

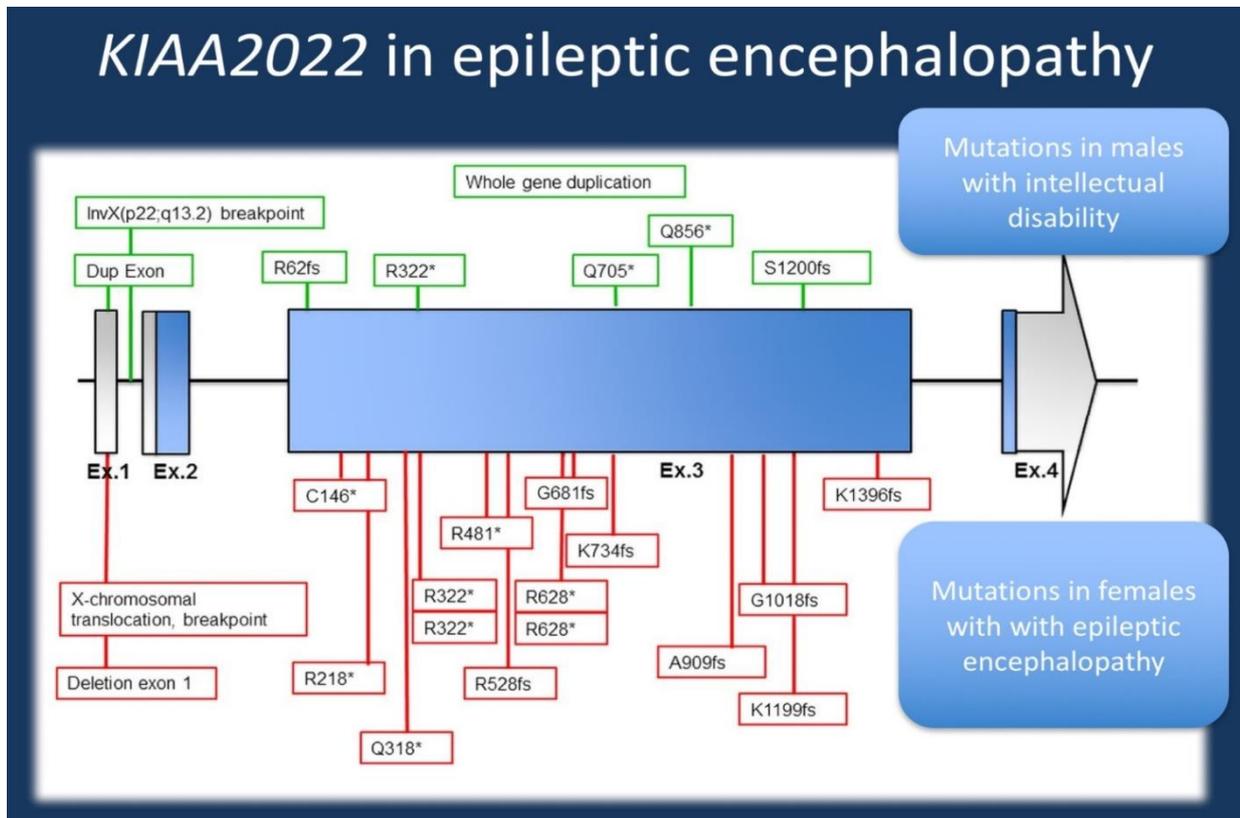
Razionale ed overview della malattia

La velocità della scoperta dei geni nelle epilessie umane a volte è così veloce che la genetica batte la biologia. Alcuni geni sono implicati nella malattia più velocemente della nostra capacità di nominarli. In una recente pubblicazione, descriviamo il fenotipo dell'epilessia di un gene legato all'X che è conosciuto solo da un identificatore che indica quanto poco ne sappiamo: KIAA2022. Contrariamente a un fenotipo nei maschi che è principalmente caratterizzato da disabilità intellettiva, mutazioni de novo in KIAA2022 nelle femmine provocano epilessia mioclonica intrattabile. In una recente pubblicazione di de Lange e collaboratori, sono stati delineati i fenotipi delle bimbe portatrici di mutazioni con perdita di funzione in KIAA2022, un gene precedentemente noto solo per causare disabilità intellettiva nei maschi.

