 o Kir4.2 per formare canali funzionali	Regolazione del bilancio idroelettrolitico in rene e pancreas
KCNK18	10q25.3	Potassium channel, subfamily k, member 18	Membro della famiglia dei canali del K ⁺ che regola varie funzioni cellulari, tra cui il potenziale di membrana a riposo e l'eccitabilità	Emicrania con o senza aura, autosomica dominante
KCNQ2	20q13.33	Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 2	Canale del potassio voltaggio-dipendente, espresso a livello cerebrale	EOEE 7
MAGI2	7q21.11	Membrane associated guanylate kinase, ww and pdz domains containing, 2	Proteina con attività guanilato chinasi	Spasmi infantili e ritardo mentale
MECP2	Xq28	Methyl-CpGbinding protein 2	Proteina regolatrice della trascrizione	-Sindrome di Rett -Ritardo mentale sindromico X-linked -Encefalopatia neonatale severa
MEF2C	5q14.3	Mads box transcription enhancer factor 2, polipeptide	Fattore di trascrizione con ruolo fondamentale nella miogenesi e nella neurogenesi	Ritardo mentale, movimenti stereotipati, epilessia e/o malformazioni cerebrali

NRXN1	2p16.3	Neurexin I	Recettore della superficie cellulare coinvolto nella neurotrasmissione e nella formazione dei contatti sinaptici	-Sindrome Pitt-Hopkins like autosomica recessiva -Suscettibilità all'autismo
PCDH19	Xq22.1	Protocadherin 19	Proteina della famiglia delle caderine coinvolta nell'instaurazione delle connessioni neuronali e nel segnale di trasduzione alle membrane sinaptiche del SNC	EOEE 9
PLCB1	20p12.3	Phospholipase C, β 1	Proteina presente nel nucleo con funzione di controllo del ciclo cellulare	EOEE 12
PNKP	19q13.33	Polynucleotide kinase 3-prime phosphatase	Proteina coinvolta nei meccanismi di riparazione del DNA	EOEE 10
PNPO	17q21.32	Pyridoxamine 5-prime-phosphate oxidase	Enzima implicato nella regolazione della sintesi della vit. B6	Crisi piridossal fosfato-dipendenti
POLG	15q26.1	Polymerase, DNA, gamma	Subunità catalitica della DNA polimerasi mitocondriale	-Sindrome di Alpers -Sindrome PEO -Sindrome MNGIE -Sindrome SANDO
SCN1A	2q24.3	Sodium channel, neuronal type I, α subunit	Subunità α formante il poro del canale del Na^+ voltaggio-dipendente, tipo I	EOEE 6
SCN1B	19q13.12	Sodium channel, voltage-gated, type I, β subunit	Subunità β del canale del Na^+ voltaggio-dipendente, tipo I, necessaria per la normale cinetica di inattivazione	-Epilessia generalizzata con crisi febbrili plus (GEFS+) -Sindrome di Brugada -Difetti di conduzione cardiaca
SCN2A	2q24.3	Sodium channel, voltage-gated, type II, α subunit	Subunità α del canale del Na^+ voltaggio-dipendente, tipo II	EOEE 11
SCN9A	2q24.3	Sodium channel, voltage-gated, type IX, α subunit	Subunità α del canale del Na^+ voltaggio-dipendente, tipo IX	-Epilessia generalizzata con crisi febbrili plus -Convulsioni febbrili familiari -Neuropatia
SCNM1	1q21.3	Sodium channel modifier 1	Proteina zinc finger che funziona come fattore di splicing	Modificatore genetico del fenotipo legato a mutazioni di <i>SCN8A</i> (nel modello animale)
SLC25A22	11p15.5	Solute carrier family 25 (mitochondrial	Trasportatore mitocondriale	EOEE 3

		carrier, glutamate) member 22	glutammato/H ⁺	
SLC2A1	1p34.2	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Trasportatore del glucosio attraverso la barriera ematoencefalica (GLUT 1)	Sindrome da deficit di GLUT 1
SLC9A6	Xq26.3	Solute carrier family 9, member 6	Scambiatore Na ⁺ /H ⁺ (NHE), coinvolto nel controllo di processi cellulari essenziali (pH intracellulare, mantenimento del volume cellulare, riassorbimento del Na ⁺)	Ritardo mentale X- linked, Christianson type
SPTAN1	9q34.11	Spectrin, α nonerythrocytic 1	Proteina del citoscheletro che regola il legame ai recettori e il crosslinking	EOEE 5
STXBP1	9q34.11	Syntaxin-binding protein 1	Proteina implicata nel rilascio e nella secrezione del neurotrasmettitore dalle vescicole sinaitiche	EOEE 4
UBE3A	15q11.2	Ubiquitin-protein ligase E3A	Proteina ligasi coinvolta nella degradazione dell'ubiquitina	Sindrome di Angelman

3.3.2 Preparazione delle libraries

Per ogni campione di DNA è stata costruita una libreria di frammenti, seguendo il protocollo Rapid Library Preparation Method Manual GS FLX Titanium Series 454 Roche. La concentrazione e la qualità di ogni campione è stata analizzata mediante NanodropTm 2000 (Thermo scientific) e Quant-it PicoGreen dsDNA Assay Kit:

- Rapporto A260/280 > 1,80
- Concentrazione > 5ng/ul

La costruzione della libreria prevede 6 passaggi principali (Figura 8):

1. DNA fragment By Nebulization: Frammentazione del DNA [500ng] tramite nebulizzazione con azoto ad alta pressione (2,1 bar/min) per ottenere frammenti di DNA delle dimensioni di 400-1000bp. Alla fine del processo i campioni vengono purificati mediante Qiagen MinElute PCR Purification Kit per eliminare tutti i frammenti troppo piccoli.

2. Fragment end Repair: Dal momento che la nebulizzazione produce frammenti con estremità rovinata, queste vengono riparate utilizzando una specifica End Repair mix, seguita da un apposito ciclo al termociclatore.

3. Adaptor-Ligation: Ad ogni campione viene aggiunto 1ul di Rapid Library MID Adaptors, i quali si legano alle due estremità di ogni frammento di DNA. Ogni adattatore consiste in una coppia di oligonucleotidi a doppio filamento: un adattatore A ed un adattatore B con sequenze complementari a quelle dei primers di amplificazione e sequenziamento. L'adattatore B (in rosso nella figura 8) contiene Biotina al 5' che permette il legame del DNA alle biglie rivestite di streptavidina. Inoltre ogni adattatore al 3' contiene una Key region, ovvero una regione di 4 basi non palindromica, indispensabile per la verifica della qualità della reazione di sequenza, seguita da una regione di 11 nucleotidi, disegnata in modo tale che più librerie possano essere sequenziate assieme (multiplexing). Per questo ad ogni campione viene associato un RL MID diverso. Grazie al multiplexing, ogni esperimento ha permesso di analizzare 12 pazienti per ogni esperimento. Dalla reazione di ligazione si possono generare 3 diverse popolazioni di frammenti: A-B che si legano alla biglia con un solo filamento, B-B che si legano con tutti e due i filamenti e A-A che non si legano perché mancano di biotina e vengono persi con il lavaggio. Si effettua la selezione dei frammenti A/B tramite purificazione con la streptavidina.

4. Small Fragment Removal: Successivamente i frammenti sono stati selezionati per lunghezza mediante il sistema AMPure Beads, in maniera tale da rimuovere i frammenti troppo piccoli, i dimeri di primers e gli adattatori.

5. Libraries Quality assessment: È stata determinata la concentrazione e qualità dei frammenti mediante il sistema Nanodrop™ 2000 (Thermo scientific) e Qiant- iT PicoGreen dsDNA Assay Kit e la dimensione dei frammenti attraverso i sistemi Agilent 2100 BioAnalyzer®. La quantità totale di una libreria dovrebbe essere di almeno $7,3 \times 10^9$ molecole, che corrisponde a una concentrazione di $1,46 \times 10^8$ mol/ul. Indici di buona qualità sono:

- lunghezza dei frammenti tra 600-900 bp
- < del 10% di frammenti al di sotto dei 350bp.

6. Pre-Capture Libraries amplification by LM-PCR: Successivamente ogni libreria di DNA è stata amplificata seguendo il protocollo NimbleGen sequence Capture assays (pre-capture Library Amplification by LM-PCR). La libreria pre-capture è poi purificata tramite Qiaquick PCR Purification Kit column. L'amplificato ottenuto è nuovamente valutato mediante il Nanodrop™ 2000 (Thermo scientific) e l'Agilent 2100 BioAnalyzer®. Indici di buona qualità sono:

- Concentrazione maggiore di [2,5 ug]
- Grandezza frammenti di dimensioni comprese tra 600-900bp

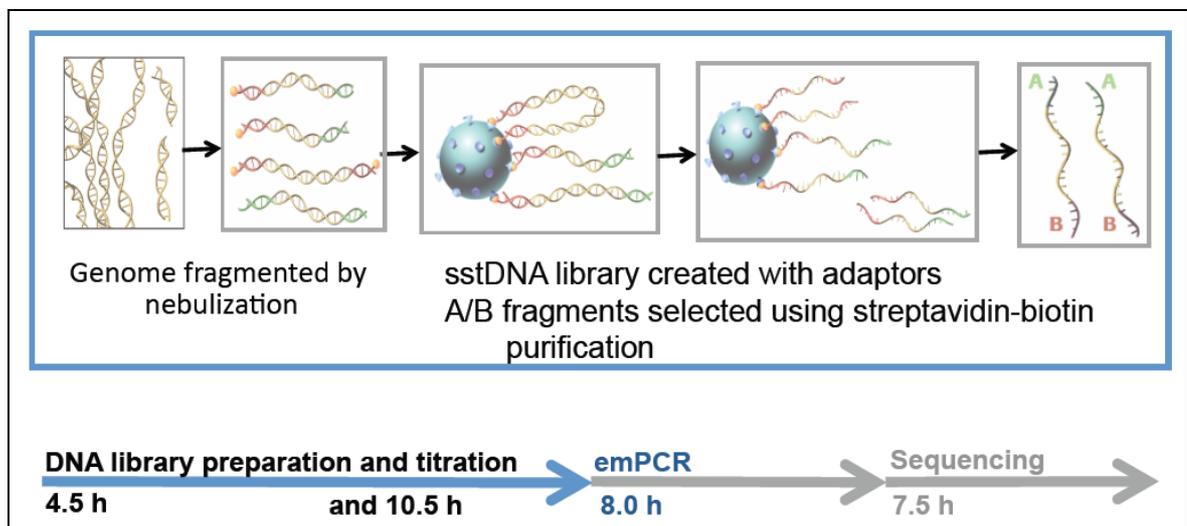


Figura 8: Preparazione e ibridazione delle libraries.

3.3.3 Ibridazione delle libraries

Durante questa fase si ha la "cattura" delle regioni specifiche d'interesse del DNA genomico utilizzando le sonde. Il pool di libraries viene ibridato con le sonde SeqCap EZ Choice Library, disegnate per catturare i geni del pannello. In questa fase è stato seguito il protocollo NimbleGene SeqCap EZ libraries and GS FLX Titanium Rapid MID- tagged sample libraries. Per la reazione di ibridazione è importante conoscere la concentrazione di ogni libreria, in quanto si può ibridare al massimo 1ug del pool finale delle librerie. La libreria post-capture è poi purificata tramite Qiaquick PCR Purification Kit column. Anche dopo questo passaggio dell'amplificato ottenuto ne va valutata la concentrazione al Nanodrop™ 2000 (Thermo scientific), che deve essere maggiore di 1ug, e la dimensione dei frammenti con Agilent 2100 BioAnalyzer, che deve essere compresa tra 500-1500bp.

3.3.4 emPCR: amplificazione clonale in emulsione

Il protocollo seguito durante questa fase è emPCR Method Manual-Lib-LVGS FLX Titanium Series. La libreria di single strand DNA funge da template per la PCR in emulsione. Questa permette di amplificare all'interno della stessa provetta ma in maniera fisicamente separata una grande quantità di frammenti di DNA. Per Questo passaggio vengono utilizzate apposite biglie sulla cui superficie sono presenti sequenze oligonucleotidiche complementari all'adattatore B dei single strand (sstDNA). I frammenti della libreria vengono mescolati con un eccesso di biglie in modo tale che ogni biglia si legherà ad un solo frammento di sstDNA. L'emulsione viene creata mescolando opportunamente la mix di PCR con olio minerale; si creano così delle micelle di pochi ul di mix di PCR in emulsione nell'olio: ogni micella contenente una biglia si comporta da micro reattore. Alla fine sulla superficie della biglia saranno presenti fino a 10 milioni di copie del frammento. Così facendo si può ottenere l'amplificazione di uno specifico frammento senza la necessità di effettuare clonaggio in batteri, infatti l'intera collezione di frammenti viene amplificata contemporaneamente in una stessa provetta. Successivamente saranno purificate tutte le biglie "produttive" ovvero quelle che effettivamente hanno legato il frammento di sstDNA e che sono andate incontro ad amplificazione (Figura 9).

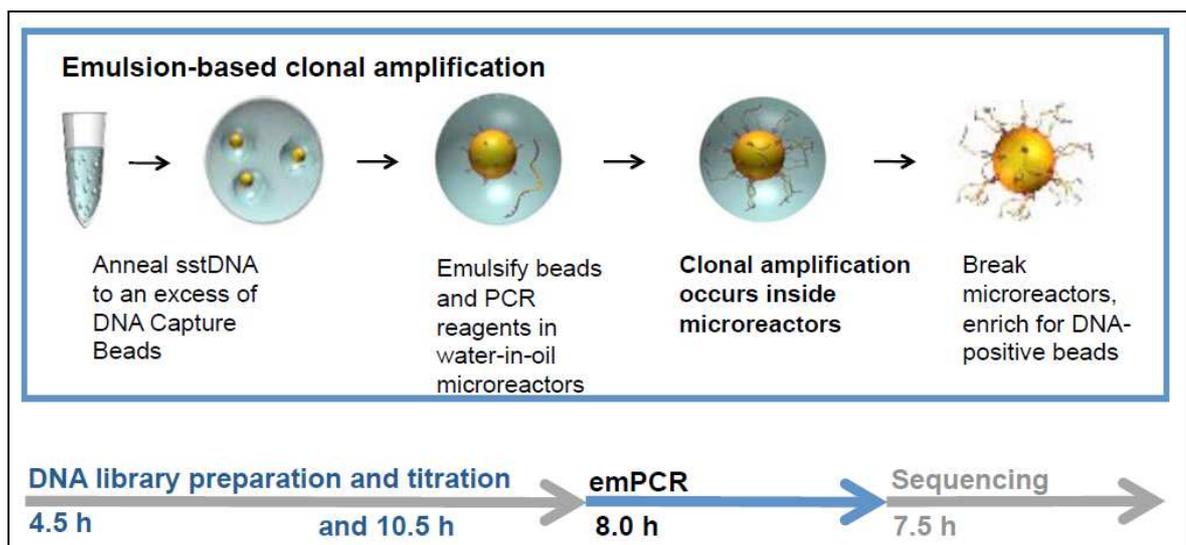
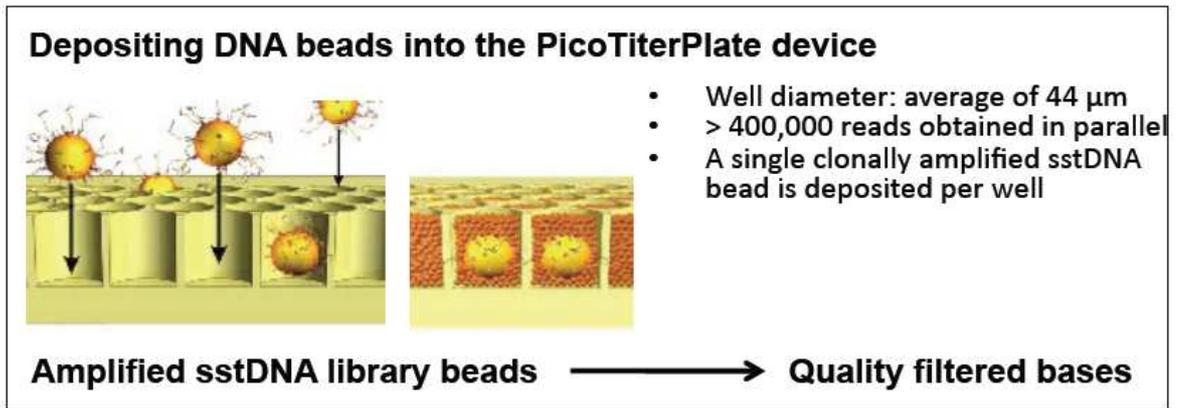


