

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN NEUROPSICHIATRIA
INFANTILE**

Direttore: Chiar.mo Prof. U. Balottin

**NEXT GENERATION SEQUENCING
E LA DIAGNOSTICA DELLE
EPILESSIE**

F. Brustia



GENETICA DELLE EPILESSIE

- L'epilessia è un condizione che si manifesta con crisi epilettiche ricorrenti e non provocate, prevalenza 5-10/1000 persone, incidenza di 50-120/100.000 persone per anno
- Etiologia molto eterogenea, forte contributo genetico, dalla metà del XX secolo sono stati identificati geni specifici con eredità mendeliana legati all'epilessia (Lennox, 1951)
- Dal 1995 identificate almeno una dozzina di epilessie geneticamente determinate, grazie al progresso nella ricerca genetica
- Sia fattori genetici che ambientali contribuiscono in varia misura all'etiologia delle diverse sindromi epilettiche (Berkovic et al., 1987-2006; Vadlamudi et al., 2004)

GENETICA DELLE EPILESSIE

Conoscere la base genetica dell'epilessia è utile:

- per la diagnosi,
- per indirizzare il trattamento farmacologico e
- per stimare il rischio di ricorrenza in successive gravidanze

La principale difficoltà degli studi genetici sull'epilessia sta nella marcata eterogeneità clinica e genetica e dall'interazione con i fattori ambientali (Metrakos, 1960; Berkovic 2006), che ostacolano una chiara diagnosi clinica e l'esecuzione di test genetici specifici

Sviluppate tecniche per identificare i geni di suscettibilità, microarray e studio dell'intero genoma, con conseguente miglioramento della fenotipizzazione e della classificazione delle sindromi epilettiche

CLASSIFICAZIONE

- **Classificazione etiologica:**
 - idiopatico, criptogenetico, essenziale o genetico
 - sintomatico o acquisito
- **Classificazione anatomica:**
 - sottocorticali
 - corticali
- **Classificazione Internazionale delle crisi epilettiche (Gastaut, 1970), basata su clinica e criteri EEG e poi su anatomia ed etiologia**
- **Classificazione crisi epilettiche ILAE 1981**
- **Classificazione delle epilessie e delle sindromi epilettiche ILAE 1989, epilessie primarie e secondarie costituivano un continuum biologico**
- **Classificazione ILAE 2001 (revisione 2010), basata sull'età di esordio**

ILAE Proposta di revisione della terminologia per l'organizzazione delle crisi ed Epilessie 2010

Sindromi elettrocliniche e altre epilessie

Sindromi elettrocliniche

Esempio di come le sindromi possono essere organizzate:
Suddivise per età tipica di esordio*

Periodo Neonatale
Crisi benigne neonatali*
Epilessia benigna neonatale familiare
Sindrome di Ohtahara
Encefalopatia mioclonica precoce (EME)

Infanzia
- Crisi febbrili*, Crisi febbrili plus (FS+)
- Epilessia infantile benigna
- Epilessia benigna infantile familiare
- Sindrome di West
- Sindrome di Dravet
- Epilessia mioclonica dell'infanzia (MEI)
- Encefalopatia mioclonica in disordini non progressivi
- Epilessia dell'infanzia con crisi focali migranti

Bambino
- Crisi febbrili*, Crisi febbrili puls (FS+)
- Epilessia occipitale precoce del bambino (Sindrome di Panayiotopoulos)
- Epilessia con crisi mioclono atoniche (precedentemente astatiche)
- Epilessia con assenze dell'infanzia
- Epilessia benigna con punte centrotemporali (BECTS)
- Epilessia del lobo frontale notturna autosomica dominante (ADNFLE)
- Epilessia occipitale del bambino ad esordio tardivo (tipo Gastaut)
- Epilessia con assenze miocloniche
- Sindrome di Lennox-Gastaut (LGS)
- Encefalopatia epilettica con punte-onda continue durante il sonno (CSWS)*
- Sindrome di Landau-Kleffer

Adolescenti - Adulti
- Epilessia giovanile con assenze (JAE)
- Epilessia mioclonica giovanile (JME)
- Epilessia con sole crisi tonico-cloniche generalizzate
- Epilessia autosomica dominante con sintomi udilivi
- Altre epilessie del lobo temporale familiari

Età variabile
- Epilessia familiare focale con foci variabili (bambini e adulti)
- Epilessie miocloniche progressive (PME)
- Epilessie riflesse

Costellazioni peculiari/sindromi chirurgiche

Costellazioni peculiari/sindromi chirurgiche
- Epilessia del lobo temporale mesiale con sclerosi dell'ippocampo (MTLE con HS)
- Sindrome di Rasmussen
- Crisi gelastiche con amartoma ipotalamico
- Emiconvulsioni/emiplegie/epilessie

Epilessie non sindromiche**

Epilessie attribuite a cause strutturali metaboliche
- Malformazioni da sviluppo corticale (emimegalencefalie, eterotopie, ecc.)
- Sindromi neurocutanee (sclerosi tuberosa complex, Sturge-Weber, ecc.)
- Tumore, infezione, trauma, angioma, danni precoci perinatali ictus, ecc.