Il fenotipo KIAA2022/NEXMIF

Nella pubblicazione di de Lange e collaboratori, sono descritti 14 pazienti di sesso femminile con encefalopatia KIAA2022. 12/14 pazienti avevano epilessia, che era principalmente caratterizzata da crisi miocloniche, crisi di assenza e crisi tonico-cloniche generalizzate. Nella maggior parte dei pazienti con epilessia, le crisi si sono rivelate refrattarie a più farmaci antiepilettici. Le crisi epilettiche di solito sono iniziate nell'infanzia o nella prima infanzia, che possono aver dato luogo all'inclusione di pazienti KIAA2022 in una coorte di pazienti con fenotipi simili a MAE. 13/14 ragazze con encefalopatia KIAA2022 presentavano disabilità intellettiva da lieve a grave. In 6/13 pazienti, il ritardo dello sviluppo ha preceduto l'inizio dell'epilessia. 10 pazienti avevano importanti problemi comportamentali tra cui autismo, aggressività e iperattività. Dato che alcune donne hanno iniziato con problemi di sviluppo solo

dopo l'inizio delle convulsioni nei primi anni di vita, questa osservazione clinica rafforza l'idea che il fenotipo femminile KIAA2022 non sia solo una sindrome da disabilità intellettiva con epilessia lieve, ma un'encefalopatia epilettica in cui è evolutiva il ristagno o la regressione sono correlati al verificarsi di convulsioni.



Posizione delle mutazioni nelle mutazioni KIAA2022 in pazienti di sesso femminile (riquadri inferiore / rosso) e mutazioni precedentemente segnalate in pazienti di sesso maschile (riquadri in alto / verdi). Le regioni non tradotte sono indicate dal colore grigio e le regioni di codifica sono indicate dal colore blu. Adattato dalla pubblicazione di de Lange e collaboratori sotto una licenza Creative Commons Attribution (CC BY 4.0).

Mutazioni nel gene KIAA2022 sono state precedentemente identificate come causa di grave disabilità intellettiva legata all'X nei maschi, a volte con caratteristiche dismorfiche. Nei maschi, ci sono poche prove che questo gene sia coinvolto nell'epilessia o nelle convulsioni. Pertanto, la scoperta che le varianti con perdita di funzione in KIAA2022 provocano un'epilessia mioclonica difficile da trattare è sorprendente. Di solito, con condizioni legate all'X, ci aspetteremmo un fenotipo più lieve nelle femmine, se del tutto fenotipo. La disabilità intellettiva nelle donne portatrici di mutazioni con perdita di funzione KIAA2022 si adatta a questo modello, ma

l'epilessia è insolita. Nella nostra pubblicazione, abbiamo tracciato il parallelo con PCDH19, un gene correlato a un'encefalopatia epilettica nelle femmine in cui i maschi portatori di mutazione non sono interessati. In PCDH19, c'è l'ipotesi che l'effetto patogeno sia dovuto a un processo chiamato interferenza cellulare, la miscela di cellule neuronali con e senza la proteina PCDH19 durante lo sviluppo. Si può ipotizzare che l'effetto patogeno di KIAA2022 possa essere dovuto a un meccanismo simile. Questo è rilevante in quanto si sa molto poco su KIAA2022, altre alcune prove che possono essere espresse nei neuriti nel sistema nervoso in crescita.