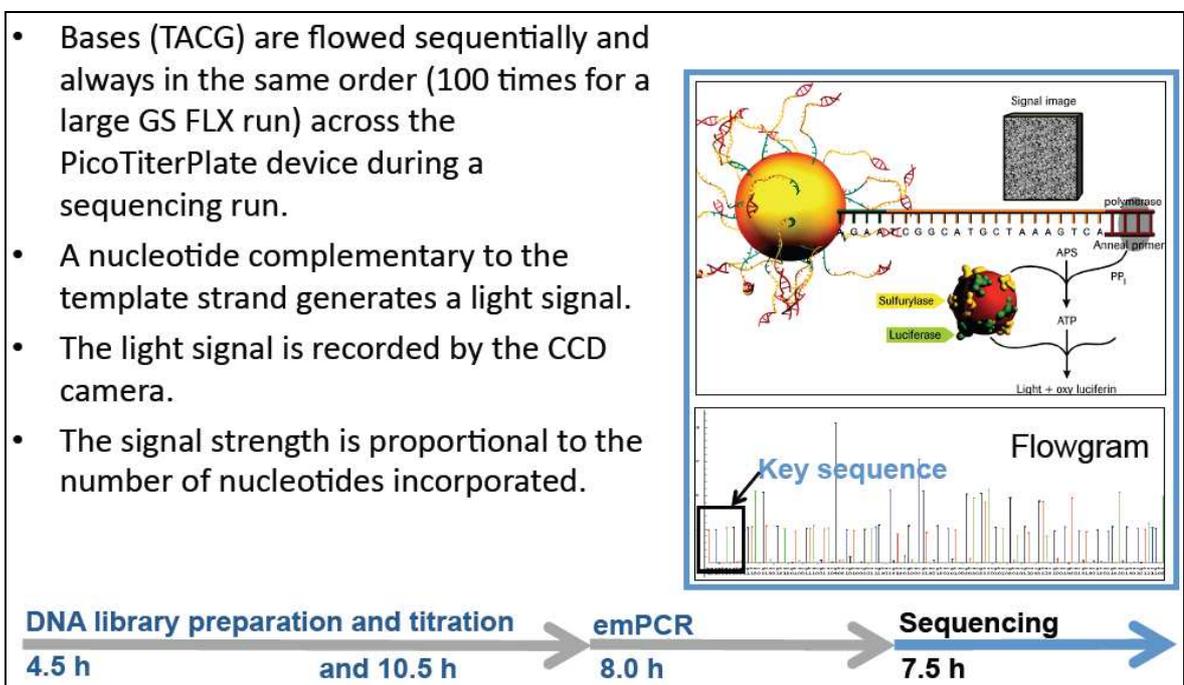
Figura 9: PCR in emulsione.

3.3.5 Sequenziamento con GS FLX Titanium 454 Roche

La fase di sequenziamento prevede in primo luogo il lavaggio del PicoTiterPlate (PTP), il supporto su cui avverrà la reazione, mediante l'utilizzo di buffers appositi, e a seguire la preparazione dei vari strati che andranno posizionati su di esso. Le biglie di DNA arricchite dopo la emPCR vengono quindi trasferite successivamente nella piastra PTP. In sintesi, a seguito della preparazione dei reagenti, in ogni pozzetto verrà caricata una biglia di DNA assieme agli enzimi necessari per la reazione di sequenziamento (Figura 10a). Insieme alle biglie contenenti il DNA da sequenziare, sono contenute le biglie di controllo, le quali serviranno per il controllo interno della reazione di sequenziamento. La piastra PTP così caricata verrà infine posizionata sullo strumento, il quale è dotato di una camera CCD che registrerà i segnali luminosi scaturiti dalle reazioni di pirosequenziamento. Nello strumento è presente una camera di flusso che fa fluire i deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) perpendicolarmente ai pozzetti della PTP, sequenzialmente in ordine prefissato (TACG). Ogniqualvolta avviene l'incorporazione di un nucleotide in un pozzetto si ha un'emissione luminosa che passa attraverso il fondo dei pozzetti e viene catturata dalla CCD camera. Le reazioni che avvengono in ogni pozzetto della PTP vengono rilevate e registrate in continuo ed in contemporanea per tutti i pozzetti. Ciascun flusso (passaggio di un nucleotide) viene quindi tradotto in immagine. L'analisi delle immagini associata all'ordine dei flussi permette di costruire il flowgram di ciascun pozzetto. In altre parole, durante il flusso di T, ci sono pozzetti in cui la T, risultando complementare, viene incorporata; di conseguenza la reazione di pirosequenziamento emetterà una luce che viene registrata dalla CCD camera (Figura 10b). A questo seguirà il flusso di A, C e G che generano a loro volta le rispettive immagini. Infine, il software elabora tutte le immagini e converte i dati grezzi in un flowgram in cui l'intensità della luce emessa è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.



(a) Schematizzazione della fase in cui in ogni pozzetto viene caricata una biglia di DNA assieme agli enzimi necessari per la reazione di sequenziamento.



(b) Sequenziamento.

Figura 11: Schematizzazione della procedura del sequenziamento con GS FLX Titanium 454 Roche.

3.3.6 Analisi dei dati

L'analisi bioinformatica è uno step essenziale nella tecnologia Next Generation, ed avviene a più livelli. Si può procedere all'analisi della run di sequenziamento, attraverso il software proprietario GS Run Browser. Inizialmente si valuta il valore di raw wells, che rappresenta il numero di wells che hanno alloro interno una bead, e quello di key pass wells, che ci dice quante delle raw wells sono state riconosciute attraverso la key region

presente a livello dell'adattatore; sono indici di buona qualità un valore di raw wells pari a circa il 50% del numero di biglie caricate, ed un valore di key pass wells che sia circa il 90% delle raw wells. Altri parametri di qualità della run sono la percentuale di passed filter wells, ovvero la percentuale di letture che hanno passato tutti i filtri, la quale deve essere maggiore del 50% , ed il valore di mixed + dots key pass, che esprime il numero di letture scartate per bassa qualità che deve essere inferiore al 25% . Da questa prima analisi si ottiene anche indicazione sulla lunghezza media, in bp, delle letture, ed è possibile visualizzare il segnale emesso dalla PTP ed anche il flowgram di ogni singolo pozzetto (Figura 11). L'efficienza del processo di target capture viene valutata tramite il mapping delle reads ottenute sul target. Le sequenze che mappano sul target vengono definite "in target", mentre quelle che non mappano su questo "off target". Con un esperimento ottimale si ottengono valori prossimi all' 80% in termini di reads "in target". Per ogni campione è stato valutato il numero totale di letture, il numero totale di basi lette, la lunghezza media dei frammenti e la profondità media del sequenziamento. Dopo aver valutato la qualità della corsa di sequenziamento, si procede con l'analisi dei file SFF. In particolare, avendo lavorato su due regioni 70X75mmsi ottengono due file SFF corrispondenti alle singole regioni. I file SFF vengono demultiplexati utilizzando il comando sffile -s per ritrovare le sequenze relative ai singoli pazienti di cui è stata sequenziata la library. Questa fase è possibile grazie all'utilizzo dei MIDs utilizzati come barcode per la creazione delle libraries paziente-specifiche. I file che vengono ottenuti dopo il demultiplexing possono essere correlati al paziente in quanto presentano un prefisso relativo all'adattatore MID utilizzato (ex. RL10.454.sff) ma non presentano più gli adattatori, la sequenza MID e la key specifica della rapid library in quanto queste sequenze vengono riconosciute da sffile e sottoposte a trimming. L'allineamento e il call delle varianti presenti in ogni singolo file SFF demultiplexato, avviene grazie al tool GS Reference Mapper (GS Mapper) che altro non è che un'interfaccia GUI (Graphic User Interface) dell'algoritmo newbler sviluppato da Roche. I parametri passati in ingresso al GS Mapper sono divisi in diverse sezioni e in particolare:

a) per la sezione Project:

1. References: tutti i cromosomi in formato FASTA relativi all'assembly Hg19 (GCHR37)
2. GS reads: il file SFF con le sequenze relative al paziente da analizzare (ex. RL10.454.sff)

b) per la sezione Parameters-Input:

1. Genome Annotation: il file RefGene relativo all' assembly utilizzato (ex. Hg19)
2. Known SNPs: il file relativo alla build dbSNP con cui annotare gli SNP (ex. dbSNP131)

c) per la sezione Parameters-Computation:

1. parametri di default

c) per la sezione Parameters-Output:

1. Alignment Info: full output (il file 454AlignmentInfo.tsv viene utilizzato in diversi script per l'analisi dati)

In breve, all'avvio dell'analisi il tool allinea le reads al genoma di riferimento (Hg19) e poi procede con il call delle varianti e con l'annotazione delle stesse utilizzando RefGene e dbSNP. Al termine dell'analisi, si ottengono in uscita le varianti ad alta confidenza (identificate in almeno due reads) che sono contenute all'interno del file 454HCDiffs.txt.

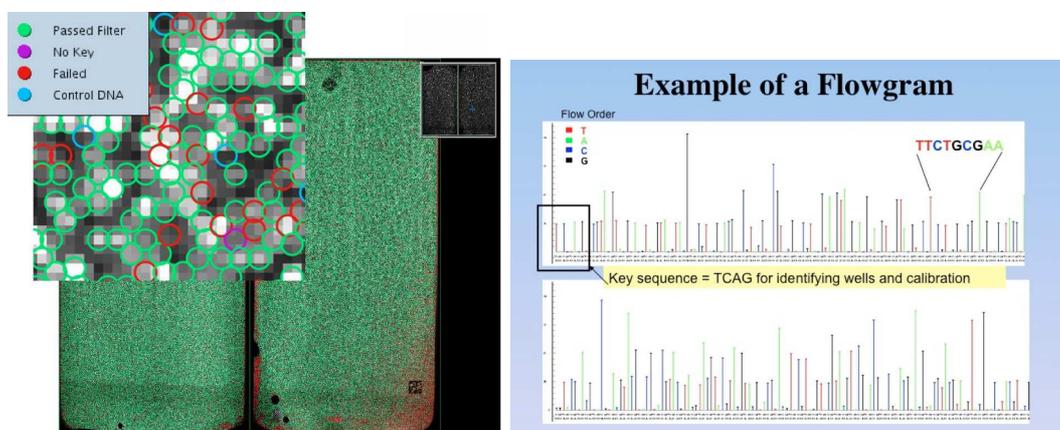


Figura 11: segnale emesso dalla PTP ed esempio di flowgram.

Valutazione delle SNVs e delle INDELS. Per avere un'annotazione più accurata delle varianti e per ottenere le frequenze alleliche relative alle varianti e anche le predizioni bioinformatiche sul potenziale impatto delle stesse, si procede con l'analisi del dato ottenuto con il software proprietario attraverso ANNOVAR (utilizzando l'interfaccia web wANNOVAR - <http://wannovar.usc.edu/>). Per far questo, il file 454HCDiffs.txt viene convertito nel formato ANNOVAR che richiede un formato |cromosoma| |start| |stop| |reference| |alternative|. Il risultato dell'elaborazione di ANNOVAR, viene filtrato utilizzando la localizzazione delle varianti e la relativa frequenza allelica. In particolare, vengono rimosse tutte le varianti localizzate negli introni e nel 5' e 3' UTR. Le varianti rimanenti (esoniche o nei siti canonici di splicing) vengono ulteriormente filtrate per frequenza allelica, eliminando tutte quelle che presentano una frequenza maggiore allo 0.01 (1%) in ESP6500-ALL (EA+AAL) o maggiore allo 0.01 (1%) in 1000g2012feb-ALL. ESP6500-ALL (EA+AAL) è un database che ha l'obiettivo di scoprire nuovi geni e i meccanismi che contribuiscono a malattie del cuore, del polmone e del sangue tramite l'applicazione pionieristica delle tecniche di NGS nelle regioni codificanti proteine nel genoma umano. Condivide tutti i dati raccolti con l'intera comunità scientifica per aumentare ed estendere le possibilità di diagnosi delle malattie. ESP6500-ALL (EA+AAL) considerando i geni coinvolti nelle malattie del cuore, polmone e sangue per noi risulta molto utile come controllo per l'analisi dei geni coinvolti nell'epilessia. 1000g2012feb-ALL è un database che ha l'obiettivo di trovare più varianti genetiche possibili con una frequenza minore del 1% nella popolazione studiata. È il primo progetto nato per sequenziare il genoma di un grande numero di persone, per fornire una risorsa completa delle varianti genetiche umane. Un riassunto sul flusso di filtraggio delle varianti effettuato da ANNOVAR è riportato nella figura 12.

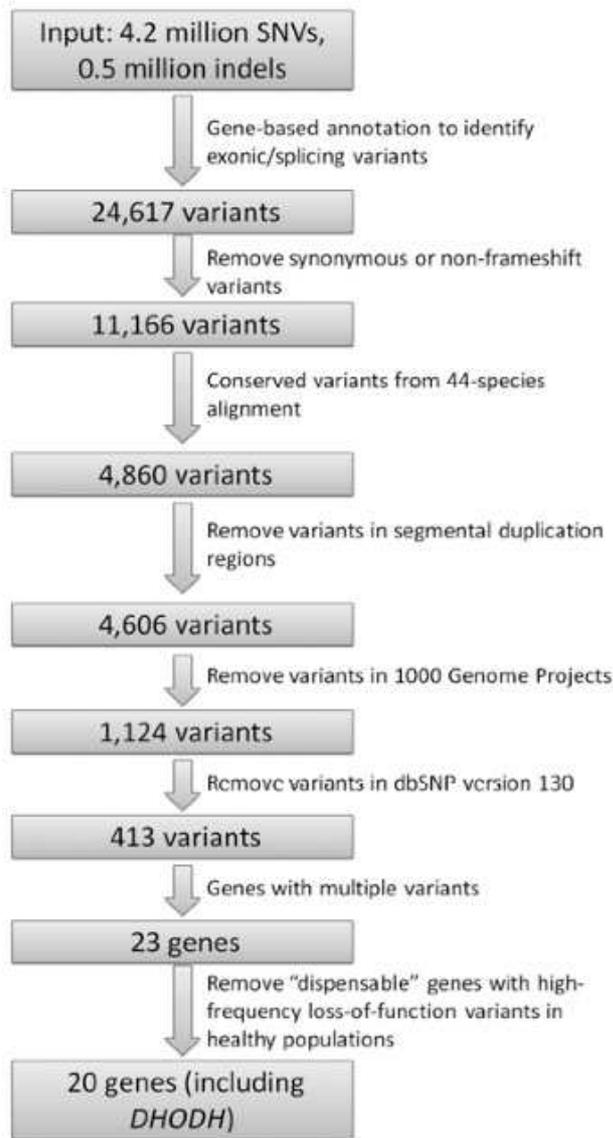


Figura 12: Esempio di flusso di filtraggio delle varianti effettuato dal software ANNOVAR.