Epilessie da causa sconosciuta

La suddivisione delle sindromi cliniche non ritlesse l'etiologia

Tradizionalmente con classificate come epilessie

Talora chiamato anche ESES (Electrical Status Epilepticus During Slow Sleep)

Forme di epilessie che non rientrano nei criteri per specifiche sindromi o costellazioni

Questa proposta è un "work in progress"

<http://community.ilae-epilepsy.org/home/>

Basi per una nuova classificazione che comprenda i progressi della genetica molecolare?

CLASSIFICAZIONE GENETICA DELLE EPILESSIE (Andermann & Dubeau, 1997)

Sindromi epilettiche Mendeliane o dipendenti da un singolo gene

Sindromi epilettiche con eredità complessa o multifattoriale

Malattie con epilessia causate da un singolo gene

Malattie mitocondriali associate ad epilessia: eredità materna o citoplasmaticamutazioni nucleari

Anomalie cromosomiche associate all'epilessia: anomalie strutturali rilevate da tecniche citogenetiche, variazione del numero di copie (microdelezioni o duplicazioni)

Fenocopie

ULTIMO UPDATE DEI GENI IMPLICATI NELLE EPILESSIE – LICE 2012

EPILESSIE IDIOPATICHE				
	Trasmissione	Locus	Gene	Referenza
Crisi Neonatali Benigne Familiari	AD	20q13	KCNQ2	1
		8q24	KCNQ3	2
Crisi Neonatali-Infantili Benigne Familiari	AD	2q24	SCN2A	3
Crisi Infantili Benigne Familiari (con o senza coreo atetosi/discinesia)	AD	16p11	PRRT2	4,5
		2q24	SCN2A	6
Crisi Infantili Benigne Familiari e Emicrania Emiplegica Familiare	AD	1q23	ATP1A2	7
E Autosomica Dominante Notturna del Lobo Frontale	AD	20q13	CHRNA4	8
		1p21	CHRNA2	9
		8p12	CHRNA2	10
E Familiare del Lobo Temporale Laterale	AD	10q24	LG1	11,12
E Genetica con Convulsioni Febbrili Plus (GEFS+)	AD	2q24	SCN1A	13,14
		19q13	SCN1B	15,16
		2q24	SCN2A	17
		5q	GABRG2	18,19
Epilessia mioclonica familiare infantile (FIME)	AR	16q13	TBC1D24	20
E Mioclonica Giovanile (Sindrome di Janz)	AD	5q34	GABRA1	21
		6p12	EFHC1	22
E Generalizzata Idiopatica con fenotipi variabili (incl. assenze precoci)	AD	1q35	SLC2A1	23
E Generalizzata Idiopatica e Atassia Episodica	AD	2q22	CACNB4	24
	AD	19q	CACNA1A	25
Encefalopatie Epiletiche				
Encefalopatia epiletica ad esordio precoce (neonatale/primo anno)	AR	11p15	SLC25A22	26
	de novo	9q34	STXBP1	27
	AR	16p13	TBC1D24	28
	de novo	20q13	KCNQ2	29
Spasmi infantili e fenotipo Rett-like	X-linked	Xp22	CDKL5	30
E Mioclonica Severa dell'Infanzia / Sindrome di Dravet	de novo	2q24	SCN1A	31
	X-linked	Xq22	PCDH19	32
Epilessia e ritardo mentale nelle femmine	X-linked	Xq22	PCDH19	33
EPILESSIE MIOCLONICHE PROGRESSIVE				
	Trasmissione	Locus	Gene	Referenza
Malattia di Unverricht-Lundborg (EPM1)	AR	21q22.3	EPM1 (Cistatina B)	34,35
Malattia di Lafora (EPM2)	AR	6q24	EPM2A (Laforina)	36
		6q22	EMP2B (Malina)	37
MERRF/MELAS	Mat	mt-DNA	t-RNA ^(8344, 8356, 8363)	38
	AR	n-DNA	POLG1	39
Sialidosi				
• Tipo 1, 2	AR	6p21.3	Neuraminidasi (NEU)	40
• Galattosialidosi	AR	20q13.1	PPCA	41

