



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2017
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente:

Associazione La Nostra Famiglia – IRCCS “Eugenio Medea”

Codice fiscale: 00307430132

Sede legale: Via Don Luigi Monza n. 1 – Ponte Lambro (Co)

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: segreteria.scientifica@pec.emedea.it

Dati del rappresentante legale: Luisa Minoli nata il 14.01.1968 a Busto Arsizio (Va)
– CF: MNLLSU68A54B300V

Titolo del progetto - Eziologia genetica delle Epilessie: il contributo del sequenziamento dell'esoma in una casistica estremamente selezionata

Introduzione: L'eziologia è uno dei parametri fondamentali per classificare le diverse sindromi epilettiche; e' stato per questo inserito anche nello schema di Classificazione Internazionale delle Epilessie (E). In circa il 30% dei casi tuttavia l'eziologia delle E rimane imprecisata. Si parla allora di Epilessie Criptogeniche (EC). Negli ultimi anni l'evoluzione delle metodiche di analisi genetica: Array-CGH, sequenziamenti massivi paralleli (Next Generation Sequency; NGS), sequenziamenti dell'esoma (WES) e del genoma (WGS), hanno permesso di incrementare in modo significativo la possibilità di individuare l'eziologia genetica delle E, riducendo così la percentuale delle EC.

Il nostro studio si proponeva di sottoporre a WES una serie di pazienti affetti da EC di cui erano stati dettagliatamente raccolti i dati anamnestici, elettroencefalografici, clinici, terapeutici e in cui in cui l'eziologia dell'E era rimasta imprecisata.

Abstract dei risultati ottenuti:

Abstract dei risultati ottenuti:

Su 15 pazienti affetti da EC studiati in 11 si è riusciti ad individuare la causa genetica delle loro E.

In particolare sono state individuate mutazioni causative nei geni: ALG8, MPP5 (dato in via di pubblicazione), ACO2 (2 pazienti), RERE, TNK2, LAMA2, DNM1L (dato pubblicato), SCN2A (dato pubblicato), SCN1A, PHF21A.

Meritano particolare menzione e i dati ricavati in due pazienti gemelli monozigoti entrambi affetti da ritardo nelle acquisizioni dello sviluppo psico-motorio, quadro di atassia esordio nella prima infanzia, crisi epilettiche, ipovisus insorto nella seconda infanzia.

I pazienti erano stati sottoposti a diversi screening metabolici ed analisi di mutazioni per geni associati a patologie degenerative, tutti risultatati negativi.

I dati RMN evidenziavano un aspetto ipotrofico del chiasma e dei nervi ottici ed una modesta atrofia degli emisferi cerebellari.

L'analisi dell'esoma ha permesso di evidenziare una mutazione de novo nel gene ACO2. L'aconitasi 2 (ACO2) codifica per l'aconitasi mitocondriale (ACO2), un enzima che catalizza l'interconversione del citrato in isocitrato nel ciclo di Krebs. Le mutazioni di ACO2 sono state inizialmente associate alla degenerazione cerebellare-retinica infantile combinando atrofia ottica, degenerazione retinica, grave encefalopatia, epilessia e atassia cerebellare.

Un altro caso particolarmente significativo esaminato è quello relativo a un paziente maschio di 44 anni seguito, presso il nostro IRCCS sin dall'età di 4 anni ed affetto da una forma di epilessia caratterizzata da crisi miocloniche, cloniche, crisi focali con secondaria generalizzazione, farmaco-resistenti, mioclono non epilettico, tremore, grave disabilità intellettiva, tratti dismorfici facciali lievi e psicosi.

Le indagini di laboratorio, metaboliche e neuroradiologiche non avevano fornito dati di valore eziologico significativo.

E' stata rilevata in questo paziente all'analisi del sequenziamento dell'esoma una nuova mutazione troncante "de novo" nel gene MPP5 (p.Ser498Phefs*15).

La proteina di membrana palmitoilata 5 (MPP5) è una proteina complessa apicale altamente conservata, essenziale per la polarità cellulare. I difetti nella polarità delle cellule neuronali sono associati a disturbi neurologici. Erano stati segnalati solo tre pazienti con varianti eterozigoti de novo di MPP5, con ritardo dello sviluppo globale, cambiamenti comportamentali e in un solo caso crisi epilettiche.

Il nostro dato oltre a consentire la precisazione dell'eziologia complessiva del quadro clinico ha permesso di descrivere in dettaglio il fenotipo epilettico e le caratteristiche elettroencefalografiche dell'encefalopatia, sfruttando la consistente mole dei dati clinici ed EEG raccolti in oltre 30 anni di follow-up.