Valutazione migliorata dello splicing. Per avere una maggiore attenzione verso le potenziali varianti di splicing, utilizziamo uno script PERL sviluppato in house, capace di analizzare varianti di splicing localizzate entro una distanza n dal sito canonico di splicing. Lo script utilizza il file 454AlignmentInfo.tsv e il file RefGene per incrociare le coordinate dei geni e in particolare degli start e stop esonici con la posizione delle varianti identificate. Impostando quindi un parametro n pari a 15, vengono evidenziate tutte le varianti comprese tra -15 e +15 dai siti canonici di splicing. Lo script è mostrato in figura 13.

```

#!/usr/bin/perl
#####
# Cerca mutazione nella regione del sito di splicing #
#####
# dist1 profondità di analisi della giunzione esone-introne ex. 5 significa che analizzo le varianti presenti tra -5 e +5 dall'esone
# dist2 distanza della variante dall'esone
$input=shift;
# File 454HCDiffs.txt o 454AllDiffs.txt (Solo tabella con statistiche)
if ($input!~/Diffs.txt/) {
    print "Command Error. Type: perl SpliceSite.pl 454HCDiffs.txt or 454AllDiffs.txt\n";
    exit;
}
print "il file refGene_Hg19.txt esiste on /DATABASE/? (si o no)\n";
$opz=<STDIN>;
chop $opz;
print "Inserire la distanza desiderata dall'esone \n";
$dist1=<STDIN>;
chop $dist1;
print "File di output?\n";
$file_output=<STDIN>;
chop $file_output;
if ($opz ne si) {
    print "metti il file in /DATABASE/RefGene/\n";
    exit;
}
open in, "/DATABASE/RefGene/refGene_Hg19.txt";

while ($line=<in>) {
    @a=split(/\s+/, $line);
    $cinque{$a[12]}=$a[9]; # Carico tutti gli start esonici
    $tre{$a[12]}=$a[10]; # Carico tutti gli end esonici
}
close in;

open in, "$input";
open OUTPUT, ">$file_output.splisit.analysis.at.$dist1";
while ($li=<in>) {
    @b=split(/\t/, $li);
    $c=$cinque{$b[10]}; # Divido tutti gli start esonici del gene specifico della mutazione
    $d=$tre{$b[10]}; # Divido tutti gli end esonici del gene specifico della mutazione
    @e=split(/\./, $c);
    @f=split(/\./, $d);
    foreach $x (@e) {
        if ($b[1]>=($x - $dist1) && $b[1]<$x) { # Incrocio la posizione della mutazione con start e end esonico
            $dist2 = ($b[1] - $x)-1;
            print OUTPUT "$dist2\t$li";
        }
    }
    foreach $xx (@f) {
        if ($b[1]<=($xx + $dist1) && $b[1]>$xx) {
            $dist2 = ($b[1] - $xx);
            print OUTPUT "$dist2\t$li";
        }
    }
}
}
}

```

Figura 13: Esempio di script PERL utilizzato per analizzare le varianti di splicing.

Valutazione del coverage nelle regioni target. Il processo di cattura e di sequenziamento è abbastanza omogeneo ma presenta una variabilità intrinseca legata alle molte variabili presenti nella fase di cattura delle regioni target e del relativo sequenziamento. Questa variabilità deve essere controllata e si riflette in variazioni delle profondità di lettura del target. Abbiamo quindi la necessità di verificare come è stato sequenziato ogni singolo paziente e per far questo abbiamo sviluppato in house uno script PERL. I parametri passati allo script includono le coordinate del nostro target in formato GFF, la profondità minima accetta (per la quale il target viene considerato coperto dal sequenziamento) e il file 454AlignmentInfo.tsv. Lo script genera una serie di file tra cui il file uncovered.cov che contiene l'elenco delle posizioni cromosomiche, il nome del gene, e i relativi esoni che non hanno raggiunto il coverage minimo desiderato. Un esempio del file uncovered.cov è riportato in figura 14. Queste regioni non catturate o

scarsamente sequenziate possono essere integrate mediante sequenziamento canonico di tipo Sanger qualora il clinico ritenga opportuna l'integrazione in quanto il fenotipo osservato ne suggeriva la necessità.

Chr	Start	End	% basi coperte	N° basi coperte	N° basi totali	N° basi non coperte	Gene e esone
chr1	43424263	43424363	0		101	101	ID= <i>SLC2A1</i> Exon 1
chr2	50573828	50574087	40	104	260	156	ID= <i>NRXN1</i> Exon 18
chr5	161529559	161529679	0		121	121	ID= <i>GABRG2</i> Exon 6
chr7	77648631	77649293	0		663	663	ID= <i>MAGI2</i> Exon 22
chr9	130374650	130374751	0		102	102	ID= <i>STXBP1</i> Exon 1
chr10	92661999	92662101	0		103	103	ID= <i>RPP30</i> Exon 12
chr14	29236485	29237955	66	977	1471	494	ID= <i>FOXG1</i> Exon 1
chr15	89876326	89876985	78	517	660	143	ID= <i>POLG</i> Exon 1
chr19	13318126	13318867	0		742	742	ID= <i>CACNA1A</i> Exon 47
chr19	13319569	13319823	56	143	255	112	ID= <i>CACNA1A</i> Exon 46
chr19	13409357	13410167	47	388	811	423	ID= <i>CACNA1A</i> Exon 19
chr19	13616745	13617038	61	182	294	112	ID= <i>CACNA1A</i> Exon 1
chr19	35521694	35521794	0		101	101	ID= <i>SCN1B</i> Exon 1
chr20	62037996	62038728	30	227	733	506	ID= <i>KCNQ2</i> Exon 17
chr20	62103520	62103816	0		297	297	ID= <i>KCNQ2</i> Exon 1
chrX	18582569	18582669	49	50	101	51	ID= <i>CDKL5</i> Exon 4
chrX	25022786	25023027	0		242	242	ID= <i>ARX</i> Exon 5
chrX	25025227	25025556	3	13	330	317	ID= <i>ARX</i> Exon 4
chrX	25031038	25031915	48	429	878	449	ID= <i>ARX</i> Exon 2
chrX	135067661	135067986	84	274	326	52	ID= <i>SLC9A6</i> Exon 1

Figura 13: Esempio del file uncoverd.cov.

3.4 Analisi delle varianti con potenziale ruolo causativo

Una volta identificate le varianti con possibile ruolo causativo mediante NGS, è stata effettuata la conferma mediante sequenziamento Sanger. Le varianti che risultano confermate, sono state cercate nei genitori con la stessa metodica. Tale analisi è stata effettuata mediante amplificazione degli esoni e delle regioni introniche fiancheggianti. La PCR è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Infatti la PCR è una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi. Un prerequisito indispensabile al realizzarsi della reazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio. Infatti, nella reazione sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (primer) complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare, che costituiscono gli elementi di

innesco dell'attività della DNA polimerasi. I primers utilizzati per la PCR sono stati disegnati utilizzando il programma Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus/) e attraverso l'utilizzo del programma SNPCheck (www.snpcheck.net) è stata valutata la presenza al loro interno di possibili polimorfismi, in grado di interferire con l'amplificazione dello specifico frammento bersaglio. Altri elementi coinvolti nella reazione sono i desossiribonucleotidi e il $MgCl_2$: i primi sono necessari per la sintesi delle nuove eliche ed il secondo rappresenta il cofattore indispensabile alla DNA polimerasi. La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse temperature che rendono possibile rispettivamente:

1. la denaturazione della doppia elica del DNA stampo in due singole eliche (alla temperatura di 95 °C);
2. l'appaiamento degli inneschi oligonucleotidici alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari e localizzati alle estremità del frammento bersaglio (ad una temperatura in genere compresa tra i 50 ed i 70 °C);
3. l'estensione degli inneschi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione 5'-3' ad opera della DNA polimerasi che porta alla sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo (ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72 °C).

Il risultato dell'amplificazione PCR dei frammenti è stato verificato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,6% (Agarosio standard low EEO, AB ANALITICA).

Il metodo di purificazione dei prodotti di PCR utilizzato per questo studio è quello enzimatico (EXOSAP-IT®, USB), che utilizza la combinazione di due enzimi: esonucleasi I e fosfatasi alcalina, che permettono di eliminare primers e dNTPs non incorporati nella reazione di PCR ed eventuali dimeri di primers che potrebbero interferire con la successiva reazione di sequenziamento. Questa strategia permette la purificazione di frammenti di PCR anche inferiori a 100 bp e grandi fino a 20 kb, senza significativa perdita di campione.

Infine, la reazione di sequenziamento viene effettuata direttamente sui prodotti di PCR purificati, mediante il metodo dei didesossiterminatori

(Sanger), utilizzando il kit BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Il metodo di sequenziamento dei didesossiterminatori o di Sanger è un particolare tipo di amplificazione in cui, per ogni ciclo, è prevista una fase di denaturazione del template, di annealing e di estensione in presenza di un singolo primer (forward o reverse). Il primer è complementare alla sequenza nota immediatamente fiancheggiante la regione di interesse. Ogni fase di estensione termina con l'incorporazione di un dideossinucleotide (ddNTPs) marcato con una molecola fluorescente. A seguito dell'incorporazione del ddNTP marcato al posto del dNTP normale si determina il blocco della catena in crescita perché posseggono un solo atomo di idrogeno al posto del gruppo -OH in 3'. Nella miscela risultante, la marcatura del ddNTP di ogni dato frammento corrisponde al nucleotide della sua posizione terminale. La sequenza è quindi determinata mediante separazione elettroforetica ad alta risoluzione dei prodotti di estensione a singolo filamento ciascuno marcato con uno specifico fluoroforo, in capillari riempiti di un opportuno polimero capace di separare i frammenti in base alle loro dimensioni. Il marcatore fluorescente viene eccitato da un laser a mano a mano che i frammenti di diversa lunghezza escono dal capillare, generando uno spettro di emissione caratterizzato da quattro colori, uno per ciascuna base (A, G, C, T). Un sistema ottico dotato di un fotomoltiplicatore raccoglie il segnale fluorescente restituito dai fluorocromi quindi un software raccoglie i dati di fluorescenza e li elabora in picchi pseudocolorati, generando uno spettro noto come elettroferogramma. Il protocollo di lavoro utilizzato, si basa sull'impiego del kit BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) contenente BigDye®Terminator v1.1 5X Sequencing Buffer e BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100, in cui sono inclusi un AmpliTaq®DNA Polymerase, BigDye terminators marcati con dRodamina e altri componenti necessari per la reazione di sequenza.

Tutte le reazioni di PCR, purificazione enzimatica dei frammenti di PCR e sequenziamento sono state effettuate mediante uno dei seguenti termociclatori presenti nel nostro laboratorio: GeneAmp 9700 (Applied Biosystem), 2720 thermal Cycler (Applied Biosystem), Triblock T3000 Thermocycler (Biometra).

I prodotti di sequenziamento vengono quindi purificati, per rimuovere sali, primers e nucleotidi in eccesso mediante filtrazione su una resina Sephadex G100 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), una piastra da 96 pozzetti (MultiScreen®HTS HV, Millipore) preventivamente preparata. I campioni, una volta purificati, vengono caricati sul sequenziatore ABI Prism 3130 Genetic Analyser.

3.5 Interpretazione dei risultati

Il sistema utilizzato si basa sull'elettroforesi capillare (CE) (ABI Prism 3130 Genetic Analyser, Applied Biosystems). Il sequenziatore ABI Prism 3130 è sotto il controllo di specifici programmi software: ABI 3130 data collection software e ABIPRISM DNA Sequencing Analysis software. A questi è attribuita la funzione di controllare i parametri elettroforetici, oltre che di gestire l'analisi e l'elaborazione dei dati. I dati di sequenza possono essere presentati sotto forma di bande o picchi cromatografici a quattro colori, oppure ancora sotto forma di sequenza, con le lettere ACGT che indicano le singole basi identificate. Le sequenze poi vengono analizzate con principalmente due programmi: SeqScape e Sequencer. L'interpretazione delle varianti identificate è stata effettuata mediante l'utilizzo dei siti di predizione e database disponibili on-line:

- <http://db.systemsbioology.net/kaviar/cgi-pub/Kaviar.pl>
- <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- <http://genome.ucsc.edu/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>
- <http://www.ensembl.org/index.html>
- <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>
- <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>
- <http://sift.jcvi.org>

4. RISULTATI

In questo progetto di ricerca abbiamo analizzato 157 pazienti pediatriche presentanti un fenotipo eterogeneo di encefalopatie epilettiche ad esordio precoce (EOEEs) utilizzando come strategia diagnostica il sequenziamento massivo parallelo di 36 geni causativi o candidati per le EOEEs. Per ogni paziente sono state identificate in media 576 varianti, ridotte a circa 33 varianti dopo il processo di filtraggio. Queste varianti rimanenti sono state ulteriormente filtrate utilizzando la localizzazione delle varianti e la relativa frequenza allelica nelle banche dati pubbliche. In particolare, sono state rimosse tutte le varianti localizzate negli introni e nel 5' e 3' UTR. Le varianti rimanenti (esoniche o nei siti canonici di splicing) sono state ulteriormente filtrate per frequenza allelica, eliminando tutte quelle che presentavano una frequenza maggiore allo 0.01 (1%) in ESP6500-ALL (EA+AA) o maggiore allo 0.01 (1%) in 1000g2012feb-ALL.

L'analisi di sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione di mutazioni presumibilmente patogenetiche in 31 su 157 pazienti (19,7%). Tutte le mutazioni identificate sono state confermate con metodo Sanger e testate nei genitori per valutare se fossero ereditate o insorte *de novo*. Per tutte le mutazioni è stata effettuata una analisi *in silico* per valutarne il potenziale ruolo patogenetico mediante i programmi: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e Mutpred Splice (<http://mutdb.org/mutpredsplice/submit.htm>).

Le mutazioni individuate, di cui 24 missenso, 3 troncanti, 3 duplicazioni ed una che alterava il sito di splicing, sono state riscontrate sia in geni notoriamente coinvolti nelle EOEEs sia in geni per cui solo recentemente sta emergendo un'associazione con questo fenotipo.

Tra le varianti rilevate, alcune erano già note in letteratura.

Nella seguente tabella sono riportate le caratteristiche cliniche ed i risultati del sequenziamento massivo parallelo dei 31 pazienti portatori di mutazione presumibilmente patogenetica (tabella 6).

Tabella 6: Caratteristiche cliniche e risultati molecolari dei pazienti portatori di mutazioni con pannello NGS.

PZ	S	GENE	MUTAZIONE ED EREDITARIETA'	FENOTIPO	ETA' DI INSORGENZA	REF
1	F	<u>STXBP1</u>	NM_003165.3:c.1099C>T (p.Arg367*) <i>de novo</i>	EE, crisi focali, spasmi, sindrome distonico-discinetica, grave RPM, microcefalia acquisita	1 mese	Yamashita S et al., 2013
2	M	<u>STXBP1</u>	NM_003165.3:c.1216C>T (p.Arg406Cys) <i>de novo</i>	EE, convulsioni neonatali, grave RPM, suppression-burst	1° giorno di vita	
3	F	<u>STXBP1</u>	NM_003165.3:c.247-249_1359+527dup <i>de novo</i>	EE, spasmi, grave RPM, suppression-burst	2 settimane	
4	F	<u>STXBP1</u>	NM_003165.3:c.1408G>T (p.Glu470*) <i>de novo</i>	EE, spasmi, RPM, assenza di linguaggio, suppression-burst	2 mesi	
5	M	<u>STXBP1</u>	NM_003165.3:c.1217G>A (p.Arg406His) ND	ND	ND	Saitsu et al., 2010
6	F	<u>KCNQ2</u>	NM_172107.2:c.873G>T (p.Arg291Ser) <i>de novo</i>	EE, crisi toniche, grave RPM	1° giorno di vita	
7	F	<u>KCNQ2</u>	NM_172107.2:c.901G>A (p.Gly301Ser) <i>de novo</i>	EE, clonie arti, suppression-burst	2° giorno di vita	
8	M	<u>KCNQ2</u>	NM_172107.2:c.802C>T (p.Leu268Phe) <i>de novo</i>	Convulsioni neonatali, crisi tonico cloniche, normale sviluppo psicomotorio	9° giorno di vita	
9	F	<u>KCNQ2</u>	NM_172107.2:c.881C>T (p.Ala294Val) <i>de novo</i>	EE, grave deficit cognitivo	1° giorno di vita	Milh et al., 2013
10	F	<u>KCNQ2</u>	NM_172107.2:c.1696G>C (p.Asp566His) <i>de novo</i>	Epilessia, normale sviluppo psicomotorio	4° giorno di vita	
11	F	<u>KCNQ2</u>	NM_172107.2:c.1508C>G (p.Ser503*) ND	Epilessia, clonie generalizzate, crisi febbrili, normale sviluppo psicomotorio	3 mesi	
12	M	<u>SCN2A</u>	NM_021007.2:c.4643T>C (p.Met1548Thr) <i>de novo</i>	Crisi focali, suppression-burst, grave RPM con tetraparesi spastica	1° giorno di vita	
13	M	<u>SCN2A</u>	NM_021007.2:c.3947C>T (p.Ala1316Val) <i>de novo</i>	EE, grave RPM, ipotonia, crisi toniche, suppression-burst	3° giorno di vita	