Una svolta nella storia di KIAA2022 è stata la natura delle varianti con perdita di funzione nel database ExAC. Di solito, per un gene correlato a una grave malattia ad esordio infantile dovuta all'aploinsufficienza, non ci si aspetterebbe alcuna variante con perdita di funzione nei database della popolazione. ExAC non è un database di controllo puro, ma non contiene disturbi a esordio infantile. Pertanto, la presenza di varianti KIAA2022 in ExAC è sospetta e si sono rivelati esempi interessanti di ciò che possiamo vedere nei database pubblici, che vanno dalle varianti che sfuggono al decadimento mediato dal non senso agli artefatti di sequenziamento. Ad esempio, una singola mutazione troncante (Arg1469 *) si trova nel penultimo esone. È noto che il troncamento delle mutazioni distali in un gene può sfuggire al meccanismo cellulare che cancella i trascritti di mRNA troncati, un meccanismo chiamato decadimento mediato da nonsenso. Si può presumere che la mutazione Arg1469 * dia come risultato una proteina KIAA2022 in cortocircuito che potrebbe essere ancora funzionale. Un'altra variante ExAC, la variante frameshift (Arg1085fs) sembra essere una variante chiamata erroneamente quando si esaminano i file di traccia. Al contrario, questa variante può essere un indel in-frame, un'alterazione genetica non patogena osservata di frequente. Identificare le varianti ExAC come mutazioni di troncamento distale che sfuggono alla NMD o artefatti di allineamento rafforza ulteriormente l'idea che le mutazioni troncanti non siano tollerate in individui sani, aggiungendo ulteriormente il sospetto che questo gene sia causa di malattie.

RAZIONALE E OBIETTIVI DEL PROGETTO DISCOVer

Il progetto DISCOVer si basa sul presupposto che per **curare o, meglio prevenire, sia necessario conoscere le alterazioni genetiche** che modificano il “programma” fisiologico di sviluppo della corteccia cerebrale per poter intervenire in maniera mirata. Infatti le terapie riabilitative e farmacologiche possono nello scenario più ottimistico mitigare i sintomi poiché non dirette a modificare le cause alla base della patologia. **In questo contesto è nato il progetto DISCOVer che si propone di studiare le basi genetiche dei difetti dello sviluppo corticale e esplorare approcci innovativi di medicina personalizzata.**

FASI DEL PROGETTO

Il progetto si è sviluppato in diverse fasi:

FASE 1: DIAGNOSI MOLECOLARE

Obiettivo della prima fase è stato quello di **sviluppare test diagnostici per la diagnosi molecolare precoce**. Tale attività ha consentito di attivare e implementare nell’ambito del Sistema Sanitario Nazionale, presso l’Istituto G. Gaslini di Genova, tre diversi test genetici di nuova generazione.

Tali test si basano sul sequenziamento del DNA ad alta processività e consentono di identificare mutazioni nel DNA in parallelo in numerosi geni il cui ruolo nelle MSC è comprovato.

I test genetici sviluppati sono: Test per le Malformazioni dello Sviluppo Cerebrale (56 geni), Test per la Sclerosi Tuberosa (2 geni), Test per la ricerca di mutazioni somatiche nei geni del pathway dell’MTOR (8 geni).

I test sono oggi pienamente usufruibili in maniera gratuita per tutti i pazienti del territorio nazionale e sono stati ad oggi utilizzati da più di 100 famiglie. Laddove è stata raggiunta una diagnosi **è stato possibile offrire una consulenza genetica mirata e la possibilità di eseguire test molecolari prenatali mirati per la pianificazione familiare e la prevenzione.**

FASE 2: IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENI

35 casi negativi ai test genetici sono stati sottoposti ad uno studio di ricerca avanzato per **l’individuazione di mutazioni in nuovi geni attraverso il sequenziamento dell’”esoma”**, cioè di **tutti i 20.000 geni** codificanti proteine nell’uomo. I dati di questo studio sono ancora in fase di rielaborazione e i risultati saranno disponibili nel corso del 2021.