E' stato così possibile fornire la prima descrizione completa della sindrome epilettica associata a mutazioni del gene MPP5 e dimostrare la necessità di inserire questo gene nei pannelli NGS per l'analisi di mutazioni geniche dedicati alle Epilessie Criptogeniche e alle Encefalopatie dello sviluppo.

Sempre all'interno di questo studio è stata rilevata una mutazione relativa al gene LAMA2. La mutazione è stata individuata in una paziente affetta da: distrofia muscolare, epilessia focale sintomatica da malformazione dello sviluppo corticale.

In questo particolare caso, risultato precedentemente negativo a tutte le analisi genetiche effettuate, in assenza di familiarità dichiarata/certa, l'analisi è eseguita considerando in prima istanza, un modello di trasmissione autosomico recessivo, X-linked, o dominante de novo. L'analisi è focalizzata sui geni malattia correlati alle caratteristiche cliniche della probanda. In particolare le delezioni in eterozigosi composta identificate nel gene LAMA2, potevano ragionevolmente essere considerate causative del quadro clinico osservato nella probanda.

In prima istanza sono state ricercate e analizzate variazioni puntiformi di sequenza e in questo caso non è stata identificata nessuna variante di significato patologico correlabile con il quadro clinico.

L'analisi è proseguita con la ricerca di delezioni e/o riarrangiamenti.

Sono state identificate due delezioni intrageniche nel gene LAMA2 presenti in eterozigosi composta:

Allele 1: Delezione degli esoni 2-4 del gene LAMA2 ; di origine materna

Allele 2: Delezione degli esoni 8-11 del gene LAMA2 ; di origine paterna

Il gene LAMA2 è mutato in una forma recessiva congenita di distrofia muscolare con deficit parziale o totale di merosina tipo 1A (MIM# 607855) (Nature Genet. 11: 216-218, 1995; Arch. Neurol. 62: 1582-1586, 2005) e nella forma recessiva di distrofia muscolare dei cingoli, tipo 23 (MIM# 618138) (LGMDR23) (Muscle Nerve 44: 703-709, 2011). In letteratura è nota una delezione frequente, che coinvolge l'esone 56 del gene (Clin. Genet. 74: 502-512, 2008). Il gene LAMA2 codifica per la subunità alfa-2 del complesso proteico extracellulare eterotrimerico chiamato laminina-211, oppure laminina-2 o merosina. Le restanti subunità del complesso eterotrimerico, sono la beta-1 o LAMB1 e la

gamma-1, originariamente chiamata beta-2 (LAMC1). Laminina-211 lega i residui glicosilati dell'alfa distroglicano (DAG1) nelle fibre muscolari. Laminina-211 è espressa in diversi tessuti, in particolare nelle cellule di Schwann nel nervo periferico e nel cervello (Hum. Mutat. 39: 1314-1337, 2018).

Molto particolare e degno di segnalazione è anche il risultato ottenuto su una paziente di 20 anni seguita presso il nostro IRCCS dall'età di 6 con una storia di due stati epilettici focali mioclonici superrefrattari manifestatisi come epilessia parziale continua (EPC) con un intervallo di 13 anni, durante i quali la paziente ha mostrato moderata disabilità intellettiva, reintegrazione sociale e scolastica, senza il controllo completo delle manifestazioni miocloniche. Il primo stato, verificatosi all'età di sei anni, era associato a un transitorio interessamento talamico sinistro della risonanza magnetica cerebrale, mentre nel secondo si osservava un'iperintensità transitoria dei gangli della base destra. Dopo il secondo stato, è perdurato uno stato vegetativo persistente con epilessia parziale continua resistente ai farmaci e mioclono reticolare; la risonanza magnetica ha mostrato una progressiva atrofia cerebrale.

La paziente all'analisi dell'esoma è risultata portatrice di una mutazione "de novo" nel gene DNM1L. Dynamin-1-like (DNM1L) è un gene situato sul cromosoma 12p11.21, che codifica per la proteina correlata alla dinamina (DRP1), una GTPasi coinvolta nella fusione mitocondriale e perossisomiale, che svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo del cervello. La variante missenso p.Arg403Cys è clinicamente associata allo stato epilettico super-refrattario ad esordio infantile, con conseguente esito neurologico sfavorevole o morte (10 pazienti descritti).

Il nostro caso quindi è un nuovo caso di encefalopatia evolutiva ed epilettica correlata a DNM1L ad esordio infantile con una progressione clinica bifasica, in contrasto con i precedenti casi pubblicati.