14	M	<u>SCN2A</u>	NM_021007.2:c.5645G>A (p.Arg1882Gln) <i>de novo</i>	EE, tetraparesi spastica, convulsioni neonatali, deficit visivo, suppression-burst	1° giorno di vita	Carvill et al., 2013
15	M	<u>SCN2A</u>	NM_021007.2:c.5243A>G (p.Asn1748Ser) <i>padre</i>	Pregressi spasmi epilettici ad insorgenza neonatale, RPM	7 mesi	
16	F	<u>MECP2</u>	NM_004992.3:c.763C>T (p.Arg255*) <i>de novo</i>	ipotonia assiale, stereotipie motorie, anomalie parossistiche in sonno, progressivo RPM	6 mesi	Amir et al., 1999
17	F	<u>MECP2</u>	NM_004992.3:c.915G>T (p.Lys305Asn) <i>de novo</i>	Crisi focali notturne, progressivo RPM con marcate caratteristiche psichiatriche e grave parkinsonismo	5 anni	
18	M	<u>CDKL5</u>	NM_003159.2:c.1449_1452 dup (p.Lys484Aspfs11) <i>de novo</i>	EE, spasmi, sindrome distonico-discinetica, RPM, anomalie multifocali, ipsaritmia	2 mesi	Mei et al., 2014
19	M	<u>ARX</u>	NM_139058.2:c.1058C>T (p.Pro353Leu) <i>de novo</i>	EE, crisi focali poi spasmi, moderato RPM, anomalie multifocali, malformazione corticale	5 mesi	Strømme et al., 2002
20	M	<u>PNPO</u>	NM_018129.3:c.674G>A (p.Arg225His) <i>padre + madre</i>	EE, tetraparesi spastica grave, RM profondo, crisi polimorfe, suppression-burst, microcefalia acquisita	1° giorno di vita	Plecko et al., 2014
21	M	<u>POLG</u>	NM_002693.2:c.2243G>C (p.Trp748Ser) + NM_002693.2:c.2492A>G (p.Tyr831Cys) <i>padre + madre</i>	EE, tetraparesi spastica distonico-discinetica, crisi tonico-cloniche, RPM grave, anomalie parossistiche	2,5 anni	Van Goethem et al., 2004 + Mancuso et al., 2004
22	M	<u>CNTNAP2</u>	NM_014141.5:c.1777+2T>C <i>padre + madre</i>	Crisi focali, RPM, strabismo, scoliosi, displasia corticale	13 mesi	
23	M	<u>SPTAN1</u>	NM_001130438.2:c.6923_6928dup p.Arg2308_Met2309dup <i>de novo</i>	EE, tetraparesi spastica distonico-mioclonica, crisi toniche e miocloniche, RPM, suppression-burst microcefalia congenita, ipoplasia pontocerebellare	3 mesi	Saitsu et al., 2010

24	M	<u>MEF2C</u>	NM_002397.4:c.108C>A (p.Ser36Arg) <i>de novo</i>	Epilessia, crisi febbrili, grave RPM, tratti autistici, anomalie a zolla della mielinizzazione	ND	
25	M	<u>GRIN2A</u>	NM_000833.3:c.1138A>G (p.Asn380Asp) <i>madre</i>	EE, tetraparesi spastico-distonica, RM grave, crisi cloniche, microcefalia acquisita	3 mesi	
26	F	<u>GRIN2A</u>	NM_000833.3:c.2966A>G (p.Asn989Ser) <i>padre</i>	EE, tetraparesi aposturale discinetica, spasmi, grave RPM	4 mesi	
27	F	<u>GRIN2B</u>	NM_000834.3:c.43G>A (p.Val15Met) <i>padre</i>	EE, disturbo del movimento, severo RPM, spasmi e crisi toniche, microcefalia acquisita	3 mesi	
28	F	<u>ATP1A2</u>	NM_000702.3:c.1777C>T (p.Arg593Trp) <i>padre</i>	EE, grave RPM, spasmi, anomalie parossistiche bilaterali in sonno microcefalia acquisita, malformazione corticale	3 mesi	
29	M	<u>ATP1A2</u>	NM_000702.3:c.1097G>C (p.Gly366Ala) <i>de novo</i>	EE grave, suppression-burst	1 mese	Vanmolkot et al., 2006
30	F	<u>ATP1A3</u>	NM_152296.4:c.1765G>T (p.Val589Phe) <i>de novo</i>	Epilessia parziale ad esordio precoce, RPM	ND	
31	F	<u>SCN8A</u>	NM_014191.3:c.4948G>A (p.Ala1650Thr) <i>de novo</i>	Crisi focali, ipomobilità, ipotono assiale, movimenti discinetici, anomalie epilettiformi multifocali	3 mesi	Ohba et al., 2014

PZ= paziente

S= sesso

EE= encefalopatia epilettica

RPM= ritardo psicomotorio

RM= ritardo mentale

ND=non disponibile

4.1 Pazienti portatori di mutazioni identificate con il pannello NGS

Cinque pazienti con mutazione del gene *STXBP1*

1. La paziente 1 è una bambina di 3 anni e 8 mesi con un quadro clinico di encefalopatia epilettica e grave ritardo dello sviluppo psicomotorio con disturbo distonico-discinetico e microcefalia acquisita. L'epilessia è esordita all'età di un mese con episodi critici in apiressia caratterizzati da irrigidimento dell'emilato di sinistra (arto superiore ed inferiore sinistro), versione dello sguardo e del capo verso sinistra, mioclonie periorali a sinistra della durata di circa 3-5 secondi. A queste crisi focali sono seguite crisi a tipo spasmi fino agli 11 mesi, in cui è stato effettuato il primo inquadramento clinico. Il trattamento farmacologico alla dimissione prevedeva l'utilizzo di Sabril (vigabatrin) e Tegretol (carbamazepina). Da allora libera da crisi. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1099C>T nel gene *STXBP1* (Genbank Accession: NM_001032221.3). Tale sostituzione causa la terminazione precoce della proteina (p.Arg367*). La stessa variante è stata identificata in un paziente con sindrome di Ohtahara (196). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

2. Il paziente 2 è un bambino di 2 anni e 8 mesi con grave ritardo dello sviluppo motorio ed epilessia esordita in epoca neonatale con crisi pluriquotidiane/ subentranti associate ad un quadro EEG di suppression burst. Le crisi sono farmacologicamente controllate dai 2 mesi di vita seguendo la terapia endovenosa con Fenobarbitale e Diazepam. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1216C>T (Genbank Accession: NM_001032221.3) nel gene *STXBP1*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Arg406Cys). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 (<http://db.systemsbio.net/kaviar/cgi-pub/Kaviar2.pl>) (versione 130517) né nel database delle mutazioni associate alla malattia ereditarie umane HGMD (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php>)

(versione 2014.4). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

3. Il paziente 3 è una bambina di un anno e mezzo affetta da grave encefalopatia epilettica con crisi a tipo spasmi in flessione, correlato EEG di suppression burst e grave ritardo dello sviluppo psicomotorio con schemi patologici ai quattro arti. A due settimane la bambina ha iniziato a presentare episodi di breve durata in cluster pluriquotidiani caratterizzati da improvvisa adduzione in flessione degli arti superiori, clonie palpebrali e del capo. Dopo due settimane, gli episodi si sono intensificati con incremento della frequenza e talvolta con manifestazioni asimmetriche tra i due lati. La risonanza magnetica nucleare (RMN) dell'encefalo ha rivelato inoltre corpo calloso assottigliato e processo di mielinizzazione non completato e in ritardo con l'età. In seguito ad un ciclo di terapia corticosteroidica (Synacten, ACTH) la paziente presenta miglioramento con minore frequenza, durata ed intensità delle crisi. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza della duplicazione intragenica in tandem c.247-249_1359+527dup (Genbank Accession: NM_001032221.3) che coinvolge la regione genomica a monte dell'esone 4 fino all'esone 15 del gene *STXBP1*. Tale duplicazione include 17500 bp e non è presente nel database delle varianti strutturali DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). Il riarrangiamento è stato confermato mediante metodica CGH-array presso un altro centro ed è risultato *de novo*.

4. Il paziente 4 è una bambina di 6 anni e 3 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica e ritardo dello sviluppo psicomotorio. L'esordio di crisi a tipo spasmi è avvenuto a 2 mesi con quadro EEG tipo suppression burst, inizialmente farmaco-resistenti, con successivo controllo raggiunto dopo un mese. Il ritardo psicomotorio permane, viene segnalata l'acquisizione della deambulazione autonoma all'età di 4 anni e l'assenza di linguaggio. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1408G>T (Genbank Accession: NM_001032221.3) nel gene *STXBP1* che causa la terminazione precoce della proteina (p.Glu407*). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

5. Il paziente 5 è un bambino di 1 anno e 9 mesi di cui non è disponibile la valutazione clinica. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1217G>A (Genbank Accession: NM_001032221.3) nel gene *STXBP1*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Arg406His). La stessa variante è stata identificata in due pazienti con EOEE associate ad un quadro EEG di suppression burst (197) (198). La variante è stata confermata con metodo Sanger. L'origine *de novo* o meno della mutazione non è stata indagata in quanto il campione di DNA dei genitori non è stato disponibile.

Sei pazienti con mutazione del gene *KCNQ2*

1. Il paziente 6 è una bambina di 6 anni e 10 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica e grave ritardo psicomotorio. Le crisi toniche sono esordite nel primo giornata di vita, con risposta alla terapia farmacologica (Keppra – levetiracetam e Tegretol – carbamazepina) ma persistenza di alterazioni elettroencefalografiche. Attualmente presenta un grave ritardo dello sviluppo, assenza di linguaggio, deficit visivo centrale. La RMN mostra dilatazione degli spazi subaracnoidei e del sistema ventricolare sovratentoriale, ed ipoplasia del corpo calloso. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica c.873G>T (Genbank Accession: NM_172107.2) nel gene *KCNQ2* responsabile di un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Arg291Ser). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

2. Il paziente 7 è una bambina di 1 anno e 2 mesi con un quadro clinico di convulsioni neonatali insorte in seconda giornata di vita associate ad un quadro EEG tipo suppression burst. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.901G>A (Genbank Accession: NM_172107.2) nel gene *KCNQ2* che causa un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Gly301Ser). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante

Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

3. Il paziente 8 è un bambino di un anno e 3 mesi di cui è stata riferita sofferenza perinatale che ha necessitato di rianimazione. Sono segnalate convulsioni neonatali sin dalla prima giornata di vita, a cui sono seguite crisi focali pluriquotidiane associate ad un quadro EEG di tipo suppression burst. Controllo delle crisi raggiunto all'età di un mese e mezzo (terapia con levetiracetam, topiramato, piridossina, biotina, acido folico, piridossal fosfato) con normalizzazione del tracciato, sviluppo psicomotorio nella norma fino all'ultimo follow up. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica c.802C>T (Genbank Accession: NM_172107.2) nel gene *KCNQ2*, responsabile di un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Leu268Phe). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

4. Il paziente 9 è una bambina di 8 anni e 10 mesi mezzo con un quadro di encefalopatia epilettica e grave deficit cognitivo. Gli episodi critici sono esorditi in prima giornata di vita e hanno portato, nell'arco dei primi due mesi, a ripetuti ricoveri in rianimazione. Dai 2 mesi controllo delle crisi con terapia farmacologica. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica c.881C>T (Genbank Accession: NM_172107.2) nel gene *KCNQ2* che causa un cambio aminoacidico nella proteina (p.Ala294Val). La stessa variante è stata identificata in tre diversi pazienti con diagnosi di EOEE (199) (69) (200). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*. Era stata precedentemente eseguita l'analisi mutazionale del gene *KCNQ2* con metodica tradizionale presso un altro centro, risultata negativa.

5. Il paziente 10 è una bambina di 3 anni che ha presentato nella quarta giornata di vita una prima crisi epilettica focale con EEG e RM encefalo nella norma. E' stata formulata la diagnosi di crisi convulsive benigne neonatali. A 3 mesi si verifica una crisi generalizzata in febbre, con conseguente diagnosi di crisi febbrili complesse. Dopo 10 giorni si sono manifestate crisi focali

secondariamente generalizzate in corso di gastroenterite da Rotavirus (crisi registrata). La valutazione clinica ha mostrato un esame neurologico e sviluppo psicomotorio nei limiti di norma . Dai 5 mesi si riscontra una ricorrenza di crisi generalizzate cloniche, crisi ipomotorie e ipermotorie, crisi miocloniche generalizzate, crisi focali secondariamente generalizzate, di durata variabile. Viene effettuata la diagnosi di crisi neonatali-infantili con crisi in febbre e crisi in corso di gastroenterite. L'esame neurologico e lo sviluppo psicomotorio si mantengono normali. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1696G>C (Genbank Accession: NM_172107.2) nel gene *KCNQ2*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Asn566His). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

6. Il paziente 11 è una bambina di 1 anno e 9 mesi con normale sviluppo psicomotorio ed esordio ai 3 mesi di episodi critici subentranti in apiressia caratterizzati da clonie generalizzate. All'età di 8 mesi in corso di febbre recidiva di episodi critici. EEG e RMN cranioencefalo nei limiti della norma. Riportata familiarità positiva sulla linea paterna per convulsioni familiari benigne. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica c.1508C>G (Genbank Accession: NM_172107.2) nel gene *KCNQ2*, responsabile della terminazione precoce della proteina (p.Ser503*). L'origine *de novo* o meno della mutazione non è stata indagata in quanto il campione di DNA dei genitori non è stato disponibile.

Quattro pazienti con mutazione del gene *SCN2A*

1. Il paziente 12 è un bambino di 2 anni che ha presentato, a pochi minuti dalla nascita, un esordio di crisi epilettiche focali a semeiologia motoria e correlato EEG tipo suppression burst, con frequenza pluriquotidiana. Clinicamente il paziente presenta un grave ritardo psicomotorio con tetraparesi spastica che nei periodi di maggiore malessere all'opistotono con spasticità

incoercibile e accessi distonici. Attualmente la terapia con fenitoina e lamotrigina sembra avere un discreto controllo delle crisi, che comunque persistono quotidiane/pluriquotidiane, solitamente di breve durata. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica in eterozigosi c.4643T>C (Genbank Accession: NM_021007.2) nel gene *SCN2A*, che determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Met1548Thr). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

2. Il paziente 13 è un bambino di 4 anni e 8 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica, grave ritardo psicomotorio e ipotonia severa. Esordio di episodi critici in terza giornata di vita con crisi toniche farmaco-resistenti e quadro EEG di tipo suppression burst. Controllo farmacologico delle crisi dal primo anno di vita. Il sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica in eterozigosi c.3947C>T (Genbank Accession: NM_021007.2) nel gene *SCN2A*, responsabile del cambio aminoacidico (p.Ala1316Val). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

3. Il paziente 14 è un bambino di 12 anni con un quadro di encefalopatia epilettica con crisi farmaco-resistenti, tetraparesi spastica e deficit visivo. Nato da genitori consanguinei. Esordio di crisi farmaco-resistenti in prima giornata di vita, evolvendosi in episodi critici pluriquotidiani. L'analisi RM presenta una progressiva atrofia cerebrale e quadro EEG di tipo suppression burst. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica in eterozigosi c.5645G>A (Genbank Accession: NM_021007.2) nel gene *SCN2A*, che determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Arg1882Gln). La stessa variante è stata identificata in un paziente con encefalopatia epilettica (100). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

4. Il paziente 15 è un bambino di 8 anni e 5 mesi presentante spasmi epilettici insorti a 7 mesi di vita. In seguito alla terapia con Hidrocortison (ACTH) e

Depakin (sodio valproato), non si sono più manifestate crisi. Presenta ritardo motorio e del linguaggio, con un disturbo dello spettro autistico. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica in eterozigosi c.5243A>G (Genbank Accession: NM_021007.2) nel gene *SCN2A*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Asn1748Ser). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata essere ereditata dal padre.