I dati genetici della coorte di 55 casi verranno analizzati in parallelo e confrontati con i dati di progetti internazionali quali Epi25K per l'identificazione di nuovi geni responsabili di MSC.

FASE 3: SVILUPPO DI TERAPIE INNOVATIVE PER LA CURA PERSONALIZZATA

L'obiettivo è quello di sviluppare approcci terapeutici innovativi mediante le nuove biotecnologie.

La numerosità dei geni coinvolti nelle epilessie severe dell'infanzia e la complessità dei meccanismi fisiologici implicati rappresentano un ostacolo importante verso lo sviluppo di un approccio unificante. In questo contesto abbiamo scelto di esplorare la tecnologia delle sonde molecolari a RNA per **l'attivazione dei geni colpiti da mutazioni che ne determinano una perdita funzionale**. Tali sonde consentono di aumentare la produzione di proteina da parte di del gene "sano" laddove la mutazione genetica colpisce una sola delle due copie geniche, condizione che si riscontra in diverse MSC. Allo stato attuale abbiamo iniziato a produrre sonde molecolari per i geni TSC1 e TSC2 per la sclerosi tuberosa, la forma più comune di difetto di sviluppo corticale.

Bibliografia essenziale

- de Lange IM, Helbig KL, Weckhuysen S, Møller RS, Velinov M, Dolzhanskaya N, Marsh E, Helbig I, Devinsky O, Tang S, Mefford HC, Myers CT, van Paesschen W, Striano P, van Gassen K, van Kempen M, de Kovel CG, Piard J, Minassian BA, Nezarati MM, Pessoa A, Jacquette A, Maher B, Balestrini S, Sisodiya S, Warde MT, De St Martin A, Chelly J; EuroEPINOMICS-RES MAE working group, van 't Slot R, Van Maldergem L, Brilstra EH, Koeleman BP. De novo mutations of KIAA2022 in females cause intellectual disability and intractable epilepsy. *J Med Genet.* 2016 Dec;53(12):850-858
- Lorenzo M, Stolte-Dijkstra I, van Rheenen P, Smith RG, Scheers T, Walia JS. Clinical spectrum of KIAA2022 pathogenic variants in males: Case report of two boys with KIAA2022 pathogenic variants and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2018;176(6):1455-1462.
- Stamberger H, Hammer TB, Gardella E, Vlaskamp DRM, Bertelsen B, Mandelstam S, de Lange I, Zhang J, Myers CT, Fenger C, Afawi Z, Almanza Fuerte EP, Andrade DM, Balcik Y, Ben Zeev B, Bennett MF, Berkovic SF, Isidor B, Bouman A, Brilstra E, Busk ØL, Cairns A, Caumes R, Chatron N, Dale RC, de Geus C, Edery P, Gill D, Granild-Jensen JB, Gunderson L, Gunning B, Heimer G, Helle JR, Hildebrand MS, Hollingsworth G, Kharytonov V, Klee EW, Koeleman BPC, Koolen DA, Korff C, Küry S, Lesca G, Lev D, Leventer RJ, Mackay MT, Macke EL, McEntagart M, Mohammad SS, Monin P, Montomoli M, Morava E, Moutton S, Muir AM, Parrini E, Procopis P, Ranza E, Reed L, Reif PS, Rosenow F, Rossi M, Sadleir LG, Sadoway T, Schelhaas HJ, Schneider AL, Shah K, Shalev R, Sisodiya SM, Smol T, Stumpel CTRM, Stuurman K, Symonds JD, Mau-Them FT, Verbeek N, Verhoeven JS, Wallace G, Yosovich K, Zarate YA, Zerem A, Zuberi SM, Guerrini R, Mefford HC, Patel C, Zhang YH, Møller RS, Scheffer IE. NEXMIF encephalopathy: an X-linked disorder with male and female phenotypic patterns. *Genet Med.* 2021 Feb;23(2):363-373.