Le caratteristiche principali della nostra paziente sono EPC, stato epilettico super-refrattario, con iperintensità MRI talamica subcorticale transitoria e migrante all'esordio. La precisa caratterizzazione delle crisi epilettiche e il sequenziamento dell'intero esoma sono determinanti per rendere sempre più possibile la diagnosi precoce. Fattori protettivi epigenetici e/o terapeutici, attualmente sconosciuti e che richiedono ulteriori studi, potrebbero spiegare questo insolito decorso clinico.

Infine Le varianti patogene del gene SCN2A (MIM 182390) sono state associate a diverse sindromi epilettiche che vanno dalle crisi epilettiche neonatali familiari benigne (BFNIS) all'encefalopatia epilettica infantile precoce.

Lo studio dell'esoma ha permesso di individuare in un paziente affetto da una sindrome epilettica criptogenetica una variante "de novo" in questo gene e di inserirlo nella nostra casistica di pazienti con epilessia in cui sono state identificate varianti "de novo" del gene SCN2A al fine di specificare il possibile spettro delle caratteristiche cliniche.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti evidenziano l'eterogeneità fenotipica di SCN2A. In effetti, tre pazienti su cinque hanno mostrato una sindrome epilettica focale associata a disabilità intellettiva (ID) con diverso grado di gravità o disturbi dello spettro autistico (ASD), con uno di loro che mostrava un'epilessia atipica a esordio tardivo finora non segnalata. Due pazienti hanno mostrato un'encefalopatia epilettica neonatale dovuta alla stessa mutazione con guadagno di funzione.

Il quadro clinico dei nostri pazienti SCN2A suggerisce che il danno neurologico potrebbe non essere direttamente correlato alla gravità del pattern elettroclinico, pur essendo probabilmente dovuto all'effetto della mutazione stessa.

Nel complesso, i nostri risultati sottolineano la rilevanza dello screening mutazionale SCN2A nei casi di ID/ASD anche senza epilessia.

L'insieme dei nostri dati dimostrano che l'individuazione della causa è premessa significativa oltre che per la corretta consulenza genetica anche per individuare i meccanismi patogenetici delle sindromi epilettiche e poter impostare nel modo più corretto l'azione terapeutica farmacologica, rivolta all'E e riabilitativa, sulla disabilità

intellettiva associata.

Materiali e Metodi: sono stati sottoposti a WES 15 pazienti seguiti presso il Centro Regionale per l'Epilessia del nostro IRCCS affetti da EC. Nei casi in cui è stata l'analisi è stata eseguita anche sui genitori (trio) per confermare il sicuro valore causale.

Risultati: l'analisi ha consentito di individuare in 11 pazienti varianti genetiche considerate significative dal punto di vista patogenetico.

Conclusioni:

Lo studio ha premesso di individuare in 11 pazienti la causa genetica della loro E. Questo risultato consente di migliorare la comprensione della patogenesi, di precisare meglio gli aspetti prognostici e migliorare le strategie terapeutiche, in particolare per le forme refrattarie.

Epifanio R et Al. *Brain Sci* 2021 Dec 24;12(1):18.

[Minghetti S](#) et Al. *Epileptic Disord.* 2022 Feb 1;24(1):176-182.

Zanotta N et Al. *Seizure* (submitted)

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

Epifanio R, Giorda R, Merlano MC, Zanotta N, Romaniello R, Marelli S, Russo S, Cogliati F, Bassi MT, Zucca C.

SCN2A Pathogenic Variants and Epilepsy: Heterogeneous Clinical, Genetic and Diagnostic Features

Brain Sci 2021;12(1):18. doi: 10.3390/brainsci12010018.

[Minghetti S](#), [Giorda R](#), [Mastrangelo M](#), [Tassi L](#), [Zanotta N](#), [Galbiati S](#), [Bassi MT](#), [Zucca C](#).

Epilepsia partialis continua associated with the p.Arg403Cys variant of the DNM1L gene: an unusual clinical progression with two episodes of super-refractory status epilepticus with a 13-year remission interval

Epileptic Disord. 2022 Feb 1;24(1):176-182. doi: 10.1684/epd.2021.1375.

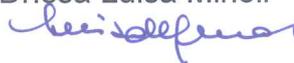
Zanotta N, Panzeri E, Minghetti S, Citterio A, Giorda R, Marelli S, Bassi MT*, Zucca C*. *Membrane Protein Palmitoylated 5 (MPP5) encephalopathy: a novel de novo truncating mutation associated with epilepsy, intellectual disability and psychosis.*

Seizure (submitted)

Data, 30/12/2022

Il Responsabile del Progetto
Dr. Claudio Zucca

Il Legale Rappresentante
Dr.ssa Luisa Minoli



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante
Dr.ssa Luisa Minoli