Due pazienti con mutazione del gene *MECP2*

1. Il paziente 16 è una bambina di 2 anni con un quadro di ipotonia prevalentemente assiale con severo ritardo dello sviluppo psicomotorio, caratterizzato da scarsa interazione ambientale con stereotipie motorie. Dall'età di circa sei mesi sono esorditi movimenti stereotipati prolungati (fino a 10 minuti) degli arti superiori, con un progressivo aumento della frequenza. L'EEG ha mostrato la presenza di anomalie parossistiche focali. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica in eterozigosi c.763C>T (Genbank Accession: NM_004992.3) nel gene *MECP2*, responsabile della terminazione precoce della proteina (p.Arg255*). La stessa variante è stata precedentemente descritta in letteratura come associata a Sindrome di Rett (201) (202) (203).

2. Il paziente 17 è una ragazza di 19 anni e 6 mesi seguita sin dalla prima infanzia per il quadro clinico caratterizzato da epilessia focale, microcefalia congenita, ritardo cognitivo, disturbo del comportamento e della deambulazione, obesità. Esordio a 5 anni di epilessia focale farmacoresistente ad origine frontale con crisi in sonno. All'età di 13 anni viene segnalata un'importante regressione psicomotoria, comparsa di stereotipie manuali, automatismi orobuccali, episodi di comportameto eteroaggressivo, atteggiamento distonico. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica c.915G>T (Genbank Accession: NM_004992.3) nel gene *MECP2*, che causa un cambio

aminoacidico a livello della proteina (p.Lys305Asn). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

Un paziente con mutazione del gene *CDKL5*

Il paziente 18 è un bambino di 8 anni e 3 mesi con un quadro clinico di encefalopatia epilettica gravissima a insorgenza precoce, ritardo psicomotorio e sindrome distonico-discinetica. All'età di 2 mesi, sono iniziate manifestazioni critiche di spasmi tonici, brevi, con cadute del capo. E' stato trattato con Sabril, che ha mostrato un'efficacia rapida. Successivamente trattato con altri farmaci ma le manifestazioni cliniche sono riprese. L'EEG inizialmente presenta anomalie multifocali configurando anche, in determinati periodi, quadro di tipo iperaritmico. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la duplicazione nucleotidica in eterozigosi c.1449_1452dup nel gene *CDKL5* (Genbank Accession: NM_003159.2). Tale duplicazione causa frameshift e terminazione precoce della proteina (p.Lys485Aspfs11). I risultati hanno evidenziato che la variante è presente in mosaico in quanto l'allele mutante è presente nel 69% delle sequenze (n = 62). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*. L'analisi mutazionale del gene *CDKL5*, eseguita in precedenza con le tradizionali metodiche in un altro centro, aveva dato risultati negativi. Il caso è stato recentemente descritto includendolo in una casistica di pazienti maschi presentanti encefalopatia epilettica associata a mutazioni nel gene *CDKL5* (204).

Un paziente con mutazione del gene *ARX*

Il paziente 19 è un bambino di 2 anni e 4 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica, ritardo moderato dello sviluppo psicomotorio e malformazione corticale. Sviluppo psicomotorio nella norma nei primi 4 mesi di vita, fino alla

comparsa di crisi focali farmacoresistenti a frequenza crescente accompagnate da regressione dello sviluppo psicomotorio. Successivamente sono comparse scariche di episodi critici di tipo spasmi in estensione, e tracciato EEG del tipo suppression-burst. Viene iniziata la terapia farmacologica con ACTH. All'esame neurologico si riscontra un grave ritardo neurocognitivo, ipotonia assiale, presenza di stereotipie buccali e linguali. L'analisi RMN evidenzia un quadro malformativo complesso caratterizzato da atrofia corticale, assottigliamento del corpo calloso e semplificazione della girazione associata a malformazione degli ippocampi. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la sostituzione nucleotidica in emizigosi c.1058C>T, nel gene *ARX* (Genbank Accession: NM_139058.2), che determina la sostituzione aminoacidica p.Pro353Leu. La stessa alterazione è riportata in letteratura associata a ritardo mentale e epilessia (37) (205). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

Un paziente con mutazione del gene *PNPO*

Il paziente 20 è un bambino di 7 anni e 4 mesi con un quadro clinico di encefalopatia epilettica, microcefalia acquisita, ritardo mentale profondo e grave tetraparesi spastica. Sin dalla prima giornata di vita sono comparsi episodi critici descritti come "movimenti ipsaritmici" degli arti associati ad automatismi oro alimentari con tracciato EEG tipo suppression-burst. Il bambino ha continuato a manifestare crisi di vario tipo (mioclonie, spasmi tonici, crisi focali) farmacoresistenti a frequenza pluriquotidiana nonostante le diverse associazioni farmacologiche (fenobarbital, fenitoina, lorazepam, nitrazepam, vagabatrìn, topiramato, ACTH, valproato di sodio, zonisamide, piridossina), configurando in alcune occasioni stati di male. Quadro EEG con un pattern di tipo suppression burst. La RMN cranioencefalo eseguita durante la prima settimana di vita segnalava la presenza di alterazioni della sostanza bianca periventricolare, con successiva evoluzione verso un quadro di marcata atrofia corticosottocorticale. L'analisi tramite sequenziamento massivo parallelo ha rivelato la presenza in omozigosi della sostituzione nucleotidica c.674G>A (Genbank Accession: NM_018129.3), responsabile di un cambio

aminoacidico a livello della proteina (p.Arg225His). La stessa alterazione è riportata in letteratura associata a deficit di piridossamina 5'-fosfato ossidasi (206) (207). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed entrambi i genitori sono risultati portatori della mutazione in eterozigosi.

Un paziente con mutazione del gene *POLG*

Il paziente 21 è un bambino di 9 anni e 9 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica, tetraparesi spastica distonico-discinetica, grave ritardo psicomotorio. Esordio di episodi critici all'età di 2 anni e mezzo. Negli anni persistenza di crisi focali, con occasionali episodi di stato di male con rilevazione di anomalie parossistiche con prevalenza destra mediante analisi EEG. Nell'ultimo periodo si segnala assenza di crisi, associata ad una ridotta attività parossistica rispetto i precedenti monitoraggi EEG. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione delle varianti c.2243G>C (p.Trp748Ser) e c.2492A>G (p.Tyr831Cys) (Genbank Accession: NM_002693.2), entrambe allo stato eterozigote. La prima variante identificata è la più comune mutazione del gene *POLG* nello spettro di disordini da atassia-neuropatia (208) (209), mentre la patogenicità della seconda variante non è ancora stata chiaramente stabilita. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed entrambi i genitori sono risultati portatori della mutazione (la madre è portatrice della variante c.2243G>C mentre il padre è portatore della variante c.2492A>G), confermando l'indicazione per cui il paziente è risultato un eterozigote composto.

Un paziente con mutazione del gene *CNTNAP2*

Il paziente 22 è un bambino di 4 anni e 5 mesi affetto da epilessia farmaco resistente con ritardo medio-severo, strabismo convergente, scoliosi e esotropia alternante. A 13 mesi sono segnalati episodi caratterizzati come "spasmi affettivi". Successivamente il bambino ha cominciato a presentare episodi critici caratterizzati da arresto psicomotorio, deviazione del capo e dello sguardo, irrigidimento diffuso, seguito da movimenti ondulatori degli arti e della testa. Dopo l'introduzione della fenitoina e della rufinamide nel ciclo di

trattamenti viene riferita una riduzione degli episodi critici. La RMN 3 Tesla ha mostrato una iperintensità di segnale bilaterale a livello dei lobi temporali. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della variante di splicing in omozigosi c.1777+2T>C (Genbank Accession: NM_014141.5). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed entrambi i genitori sono risultati portatori della mutazione in eterozigosi.

Un paziente con mutazione del gene *SPTAN1*

Il paziente 23 è un bambino di 2 anni e 4 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica con crisi toniche e miocloniche, ritardo di sviluppo severo, microcefalia congenita, tetraparesi spastica con componente distonico-mioclonica (mioclonie a riposo e d'azione sia corticali che troncali). Esordio di crisi a tipo spasmi ai 3 mesi a cui sono seguite crisi toniche e miocloniche. L'EEG evidenzia anomalie multifocali e suppression burst. La RMN cranioencefalo mostra un quadro malformativo complesso caratterizzato da ipoplasia ponto-cerebellare, atrofia del corpo calloso e semplificazione della girazione corticale. L'inserimento in terapia del baclofen e dell'etosuccimide inizialmente ha determinato iniziale lieve beneficio seguito però, dopo pochi mesi, da un incremento delle mioclonie e delle crisi toniche. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della duplicazione c.6923_6928dup nel gene *SPTAN1* (Genbank Accession: NM_001130438.2). Tale alterazione causa la duplicazione p.Arg2308_Met2309dup. La stessa duplicazione è stata associata a sindrome di West e ipomielinazione cerebrale (61). La duplicazione è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

Un paziente con mutazione del gene *MEF2C*

Il paziente 24 è un bambino di 6 anni e 9 mesi con un quadro di epilessia, grave ritardo psicomotorio e tratti autistici. Gli episodi critici sono ben

controllati dalla terapia con acido valproico e caratterizzati da poche crisi in corso di febbre, in occasione delle quali presenta un'ulteriore regressione delle competenze acquisite. Grave disturbo motorio caratterizzato da movimenti afinalistici con valenza stereotipata. La RMN encefalo segnala anomalie a zolla della mielinizzazione, senza evidenza degenerativa ai controlli successivi. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica c.108C>A (Genbank Accession: NM_002397.4) nel gene *MEF2C*, responsabile di un cambio aminoacidico nella proteina (p.Ser36Arg). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

Due pazienti con mutazione del gene *GRIN2A*

1. Il paziente 25 è un bambino di 14 anni e 6 mesi con un quadro di encefalopatia epilettica, tetraparesi spastico-distonica, ritardo mentale grave e microcefalia acquisita. Crisi focali con secondaria generalizzazione a partire dai 3 mesi di età. Negli anni ha continuato a presentare manifestazioni critiche. Le crisi epilettiche si verificano al risveglio, all'addormentamento e nel sonno, e sono caratterizzate da ipertono seguito da clonie ai quattro arti di durata inferiore ad un minuto. Tali episodi si presentano in clusters di 3-4, distanziati alcuni secondi l'uno dall'altro, e possono avere frequenza quotidiana/pluriquotidiana. Tra una crisi e l'altra il bambino può presentare mioclonie generalizzate. L'EEG mostra normale ritmo di fondo con anomalie focali parieto-temporooccipitali che incrementano durante il sonno. La RMN ha evidenziato un quadro di ipotrofia del troncoencefalo con ipoplasia del verme cerebellare; si osserva inoltre riduzione della sostanza bianca sottocorticale. Dal punto di vista terapeutico viene utilizzato l'etosuccimide. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha portato all'identificazione della sostituzione nucleotidica, in eterozigosi, c.1138A>G (Genbank Accession: NM_001134407.1) nel gene *GRIN2A*, responsabile di un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Asn380Asp). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata

confermata con metodo Sanger ed è risultata ereditata dalla madre in apparente buona salute. E' riferita familiarità positiva sulla linea materna per ritardo mentale.

2. Il paziente 26 è una bambina di 4 anni e 3 mesi con un quadro clinico di encefalopatia epilettica, tetraparesi aposturale discinetica e grave ritardo dello sviluppo psicomotorio. A 4 mesi esordio di crisi a tipo spasmi ed EEG con attività di fondo lenta, anomalie multifocali. Alla RMN cranioencefalo si evidenzia un'alterazione di segnale della sostanza bianca in sede periventricolare bilaterale sia anteriore che posteriore. La terapia farmacologica include Vigabatrin, assunto da 2 anni, dopo l'iniziale scomparsa degli spasmi. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la sostituzione nucleotidica in eterozigosi c.2966A>G (Genbank Accession: NM_001134407.1) nel gene *GRIN2A*, responsabile di un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Asn989Ser). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata ereditata dal padre in apparente buona salute.

Un paziente con mutazione del gene *GRIN2B*

Il paziente 27 è una bambina di 5 anni e 2 mesi con un quadro di grave encefalopatia epilettica, severo ritardo dello sviluppo psicomotorio, disturbo del movimento caratterizzato da discinesie degli arti e orobuccali, microcefalia acquisita. Esordio ai 3 mesi di crisi a tipo spasmi e crisi toniche. Le crisi epilettiche hanno una frequenza variabile, da pluriquotidiane a possibili intervalli liberi di una settimana. Le crisi si presentano con arresto psicomotorio seguite da deviazione del capo, generalmente a destra, postura in opistotono e contrazione tonico asimmetrica dei quattro arti. L'introduzione della terapia farmacologica ha ridotto, ma non arrestato, la frequenza degli episodi critici. L'EEG mostra un'attività di fondo lenta, scarsamente reagente e monomorfa, anomalie focali. I controlli di RMN encefalo evidenziano un discreto ampliamento degli spazi subaracnoidei sopratentoriali e assottigliamento del corpo calloso. L'analisi mediante sequenziamento massivo

parallelo ha permesso di identificare la sostituzione nucleotidica c.43G>A (Genbank Accession: NM_000834.3) nel gene *GRIN2B*, che determina la sostituzione aminoacidica p.Val15Met. Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata ereditata dal padre in apparente buona salute.

Due pazienti con mutazione del gene *ATP1A2*

1. Il paziente 28 è una bambina di 8 anni e 6 mesi con un quadro clinico caratterizzato da encefalopatia epilettica, grave ritardo dello sviluppo psicomotorio, microcefalia acquisita e malformazione dello sviluppo corticale. L'epilessia è insorta a 3 mesi di età con apiressia, episodio di irrigidimento diffuso, perdita di coscienza della durata di circa 3-4 minuti, seguiti nel corso della seguente settimana da altri 2-3 episodi con le stesse caratteristiche semeiologiche. Successivamente sono comparsi episodi a tipo spasmo con componente asimmetrica per prevalenza destra. Ad oggi la bambina presenta spasmi ripetuti a frequenza pluriquotidiana a carico prevalentemente dell'emilato destro o più simmetrici, della durata fino a 20 minuti seguiti da sonno postcritico soprattutto al risveglio. La RMN cranioencefalo evidenzia una lieve alterazione di segnale a carico della sostanza bianca periventricolare posteriore, aspetto dismorfico dei ventricoli laterali. Ispessimento del terzo anteriore-medio e del ginocchio del corpo calloso e asimmetria dei solchi a livello della porzione craniale posteriore della scissura di Silvio. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha permesso di identificare la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1777C>T (Genbank Accession: NM_000702.3) nel gene *ATP1A2*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Arg593Trp). La stessa sostituzione è riportata in letteratura come mutazione associata ad emicrania emiplegica (210). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata ereditata dal padre.

2. Il paziente 29 era un bambino di 1 anno al momento dell'analisi con un quadro di encefalopatia epilettica grave con crisi farmacoresistenti ad esordio

neonatale. Il tracciato EEG mostra un pattern a tipo suppression burst. La RMN cranioencefalo ha rilevato aree iperintense nei centri semiovali. Il paziente è deceduto all'età di un anno e tre mesi per complicazioni. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1097G>C (Genbank Accession: NM_000702.3) nel gene *ATP1A2*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Gly366Ala). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*.

Un paziente con mutazione del gene *ATP1A3*

Il paziente 30 è una bambina di 2 anni e 2 mesi con un quadro di epilessia parziale ad esordio precoce e ritardo psicomotorio. La bambina presenta episodi accessuali non febbrili a frequenza quotidiana, caratterizzati da risveglio, alterazione del contatto, alterazione del respiro e scialorrea variabilmente associati a clonie dell'emilato sinistro e/o dei globi oculari. La durata degli episodi è variabile da pochi minuti a 30 minuti, e il diazepam è risultato essere solo parzialmente efficace. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.1765G>T (Genbank Accession: NM_152296.4) nel gene *ATP1A3* responsabile di un cambio aminoacidico nella proteina (p.Val589Phe). Tale variante non è presente nei database dei polimorfismi interrogati mediante Kaviar2 né nel database delle mutazioni associate alle malattie ereditarie umane HGMD. La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*. Il gene *ATP1A3* non era incluso nel pannello dei 36 geni target (tabella 5), per cui è stato possibile identificare la variante grazie all'omologia della regione cromosomica in cui è contenuta con quella di geni inclusi nel pannello, in questo caso per omologia con il gene *ATP1A2*.

Un paziente con mutazione del gene *SCN8A*

Il paziente 31 è una bambina di 6 anni e 4 mesi con un quadro di epilessia focale sintomatica resistente ad esordio precoce. Esordio a 3 mesi con episodi in corso di sonno caratterizzato da deviazione dello sguardo e della rima labiale verso destra con scosse tonico-cloniche generalizzate. Attualmente presenta crisi focali incontabili pluriquotidiane senza compromissione della coscienza, ipomobilità, sporadicamente può avere una generalizzazione prevalentemente clonica. L'EEG mostra anomalie epilettiformi multifocali, ma mai suppression burst. L'analisi mediante sequenziamento massivo parallelo ha evidenziato la presenza in eterozigosi della sostituzione nucleotidica c.4948G>A (Genbank Accession: NM_014191.3) nel gene *SCN8A*. Tale sostituzione determina un cambio aminoacidico a livello della proteina (p.Ala1650Thr). La stessa alterazione è riportata in letteratura associata a encefalopatia epilettica infantile (101). La variante è stata confermata con metodo Sanger ed è risultata *de novo*. Il caso è stato recentemente incluso in uno studio europeo comprendente in un'ampia casistica di pazienti con encefalopatia e disturbi dello sviluppo neurologico (211). Il gene *SCN8A* non era incluso nel pannello dei 36 geni target (tabella 5), per cui è stato possibile identificare la variante grazie all'omologia della regione cromosomica in cui è contenuta con quella di geni inclusi nel pannello, in questo caso per omologia con i geni codificanti le subunità dei canali del sodio (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN9A*).

5. DISCUSSIONE

In questo studio sono stati analizzati 157 pazienti con fenotipi eterogenei, riconducibili alle encefalopatie epilettiche ad esordio precoce (EOEEs), mediante tecnologia Next Generation Sequencing (NGS). Grazie all'allestimento di un pannello contenente 36 geni associati ad epilessia, abbiamo identificato 31 diverse mutazioni (31/157, 19.7%). Dalla letteratura è possibile osservare che altri gruppi di ricerca hanno optato per la stessa strategia di analisi in pazienti con diversi tipi di epilessia, tra cui le EOEEs, individuando percentuali di varianti patogeniche che vanno dal 10% al 48,5% (100) (212) (213) (214) (215). I nostri dati confermano quindi l'efficacia dell'approccio target resequencing per l'identificazione di mutazioni in geni noti o candidati nella patogenesi dell'epilessie, in particolare delle EOEEs, con un valore di rilevazione (19,7%) comparabile a quello riportato negli studi precedenti. Tuttavia, diversamente dagli altri studi, nella nostra casistica non sono stati inclusi i pazienti con fenotipo chiaramente riconducibile a mutazioni del gene *SCN1A*, di cui oltre l'80% delle mutazioni sono associate alla sindrome di Dravet (216). Per questo motivo, i nostri criteri di inclusione dei pazienti hanno influenzato in maniera notevole la resa diagnostica osservata nello studio.

Abbiamo identificato 21 mutazioni (21/31, 67.7% delle varianti identificate – 21/157, 13.4% dei pazienti totali) in geni in cui è ben nota l'associazione genotipo-fenotipo correlato alle EOEEs. Nel 19.5% (6/31) dei pazienti in cui l'analisi ha permesso di rilevare una mutazione, questa è risultata a carico del gene *KCNQ2*. Tra questi, il sequenziamento massivo parallelo ha permesso di individuare, in una paziente, una mutazione di *KCNQ2* (c.881C>T, p.Ala294Val) che non era stata precedentemente riconosciuta con le metodiche tradizionali. Abbiamo riscontrato fenotipi dal più classico, storicamente noto associato a mutazioni di questo gene, caratterizzato da convulsioni neonatali benigne fino allo spettro fenotipico più grave di EOEE, descritto più recentemente (69) (70) (200). I pazienti risultati portatori di mutazioni nel gene *STXBP1* (5/31, 16.1% delle varianti identificate) mostrano un fenotipo tradizionalmente indotto da alterazioni in questo gene: un'encefalopatia epilettica caratterizzata da crisi esordite nei primi mesi di vita

e controllo raggiunto entro il primo o secondo anno d'età con persistenza, tuttavia, di grave ritardo psicomotorio. Un caso particolare di aberrazione del gene *STXBP1* è rappresentato dalla paziente 3, in cui è stata identificata la duplicazione intragenica c.247-249_1359+527dup. Fino ad oggi non sono mai stati descritti casi con duplicazioni nel gene *STXBP1*; ad ogni modo la paziente mostra un fenotipo simile a quello di pazienti con delezioni parziali nello stesso gene, compresi spasmi epilettici, tracciato EEG di tipo suppression-burst, ipotonia assiale e il ritardo del processo di mielinizzazione (57) (54). L'analisi *in silico* del cDNA contenente la duplicazione della porzione di *STXBP1* che va dall'esone 4 all'esone 15 ripetuta in tandem, ha rivelato che il riarrangiamento non determina la creazione di codoni di stop precoci essendo una duplicazione in-frame, per cui, a livello teorico, la proteina STXBP1 potrebbe essere codificata nonostante la presenza di 371 aminoacidi in più rispetto alla proteina *wild-type*. Per chiarire il ruolo patogenetico della duplicazione osservata nel nostro paziente sarà quindi necessario studiare le conseguenze funzionali della mutazione, che possono comportare destabilizzazione dell'mRNA, produzione di proteina aberrante o totale deficit della proteina. Quattro pazienti (4/31, 12.9%) sono risultati essere portatori di una mutazione nel gene *SCN2A*, un gene le cui alterazioni sono associate a due fenotipi con prognosi differente (crisi infantili familiari benigne ed EOEE) (129) (217). In un paziente con mutazione mosaico del gene *CDKL5*, la tecnologia NGS ha consentito di identificare la duplicazione in eterozigosi c.1499_1452dup (p.Lys484Aspfs11) non identificata in passato con il sequenziamento Sanger, dimostrando così una maggiore sensibilità rispetto al metodo "gold standard" per le analisi di mutazione. Il target resequencing dei 36 geni ha inoltre permesso di identificare 2 mutazioni (2/31, 6.4%) nel gene *MECP2* in due pazienti, di cui la paziente 17, affetta da crisi focali, marcate caratteristiche psichiatriche e grave parkinsonismo. Questo quadro clinico è decisamente atipico rispetto alla Sindrome di Rett tradizionalmente indotta da alterazioni in questo gene (201) (202). I nostri risultati confermano quindi che il fenotipo attribuito a mutazioni in *MECP2* continua ad espandersi, confermando un recente studio di un caso analogo al nostro (218). Abbiamo inoltre identificato la variante missenso c.1058C>T (p.Phe353Leu) nel gene *ARX*, già riportata come causativa di epilessia e ritardo mentale (41) (205), in un paziente con una forma di encefalopatia epilettica accompagnata da

malformazione cerebrale, confermando così la classica correlazione genotipo-fenotipo descritta nei casi di mutazione a carico di questo gene. I vantaggi del sequenziamento massivo parallelo in termini di rapidità di analisi e benefici per il paziente sono evidenti anche nel caso del paziente in cui è stata rilevata la mutazione missenso c.674G>A (p.Arg225His) nel gene *PNPO*, responsabile di un quadro di encefalopatia piridossalfofosfato-dipendente (115). La diagnosi genetica ha permesso di instaurare una terapia sostitutiva appropriata con una decisa riduzione della frequenza e gravità degli episodi critici. Due recenti studi funzionali avevano precedentemente dimostrato che l'espressione dell'enzima PNPO con la medesima mutazione p.Arg225His mantiene circa l'8% di attività residua, sufficiente a consentire la sintesi di piridossalfofosfato da piridossina: è stato quindi dimostrato che alcuni pazienti portatori di questa mutazione erano sensibili al trattamento con piridossina (116) (206). Nel nostro paziente, abbiamo osservato una marcata riduzione delle convulsioni dopo il trattamento con piridossalfofosfato ma non con piridossina, suggerendo che la mutazione p.Arg225His determina un effetto eterogeneo sulla somministrazione della vitamina. Un'alterazione nel gene *POLG*, anch'esso responsabile di encefalopatia su base metabolica (209), è stata identificata in un paziente che è risultato eterozigote composto per le varianti c.2243G>C (p.Trp748Ser) e c.2492A>G (p.Tyr831Cys). Mentre la prima, ereditata dalla madre, sembra essere un polimorfismo in base a quanto suggerito dagli studi più recenti (219) (122), la variante c.2492A>G, ereditata dal padre, è stata associata a diversi fenotipi clinici di malattie mitocondriali tra cui Sindrome di Alpers, oftalmoplegia progressiva esterna (PEO) ed epilessia, oltre ad essere la più comune mutazione di *POLG* nello spettro di disordini da atassia-neuropatia (Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database, <http://tools.niehs.nih.gov/polg/index.cfm/polg/view>).

L'approccio NGS si è rivelato fondamentale per il raggiungimento della diagnosi in tre pazienti (3/31, 9.7%) portatori di mutazioni in geni (*CNTNAP2*, *SPTAN1* e *MEF2C*) che sono associati con le EOEEs, ma che non sono analizzati di routine con i metodi standard per il basso tasso di mutazione (in letteratura sono riportate essere associate a EOEE solo due mutazioni del gene *CNTNAP2* ed un solo caso di *MEF2C*) (220) (221) (222), oppure per la complessità dell'analisi, come nel caso di *SPTAN1*, un gene costituito da 57 esoni, la cui analisi con tecnologia Sanger esone-per-esone sarebbe lunga e costosa.

In 5 dei casi risultati positivi (5/31, 16.1%) abbiamo individuato alterazioni in 3 geni che sono noti essere associati a fenotipi diversi da quelli presentati dai nostri pazienti e con un significato patogenetico ancora da definire. Nel gene *GRIN2A* abbiamo rilevato 2 varianti, c.1138A>G (p.Asn380Asp) e c.2966A>G (p.Asn989Ser), ereditate sia in un caso che nell'altro da uno dei genitori in apparente buona salute. Entrambi i pazienti mostrano un quadro clinico di encefalopatia epilettica, tetraparesi e grave ritardo dello sviluppo psicomotorio, associati a microcefalia acquisita in un paziente. In letteratura sono stati di recente segnalati altri casi di mutazioni del gene *GRIN2A* ereditate da genitori sani in pazienti con uno spettro fenotipico variabile di epilessia-afasia che spaziava da entità benigne come l'epilessia rolandica alla sindromi di Landau-Kleffner e alla "sindrome delle onde elettroencefalografiche continue durante il sonno leggero" (CSWSS) (223). Tali varianti sono state definite dagli stessi autori "strong risk factors than causal mutation", non potendo escludere l'influenza di componenti non genetiche sul fenotipo e quindi potenzialmente responsabili del fenotipo patogenico della casistica studiata. Anche la mutazione c.43G>A (p.Val115Met) nel gene *GRIN2B* nella paziente 27 è risultata ereditata dal padre in apparente buona salute, analogamente ad un altro caso descritto in letteratura (224). In base alle conoscenze attuali, è possibile ipotizzare un ruolo causativo delle varianti in *GRIN2A* e *GRIN2B* identificate nei nostri pazienti, ma saranno necessari ulteriori studi per definire meglio il loro contributo patogenetico. Altri due casi interessanti sono le 2 mutazioni a carico del gene *ATP1A2*. La variante c.1777C>T (p.Arg593Trp), identificata nella paziente 28, è stata riportata come mutazione *de novo* in un paziente con emicrania emiplegica pura (210), mentre nel nostro studio è risultata essere in un paziente con EOEE ed ereditata dal padre sano. Nel paziente 29 invece è stata invece rilevata la variante *de novo* c.1097G>C (p.Gly366Ala). Entrambi i pazienti presentavano una grave encefalopatia epilettica, un quadro clinico totalmente diverso dall'emicrania emiplegica. Alla luce di questi dati non possiamo escludere che il gene *ATP1A2*, finora noto per il suo coinvolgimento nell'emicrania emiplegica, abbia un ruolo causativo anche nelle encefalopatie epilettiche. Ulteriori studi permetteranno quindi di stabilire se *ATP1A2* possa essere implicato nella patogenesi dell'epilessia. Questi varianti a significato incerto evidenziano anche alcuni dei principali limiti della tecnologia NGS consistenti nella difficoltà

dell'attribuire un significato biologico alla notevole mole di dati che si riesce ad acquisire con queste metodiche.

Tuttavia, un limite strumentale del targeted resequencing, ovvero la cattura di regioni cromosomiche che non rientrano nel set di geni inclusi nel pannello ("off-target"), ci ha permesso di identificare due varianti *de novo* in due geni sequenziati per omologia a porzioni di geni inclusi nel pannello (2/31, 6.4%), tra cui la mutazione nel gene *SCN8A* portata dalla paziente 31, un gene che è stato effettivamente indicato come causativo di EOEE (99) dopo il disegno del nostro pannello.

6. CONCLUSIONE

L'utilizzo delle nuove metodiche di sequenziamento massivo parallelo si è rivelato uno strumento rapido ed efficace per individuare i difetti genetici presenti nei pazienti con encefalopatia epilettica ad esordio precoce (EOEEs) ed epilessie genetiche non chiaramente attribuibili ad un singolo gene. Ciò ha permesso un notevole risparmio sia in termini di costi che di tempo di analisi, offrendo infatti la possibilità di analizzare più geni contemporaneamente. Grazie a questa metodica quindi siamo stati in grado non solo di individuare rapidamente mutazioni in pazienti con un fenotipo ben definito, ma siamo soprattutto riusciti a scoprire l'eziologia di alcuni casi finora irrisolti, compresi quelli in cui l'analisi con metodi convenzionali non aveva portato ad alcun risultato significativo. L'approccio targeted resequencing ci ha inoltre permesso di identificare alterazioni in geni non analizzati di routine con le metodiche tradizionali perché con un tasso di mutazioni estremamente basso, di individuare potenziali nuovi geni-malattia e di impostare gli appropriati piani terapeutici in alcuni pazienti.

La diagnosi definitiva può, infatti, guidare nella scelta della terapia, aiutare nella definizione della prognosi oltre che essere importante per evitare una serie di procedure diagnostiche spesso complesse e costose. Inoltre, l'identificazione del background genetico è fondamentale per fornire alla famiglia un counseling genetico per stimare il rischio di ricorrenza.

Il numero di casi positivi rilevati con le piattaforme NGS sta progressivamente aumentando, anche perché tale approccio comincia a essere utilizzato come screening genetico di primo livello. Il futuro della diagnostica e della ricerca nell'ambito della Neurogenetica e, più nello specifico, delle epilessie, è associato allo sviluppo di nuove tecnologie di sequenziamento in grado di eseguire, con costi sostenibili, non solo il resequencing di specifiche regioni di DNA già note per essere associate a una patologia genetica, ma anche il sequenziamento dell'intera porzione codificante del genoma umano (esoma) o dell'intero genoma, permettendo così l'identificazione di nuovi geni malattia.

7. REFERENZE

1. Fisher RS, van Emde Boas W et al. *Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia*. 2005;46:470-2.
2. Guerrini R. *Epilepsy in children*. *Lancet*. 2006;367:499-524.
3. Scharfman HE. *The neurobiology of epilepsy*. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007;7:348-54.
4. Werner FM, Covenas R. *Classical Neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy: a focus on antiepileptic drugs*. *Curr Med Chem*. 2011;18:4933-48.
5. Berg AT, Millichap JJ. *The 2010 revised classification of seizures and epilepsy*. *Continuum (Minneapolis)*. 2013;19:571-97.
6. Casas-Fernandez C. *A critical analysis of the new classification of epilepsies and epileptic seizures of the International League Against Epilepsy (ILAE)*. *Rev Neurol*. 2012;54.
7. Plouin P, Kaminska A et al. *Epileptic seizures and syndromes in children. Classification*. *Rev Prat*. 2012;62:1379-85.
8. Noachtar S, Rémi J. *Classification of epileptic seizures and syndromes*. *Nervenarzt*. 2012;83:156-61.
9. Prasad DK, Satyanarayana U et al. *Genetics of idiopathic generalized epilepsy: an overview*. *Neurol India*. 2013;61:572-7.
10. Hammond CL, Thomas RH et al. *Implications for families of advances in understanding the genetic basis of epilepsy*. *Seizure*. 2010;19:675-9.
11. Martin MS, Tang B et al. *The voltage gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy*. *Hum Mol Genet*. 2007;16:2892-9.
12. Gourfinkel-An I, Baulac S et al. *Monogenic idiopathic epilepsies*. *Lancet Neurol*. 2004;3:209-18.
13. Scheffer IE, Harkin LA et al. *Neonatal epilepsy syndromes and generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+)*. *Epilepsia*. 2005; 46 Suppl 10:41-7.
14. Scheffer IE, Berkovic SF. *Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes*. *Brain* 1997;120:479-90.

15. Wallace RH, Wang DW 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.
16. Escayg A, MacDonald BT et al. *Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2*. Nat Genet. 2000;24:343-5.
17. Yu FH, Mantegazza M et al. *Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy*. Nat Neurosci. 2006;9:1142-9.
18. Ogiwara I, Miyamoto H et al. *Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation*. J Neurosci. 2007;27:5903-14.
19. Wallace RH, Marini C et al. *Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures*. Nat Genet. 2001; 28:49-52.
20. Baulac S, Huberfeld G 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.
21. Mantegazza M, Rusconi R et al. *Epileptogenic ion channel mutations: from bedside to bench and, hopefully, back again*. Epilepsy Res. 2010; 92:1-29.
22. Bonanni P, Malcarne M et al. *Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+): clinical spectrum in seven Italian families unrelated to SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutations*. Epilepsia. 2004; 45:149-58.
23. Guerrini R, Dravet CH. *Severe epileptic encephalopathies of infancy*. Epilepsy. 1997; 2285-302.
24. Catarino CB, Liu JY et al. *Dravet syndrome as epileptic encephalopathy: evidence from long-term course and neuropathology*. Brain. 2011; 134:2982-3010.
25. Suls A, Claeys KG et al. *Microdeletions involving the SCN1A gene may be common in SCN1A-mutation-negative SMEI patients*. Hum Mutat. 2006; 27:914-20.
26. Marini C, Scheffer IE et al. *SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis*. Epilepsia. 2009; 50:1670-8.
27. Macdonald RL, Kang JQ. *Molecular pathology of genetic epilepsies associated with GABA_A receptor subunit mutations*. Epilepsy Curr. 2009; 9:18-23.
28. Depienne C, Arzimanoglou A et al. *Parental mosaicism can cause recurrent transmission of SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy*. Hum Mutat. 2006;27:389.

29. Marini C, Mei D et al. *Mosaic SCN1A mutation in familial severe myoclonic epilepsy of infancy*. *Epilepsia*. 2006; 47:1737-40.
30. Marini C, Mei D et al. *Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities*. *Epilepsia*. 2007;48:1678-85.
31. Meisler MH, Kearney JA. *Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders*. *J Clin Invest*. 2005;115:2010-7.
32. Carranza Rojo D, Hamiwka L *De novo SCN1A mutations in migrating partial seizures of infancy*. *Neurology*. 2011;77:380-3.
33. 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.
34. Dalla Bernardina B, Colamaria V et al. *Nosological classification of epilepsies in the first three years of life*. *Prog Clin Biol Res*. 1983; 124:165-83.
35. Khan S, Al Baradie R. *Epileptic encephalopathies: an overview*. *Epilepsy Res Treat*. 2012;2012:403592.
36. Guerrini R, Aicardi J. *Epileptic encephalopathies with myoclonic seizures in infants and children (severe myoclonic epilepsy and myoclonic-astatic epilepsy)*. *J Clin Neurophysiol*. 2003;20:449-61.
37. Stromme P, Mangelsdorf ME et al. *Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy*. *Nat Genet*.2002; 30:441-5.
38. Ohira R, Zhang YH et al. *Human ARX gene: Genomic characterization and expression*. *Mol Genet Metab*. 2002; 77:179-88.
39. Gecz J, Cloosterman D et al. *ARX: A gene for all seasons*. *Curr Opin Genet*. 2006; 16:308-16.
40. Kato M, Das S et al. *A mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation*. *Hum Mutat*. 2004; 23:147-59.
41. Stromme P, Mangelsdorf ME et al. *Infantile spasms, dystonia, and other X-linked phenotypes caused by mutations in *Aristaless* related homeobox gene, ARX*. *Brain*. 2002; 24:266-86.
42. Wallerstein R, Sugalski R et al. *Expansion of the ARX spectrum*. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008; 110:631-4.
43. Guerrini R, Moro F et al. *Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus*. *Neurology*. 2007; 69:427-33.
44. Marsh E, Fulp C et al. *Targeted loss of *Arx* results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females*. *Brain*. 2009;132:1563-76.

45. Montini E, Andolfi G et al. *Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region*. Genomics. 1998; 51:427-433.
46. Mari F, Azimonti S et al. *CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome*. Hum Mol Genet. 2005; 14:1935-46.
47. Melani F, Mei D et al. *CDKL5 gene-related epileptic encephalopathy: electroclinical findings in the first year of life*. Dev Med Child Neurol. 2012; 53:54-60.
48. Nemos C, Lambert L et al. *Mutational spectrum of CDKL5 in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature*. Clin Genet. 2009;76:357-71.
49. Elia M, Falco M et al. *CDKL5 mutations in boys with severe encephalopathy early-onset intractable epilepsy*. Neurology. 2008;71:997-9.
50. Weaving LS, Christodoulou J et al. *Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation*. Am J Hum Genet. 2004;75:1079-93.
51. Molinari F, Kaminska A et al. *Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts*. Clin Genet. 2009; 76:188-194.
52. Molinari F, Raas-Rothschild et al. *Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy*. Am J Hum Genet. 2005; 76:334-339.
53. Hamdan F, Piton A et al. *De novo STXBP1 mutations in mental retardation and nonsyndromic epilepsy*. Ann. Neurol. 2009. 65:748-753.
54. Saitsu H, Kato M et al. *De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy*. Nat Genet. 2008; 40:782-8.
55. Djukic A, Lado FA et al. *Are early myoclonic encephalopathy (EME) and the Ohtahara syndrome (EIEE) independent of each other*. Epilepsy Res. 2006;70:68-76.
56. Ohtahara S, Yamatogi Y. *Ohtahara syndrome: with special reference to its developmental aspects for differentiating from early myoclonic encephalopathy*. Epilepsy Res. 2006; 70:58-67.
57. Milh M, Villeneuve N et al. *Epileptic and nonepileptic features in patients with early onset epileptic encephalopathy and STXBP1 mutations*. Epilepsia. 2011;52:1828-34.
58. Deprez L, Weckhuysen S et al. *Clinical spectrum of early-onset epileptic encephalopathies associated with STXBP1 mutations*. Neurology. 2010;75:1159-65.

59. Barcia G, Chemaly N et al. *Early epileptic encephalopathies associated with STXBP1 mutations: Could we better delineate the phenotype?* Eur J Med Genet. 2014;57:15-20.
60. Leto TL, Fortugno-Erikson D et al. *Comparison of nonerythroid alphaspectrin genes reveals strict homology among diverse species.* Molec Cell Biol. 1988; 8:1-9.
61. Saitsu H, Tohyama J et al. *Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay.* Am J Hum Genet. 2010; 86:881-891.
62. Tohyama J, Akasaka N et al. *Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter.* Brain. 2008; 30:349-355.
63. Hamdan FF, Saitsu H et al. *Identification of a novel in-frame de novo mutation in SPTAN1 in intellectual disability and pontocerebellar atrophy.* Europ J Hum Genet. 2012; 20:796-800.
64. Biervert C, Steinlein OK. *Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions.* Hum Genet. 1999; 104:234-240.
65. Biervert C, Schroeder BC et al. *A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy.* Science 1998; 279:403-406.
66. Singh NA, Westenskow P et al. *KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum.* Brain. 2003; 126:2726-37.
67. Claes LR, Ceulemans B et al. *De novo KCNQ2 mutations in patients with benign neonatal seizures.* Neurology. 2004; 63:2155-8.
68. Yum MS, Ko TS et al. *The first Korean case of KCNQ2 mutation in a family with benign familial neonatal convulsions.* J Korean Med Sci. 2010; 25:324-6.
69. Kato M, Yamagata T et al. *Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation.* Epilepsia. 2013; 54:1282- 1287.
70. Weckhuysen S, Mandelstam S et al. *KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy.* Ann Neurol. 2012; 71:15-25.
71. Ishikawa K, Nagase et al. *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro.* DNA Res. 1997; 4:307-313.
72. Shimojima K, Sugawara et al. *Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy.* J Hum Genet. 201; 56:561-565.

- 73.** Harvey K, Duguid IC et al. The GDP-GTP exchange factor collybistin: as essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci.* 2004; 24:5816-5826.
- 74.** Lesca G, Till M et al. *De novo Xq11.11 microdeletion including ARHGEF9 in a boy with mental retardation, epilepsy, macrosomia, and dysmorphic features.* *Am J Med Genet.* 2011; 155A:1706-1711.
- 75.** Kalscheuer VM, Musante L et al. *A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation.* *Hum Mutat.* 2009; 30:61-8.
- 76.** Nagase T, Kikuno R et al. *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro.* *DNA Res.* 2000; 7:65-73.
- 77.** Wolverson T, Lalande M. *Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins.* *Genomics.* 2001; 76:66-72.
- 78.** Dibbens LM, Tarpey PS et al. *X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment.* *Nature Genet.* 2008; 40:776-781.
- 79.** Marini C, Mei D et al. *Protocadherin 19 mutations in girls with infantile onset epilepsy.* *Neurology.* 2010; 75:646-53.
- 80.** Depienne C, Bouteiller D et al. *Sporadic infantile epileptic encephalopathy caused by mutations in PCDH19 resembles Dravet syndrome but mainly affects females.* *PLoS Genet.* 2009; 5.
- 81.** Jilani A, Ramotar et al. *Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3-prime-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage.* *J Biol Chem.* 1999; 274:24176-24186.
- 82.** Karimi-Busheri, F Daly et al. *Molecular characterization of a human DNA kinase.* *J Biol Chem* 1999; 274:24187-24194.
- 83.** Shen J, Gilmore E et al. *Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair.* *Nature Genet.* 2010; 42:245-249.
- 84.** Ahmed I, Ware H et al. *Primary structure, chromosomal localization, and functional expression of a voltage-gated sodium channel from human brain.* *Proc Nat Acad Sci.* 1992; 89:8220-8224.
- 85.** Kamiya K, KanedaMet al. *A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline.* *J Neurosci.* 2004; 24:2690-2698.
- 86.** Liao Y, Deprez L et al. *Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy.* *Brain.* 2010; 133:1403-1414.
- 87.** Baasch AL, Hüning I et al. *Exome sequencing identifies a de novo SCN2A mutation in a patient with intractable seizures, severe*

intellectual disability, optic atrophy, muscular hypotonia, and brain abnormalities. Epilepsia. 2014;55: 25-9.

- 88.** Hackenberg A, Baumer A et al. *Infantile epileptic encephalopathy, transient choreoathetotic movements, and hypersomnia due to a De Novo missense mutation in the SCN2A gene.* Neuropediatrics. 2014;45:261-4.
- 89.** Heron SE, Crossland KM et al. *Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures.* Lancet. 2002;360:851-2.
- 90.** Berkovic SF, Heron SE et al. *Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy.* Ann Neurol. 2004;55:550-7.
- 91.** Nagase T, Ishikawa K et al. *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.* DNA Res. 1998; 5:31-39.
- 92.** Peruzzi D, Calabrese G et al. *Identification and chromosomal localization by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C-beta-1.* Biochim Biophys. 2000; 1484:175-182.
- 93.** Lo Vasco VR, Calabrese G et al. *Inositide-specific phospholipase C beta1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia.* Leukemia. 2004; 18:1122-1126.
- 94.** Kurian MA, Meyer E et al. *Phospholipase C-beta-1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy.* Brain. 2010; 113:2964-2970.
- 95.** Poduri A Chopra S et al. *Homozygous PLCB1 deletion associated with malignant migrating partial seizures in infancy.* Epilepsia 2012; 58:146-150.
- 96.** Ngoh A, McTague A et al. *Severe infantile epileptic encephalopathy due to mutations in PLCB1: expansion of the genotypic and phenotypic disease spectrum.* Dev Med Child Neurol. 2014;56:1124-8.
- 97.** Plummer NW, Galt J et al. *Exon organization, coding sequence, physical mapping, and polymorphic intragenic markers for the human neuronal sodium channel gene SCN8A.* Genomics. 2012; 54:287-296.
- 98.** Lorincz, A., Nusser, Z. *Molecular identify of dendritic voltage-gated sodium channels.* Science. 2010;328:906-909,.
- 99.** Veeramah KR, O'Brien et al. *De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP.* J Hum Genet. 2012; 90:502-51.
- 100.** Carvill G, Heavin SB et al. *Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1.* Nat Genet. 2013 Jul;45(7):825-30.

- 101.** Ohba C, Kato M et al. *Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations.* Epilepsia. 2014; 55: 994–1000
- 102.** Barcia G, Fleming M et al. *De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy.* Nature Genet. 2012; 44:1255-1259.
- 103.** Coppola G. *Malignant migrating partial seizures in infancy.* Handb Clin Neurol. 2013;111:605-9.
- 104.** De Filippo MR, Rizzo F et al. *Lack of pathogenic mutations in six patients with MMPSI.* Epilepsy Res. 2014; 108:340-4.
- 105.** Suls A, Jaehn JA et al. *De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome.* Am J Hum Genet. 2013; 93:967-75.
- 106.** Chénier S, Yoon G et al. *CHD2 haploinsufficiency is associated with developmental delay, intellectual disability, epilepsy and neurobehavioural problems.* J Neurodev Disord. 2014;6:9.
- 107.** Berryer M, Hamdan et al. *Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism, and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency.* Hum Mutat. 2013; 34:385-394.
- 108.** Aceti M, Creson TK et al. *Syngap1 Haploinsufficiency Damages a Postnatal Critical Period of Pyramidal Cell Structural Maturation Linked to Cortical Circuit Assembly.* Biol Psychiatry. 2014; pii: S0006-3223(14)00593-9.
- 109.** Marshall CR, Young EJ et al. *Infantile spasms is associated with deletion of the MAGI2 gene on chromosome 7q11.23-q21.11.* J Hum Genet. 2008; 23:106-111.
- 110.** Rothlisberger B, Hoigne I et al. *Deletion of 7q11.21-q11.23 and infantile spasms without deletion of MAGI2.* Am J Med Genet A. 2010;152A:434-7.
- 111.** Mills PB, Struys E et al. *Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures.* Nature Med. 2006; 12:307-309.
- 112.** Mills PB, Footitt EJ et al. *Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency).* Brain. 2010; 133:2148-59.
- 113.** Coulter-Mackie MB, Tiebout S et al. *Overexpression of recombinant human antiquitin in E. coli: Partial enzyme activity in selected ALDH7A1 missense mutations associated with pyridoxine-dependent epilepsy.* Mol Genet Metab. 2014;111:462-6.
- 114.** Kang JH, Hong et al. *Genomic organization, tissue distribution and deletion mutation of human pyridoxine 5-prime-phosphate oxidase.* Biochem. 2004; 217:2452-246.

- 115.** Mills PB, Surtees RA et al. *Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 5-prime-phosphate oxidase.* Hum Molec Genet. 2005; 14:1077-1086.
- 116.** Mills, PB, Camuzeaux S et al. *Epilepsy due to PNPO mutations: genotype, environment and treatment affect presentation and outcome.* Brain : A Journal of Neurology. 2014; 137:1350-60.
- 117.** Lestienne P. *Evidence for a direct role of the DNA polymerase gamma in the replication of the human mitochondrial DNA in vitro.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; 146:1146-1153.
- 118.** Lamantea E, Tiranti V et al. *Mutations of mitochondrial DNA polymerase gamma-A are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia.* Ann. Neurol. 2002; 52:211-219.
- 119.** Van Goethem G, Dermaut B et al. *Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions.* Nat Genet. 2001;28:211-2.
- 120.** Mancuso M, Filosto M et al. *POLG mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness.* Neurology. 2004 27;62:316-8.
- 121.** Naviaux RK, Nguyen KV. *POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion.* Ann Neurol. 2004;55:706-12.
- 122.** Woodbridge P, Liang C et al. *POLG mutations in Australian patients with mitochondrial disease.* Intern Med J. 2013;43:150-6.
- 123.** Isohanni P, Hakonen AH et al. *POLG1 manifestations in childhood.* Neurology. 2011;76:811-5.
- 124.** Kramer U. *Epilepsy in the First Year of Life: A Review.* J Child Neurol. 1999 Aug;14:485-9.
- 125.** Zara F, Specchio N et al. *Genetic testing in benign familial epilepsies of the first year of life: clinical and diagnostic significance.* Epilepsia.2013; 54:425-36.
- 126.** Plouin P, Anderson VE. *Benign familial and non-familial neonatal seizures.* In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P (eds) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence.* Mountrouge: John Libbey Eurotext. 2005.
- 127.** Heron SE, Cox K et al. *Deletions or duplications in KCNQ2 can cause benign familial neonatal seizures.* J Med Genet. 2007; 44:791-6.
- 128.** Delmas P, Brown DA. *Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels.* Nat Rev Neurosci. 2005; 6:850-62.
- 129.** Herlenius E, Heron SE et al. *SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum.* Epilepsia. 2007; 48:1138-42.

130. Vigeveno F. *Benign familial infantile seizures*. Brain Dev. 2005; 27:172-7.
131. Specchio N, Terracciano A et al. *PRRT2 is mutated in familial and non-familial benign infantile seizures*. Eur J Paediatr Neurol. 2013;17:77-81.
132. Schubert J, Paravidino R et al. *PRRT2 mutations are the major cause of benign familial infantile seizures*. Hum Mutat. 2012; 33:1439-43.
133. Vanmolko KR, Kors EE et al. *Novel mutations in the Na⁺, K⁺- ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions*. Ann Neurol. 2003; 54:360-6.
134. Scheffer IE, Bhatia KP et al. *Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a distinctive clinical disorder*. Brain. 1995; 118:61-73.
135. Chen Y, Wu L et al. *A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy*. Epilepsy Res. 2009; 83:152-6.
136. Liu H, Lu C et al. *The identification of a novel mutation of nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNB2 in a Chinese patient: Its possible implication in non-familial nocturnal frontal lobe epilepsy*. Epilepsy Res. 2011; 95:94-9.
137. Aridon P, Marini C et al. *Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear*. Am J Hum Genet. 2006; 79:342-50.
138. Aminkeng F. *KCNT1 mutations in ADNFLE and MMPSI: a new driver in the etiology and pathophysiology of early-onset epileptic syndromes*. Clin Genet. 2013; 83:319-20.
139. Michelucci R, Poza JJ et al. *Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epitempin mutations, and genetic heterogeneity in seven European families*. Epilepsia. 2003; 44:1289-97.
140. Kalachikov S, Evgrafov O et al. *Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features*. Nat Genet. 2002; 30:335- 41.
141. Ottman R, Winawer MR et al. *LGI1 mutations in autosomal dominant partial epilepsy with auditory features*. Neurology. 2004; 13:1120-6.
142. Chernova OB, Somerville RP et al. *A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and down-regulated in malignant brain tumors*. Oncogene. 1998; 17:2873-81.
143. Scheel H, Tomiuk S et al. *A common protein interaction domain links two recently identified epilepsy genes*. Hum Mol Genet. 2002; 11:1757-62.
144. Skradski SL, Clark AM et al. *A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy*. J Neuron. 2001; 31:537-44.
145. Dibbens LM, de Vries B et al. *Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci*. Nat Genet. 2013; 45:546-51.

146. Klein KM, O'Brien TJ et al. *Familial focal epilepsy with variable foci mapped to chromosome 22q12: expansion of the phenotypic spectrum.* *Epilepsia.* 2012; 53:151-5.
147. Martin C, Meloche C et al. *A recurrent mutation in DEPDC5 predisposes to focal epilepsies in the French-Canadian population.* *Clin Genet.* 2013; 86:570-4.
148. Sadleir LG, Scheffer IE. *Febrile seizures.* *BMJ.* 2007; 334:307-11.
149. Maher J, McLachlan RS. *Febrile convulsions. Is seizure duration the most important predictor of temporal lobe epilepsy?* *Brain.* 1995; 118:1521-8.
150. Baulac S, Gourfinkel-An I et al. *Fever, genes, and epilepsy.* *Lancet Neurol.* 2004; 3:421-30.
151. Annegers JF, Hauser WA et al. *The risk of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy.* *Neurology.* 1982; 32:174-79.
152. Berkovic SF, Howell RA et al. *Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsies syndromes.* *Ann Neurol.* 1998; 43:435-45.
153. Klassen T, Davis C et al. *Exome sequencing of ion channel genes reveals complex profiles confounding personal risk assessment in epilepsy.* *Cell.* 2011; 145:1036-48.
154. Sander T, Schulz H et al. *Genome search for susceptibility loci of common generalized epilepsies.* *Hum Mol Genet.* 2000;9:1465-72.
155. Durner M, Keddache MA et al. *Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type.* *Ann Neurol.* 2001; 49:328-35.
156. Cossette P, Liu L et al. *Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy.* *Nat Genet.* 2002; 31:184-9.
157. D'Agostino D, Bertelli M et al. *Mutations and polymorphisms of the CLCN2 gene in idiopathic epilepsy.* *Neurology.* 2004; 63:1500-2.
158. Dibbens LM, Feng HJ et al. *GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies.* *Hum Mol Genet.* 2004; 13:1315-19.
159. Greenberg DA, Cayanis E et al. *Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy.* *J Hum Genet.* 2003; 76:139-46.
160. Pal DK, Evgrafov OV et al. *BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy.* *J Hum Genet.* 2003; 261-70.
161. Dibbens LM, Ekberg J et al. *NEDD4-2 as a potential candidate susceptibility gene for epileptic photosensitivity.* *Genes Brain Behav.* 2007; 750-5.

- 162.** Guerrini R, Carrozzo R. *Epilepsy and genetic malformations of the cerebral cortex*. Am J Med Genet. 2001; 160-73.
- 163.** Barkovich AJ, Kuzniecky RI et al. *A developmental and genetic classification for malformations of cortical development*. Neurology. 2005; 1873-87.
- 164.** Kolodny EH, Sathe S. *Lysosomal disorders and Menkes syndrome*. In: Shorvon SD, Andermann F, Guerrini R (eds) *The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adults and Children*. Cambridge University Press. 2011; 206-11.
- 165.** Donati MA, Guerrini R et al. *Organic acid, amino acids and peroxisomal disorders*. In: Shorvon SD, Andermann F, Guerrini R (eds) *The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adults and Children*. Cambridge University Press. 2011;216-30.
- 166.** Plecko B, Paul K et al. *Biochemical and molecular characterization of 18 patients with pyridoxine-dependent epilepsy and mutations of the antiquitin (ALDH7A1) gene*. Hum Mutat. 2007;19-26
- 167.** Sadilkova K, Gospe SM Jr et al. *Simultaneous determination of alpha-amino adipic semialdehyde, piperidine-6-carboxylate and pipercolic acid by LC-MS/MS for pyridoxine-dependent seizures and folinic acid-responsive seizures*. J Neurosci Methods. 2009; 136-41.
- 168.** Seidner G, Alvarez MG et al. *GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier*. Nat Genet. 1998;188-91.
- 169.** De Vivo DC, Trifiletti RR et al. *Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay*. N Eng J Med. 1991; 325:703-9.
- 170.** Suls A, Dedeken P et al. *Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1*. Brain. 2008; 131:1831-44.
- 171.** Mullen SA, Marini C et al. *Glucose transporter 1 deficiency as a treatable cause of myoclonic astatic epilepsy*. Arch Neurol. 2011; 68:1152-5.
- 172.** Brodtkorb E, Picard F. *Tobacco habits modulate autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Epilepsy Behav. 2006; 9:515-520.
- 173.** Hoffmann GF, Schmitt B et al. *Pyridoxal 5'-phosphate may be curative in early-onset epileptic encephalopathy*. J Inherit Metab Dis. 2007; 30:96-99.
- 174.** Gospe SM. *Pyridoxine-dependent epilepsy*. In: Shorvon S, Andermann F, Guerrini R (eds) *The causes of epilepsy*. Cambridge University Press, Cambridge, 2011; pp 237-241.
- 175.** Gallagher RC, Van Hove JL et al. *Folinic acid-responsive seizures are identical to pyridoxine-dependent epilepsy*. Ann Neurol. 2009; 65:550-556.

176. Nickels K, Wirrell E. *GLUT1-ous maximus epilepticus: the expanding phenotype of GLUT-1 mutations and epilepsy*. Neurology 2010; 75:390–391.
177. Klepper J. *GLUT1 deficiency syndrome in clinical practice*. Epilepsy Res 2012; 100:272–277.
178. Brockmann K. *The expanding phenotype of GLUT1-deficiency syndrome*. Brain Dev 2009; 31:545–552.
179. Striano P, Weber YG et al. *GLUT1 mutations are a rare cause of familial idiopathic generalized epilepsy*. Neurology 2012; 78:557–562.
180. Suls A, Mullen SA et al. *Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1*. Ann Neurol 2009; 66:415–419.
181. Kasperaviciute D, Sisodiya SM. *Epilepsy pharmacogenetics*. Pharmacogenomics 2009;10:817–836.
182. Tate SK, Depondt C, Sisodiya SM et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:5507–5512.
183. Zimprich F, Stogmann E. et al. *A functional polymorphism in the SCN1A gene is not associated with carbamazepine dosages in Austrian patients with epilepsy*. Epilepsia 2008;49:1108–1109.
184. Manna I, Gambardella A, Bianchi A et al. *A functional polymorphism in the SCN1A gene does not influence antiepileptic drug responsiveness in Italian patients with focal epilepsy*. Epilepsia 2011;52:40–44.
185. Bournissen FG, Moretti ME et al. *Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: a meta-analysis*. Epilepsia 2009; 50:898–903.
186. Maxam AM, Gilbert W. *A new method for sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74:560–4.
187. Sanger F, Nicklen S et al. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA; 1977; 74:546–7.
188. Wheeler DA, Srinivasan M et al. *The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing*. Nature. 2008; 452:872-6.
189. Shendure J, Porreca GJ et al. *Molecular biology: accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome*. Science. 2005; 309:1728-1732.
190. Margulies M, Egholm M et al. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*. Nature.2005; 437:376-380.
191. Berka J, Chen YJ et al. *Bead emulsion nucleic acid amplification*. U.S. Patent Application. 2005.
192. Mardis ER. *The impact of next-generation sequencing technology on genetics*. Trends in Genetics. 2008; 24:133-141.

- 193.** Lin L, Yinhu L et al. *Comparison of Next-Generation Sequencing Systems*. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:251364.
- 194.** Timp W, Mirsaidov M et al. *Nanopore sequencing: electrical measurements of the code of life*. IEEE Transactions on Nanotechnology. 2010; 9:281-294.
- 195.** Song L, Hobaugh MR et al. *Structure of staphylococcal hemolysin, a heptameric transmembrane pore*. Science. 1996; 274:1859-1866.
- 196.** Yamashita S, Chiyonobu T et al. *Successful treatment with levetiracetam in a case of Ohtahara syndrome caused by STXBP1 mutation*. No To Hattatsu. 2013;45:64-6.
- 197.** Saitsu H, Kato M et al. *STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern*. Epilepsia. 2010;51:2397-405.
- 198.** Epi4K Consortium; Epilepsy Phenome/Genome Project *De novo mutations in epileptic encephalopathies*. Nature. 2013;501:217-21.
- 199.** Milh M, Boutry-Kryza N et al. *Similar early characteristics but variable neurological outcome of patients with a de novo mutation of KCNQ2*. Orphanet J Rare Dis. 2013;8:80.
- 200.** Allen NM, Mannion M, Conroy J, Lynch SA, Shahwan A, Lynch B, King MD. *The variable phenotypes of KCNQ-related epilepsy*. Epilepsia. 2014 Sep;55(9):e99-105.
- 201.** Amir RE, Van den Veyver IB et al. *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2*. Nat Genet. 1999;23:185-8.
- 202.** Yusufzai TM, Wolffe AP. *Functional consequences of Rett syndrome mutations on human MeCP2*. Nucleic Acids Res. 2000;28:4172-9.
- 203.** Knight O, Bebbington A et al. *Pubertal trajectory in females with Rett syndrome: a population-based study*. Brain Dev. 2013;35:912-20.
- 204.** Mei D, Darra F et al. *Optimizing the molecular diagnosis of CDKL5 gene-related epileptic encephalopathy in boys*. Epilepsia. 2014;55:1748-53.
- 205.** Scheffer IE, Wallace RH et al. *X-linked myoclonic epilepsy with spasticity and intellectual disability: mutation in the homeobox gene ARX*. Neurology. 2002;59:348-56.
- 206.** Plecko B, Paul K et al. *Pyridoxine responsiveness in novel mutations of the PNPO gene*. Neurology. 2014;82:1425-33
- 207.** Michaud JL, Lachance M et al. *The genetic landscape of infantile spasms*. Hum Mol Genet. 2014;23:4846-58.
- 208.** Van Goethem G, Luoma P et al. *POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement*. Neurology. 2004;63:1251-7.

- 209.** Uusimaa J, Gowda V et al. *Prospective study of POLG mutations presenting in children with intractable epilepsy: prevalence and clinical features.* *Epilepsia.* 2013;54:1002-11
- 210.** Vanmolkot KR, Kors EE et al. *Two de novo mutations in the Na,K-ATPase gene ATP1A2 associated with pure familial hemiplegic migraine.* *Eur J Hum Genet.* 2006;14:555-60.
- 211.** Larsen J, Carvill GL et al. *The phenotypic spectrum of SCN8A encephalopathy.* *Neurology.* 2015 [Epub ahead of print]
- 212.** Lemke JR, Riesch E et al. *Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders.* *Epilepsia.* 2012;53:1387-98.
- 213.** Kodera H, Kato M et al. *Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy.* *Epilepsia.* 2013;54:1262-9.
- 214.** Della Mina E, Ciccone R et al. *Improving molecular diagnosis in epilepsy by a dedicated high-throughput sequencing platform.* *Eur J Hum Genet.* 2014 [Epub ahead of print]
- 215.** Wang J, Gotway G et al. *Diagnostic yield of clinical next-generation sequencing panels for epilepsy.* *JAMA Neurol.* 2014;71:650-1.
- 216.** Parihar R, Ganesh S. *The SCN1A gene variants and epileptic encephalopathies.* *J Hum Genet.* 2013;58:573-80.
- 217.** Ogiwara I, Ito K et al. *De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies.* *Neurology.* 2009;73:1046-53.
- 218.** Venkateswaran S, McMillan HJ et al. *Adolescent onset cognitive regression and neuropsychiatric symptoms associated with the A140V MECP2 mutation.* *Dev Med Child Neurol.* 2014;56:91-4.
- 219.** Stopińska K, Grzybowski T et al. *Optimization of the Y831C mutation detection in human DNA polymerase gamma by allelic discrimination assay.* *Acta Biochim Pol.* 2006;53:591-5.
- 220.** Mefford HC, Yendle SC et al. *Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies.* *Ann Neurol.* 2011;70:974-85.
- 221.** Strauss KA, Puffenberger EG et al. *Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2.* *N Engl J Med.* 2006;354:1370-7.
- 222.** Lambert L, Bienvenu T et al. *MEF2C mutations are a rare cause of Rett or severe Rett-like encephalopathies.* *Clin Genet.* 2012;82:499-501.
- 223.** Lesca G, Rudolf G et al. *GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction.* *Nat Genet.* 2013;45:1061-6.
- 224.** Lemke JR, Hendrickx R et al. *GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy.* *Ann Neurol.* 2014;75:147-54.