Ceroidolipofuscinosi				
• Infantile tardiva di Jansky-Bielschowsky	AR	11p15	CLN2	42
"Finlandese"	AR	13q21	CLN5	43
"Variante"	AR	15q21	CLN6	44
• Giovanile di Spielmeyer-Vogt-Sjogren	AR	16p	CLN3	45
• Adulta di Kufs	AR	15q21	CLN6	46
	AD	20q13.33	DNAJC5	47
AMRF (action myoclonus-renal failure syndrome)	AR	4q21	SCARB2	48
• variante simil-ULD senza interessamento renale	AR	4q21	SCARB2	49
PME con atassia precoce	AR	12q12	PRICKLE1	50
Atrofia Dentato-Rubro-Pallido-Luisiana	AD	12p13	B37 (Atrofina)	51
Malattia di Gaucher tipo III	AR	1p21	Glucocerebrosidasi	52
Malattia di Huntington Giovanile	AD	4p16	Huntingtina	53
Gangliosidosi GM2	AR	15q23-q24	Hexa	54
EMP con inclusioni di neuroserpina	AD	3q26	PH2	55
EMP ad esordio precoce	AR	7q11	KCTD7	56

MALFORMAZIONI CEREBRALI SU BASE GENETICA

	Trasmissione	Locus	Gene	Referenza
Malformazioni dovute a proliferazione neuronale anomala				
Sclerosi Tuberosa	AD	9q32	TSC1	57
Sclerosi Tuberosa	AD	16p13	TSC2	57
Malformazioni dovute a migrazione neuronale anomala				
Lissencefalia Isolata (ILS)/eterotopia sottocorticale (SBH)	AD	17p13.3	LIS1	58
Lissencefalia Isolata (ILS)/eterotopia sottocorticale (SBH)	AD	Xq22.3-q23	DCX	59
Lissencefalia Isolata (ILS)/eterotopia sottocorticale (SBH)	AD	12q13.12	TUBA1A	60
Sindrome di Miller-Dieker	AD	17p13.3	LIS1+YWHAE	61
Lissencefalia X-linked con genitali ambigui (XLAG)	X-linked	Xp22.1	ARX	62
Lissencefalia con ipoplasia cerebellare (LCH)	AR	7q22.1	RELN	63
Lissencefalia con ipoplasia cerebellare (LCH)	AR	9p24.2	VLDLR	64
Eterotopia periventricolare bilaterale classica	X-linked	Xq28	FLNA	65
Eterotopia periventricolare	AD	5p15.1	-	66
Eterotopia periventricolare	AD	5p15.33	-	67
Eterotopia periventricolare e sindrome di Williams	AD	7p11.23	-	68
Eterotopia periventricolare	AD	4p15	-	69
Eterotopia periventricolare	AD	5p14.3-15	-	70
Eterotopia periventricolare e agenesia del corpo calloso	AD	1p36.22-pter	-	71
Eterotopia nodulare periventricolare (PNH) e microcefalia	AR	20p13	ARFGEF2	72
Distrofia muscolare congenita di Fukuyama o sindrome di Walker-Warburg (WWS)	AR	9q31.2	FKTN	73
"Muscle-eye-brain disease (MEB)" o WWS	AR	19q13.32	FKRP	74
"Muscle-eye-brain disease (MEB)"	AR	22q12.3	LARGE	75
"Muscle-eye-brain disease (MEB)"	AR	1p34.1	POMGnT1	76
"Muscle-eye-brain disease (MEB)" o WWS	AR	9q34.13	POMT1	77
"Muscle-eye-brain disease (MEB)" o WWS	AR	14q24.3	POMT2	78
Sindrome CEDNIK	AR	22q11.2	SNAP29	79

Eteropia periventricolare e syndrome di Ehors-Danlos	X-linked	X28	FLNA	65
Eteropia periventricolare, dimorfismi facciali e costipazione severa	X-linked	X28	FLNA	65
Malformazioni dovute a organizzazione corticale anomala				
Polimicrogria bilaterale perisilviana (BPP)	X-linked	Xq22	SRPX2	80
Polimicrogria bilaterale fronto-parietale (BFPP)	AR	16q13	GPR56	81
Polimicrogria asimmetrica	AD	6p25.2	TUBB2B	82
Polimicrogria con agenesia del corpo calloso e microcefalia	AD	3p21.3-p21.2	TBR2	83
Polimicrogria (con anidria)	AD	11p13	PAX6	84
Polimicrogria	AD	1p36.3-pter	-	85
Polimicrogria e microcefalia	AD	1q44-qter	-	86
Polimicrogria, PNH e agenesia del corpo calloso	AD	6q26-qter	-	87
Polimicrogria e dimorfismi facciali	AD	2p16.1-p23	-	88
Polimicrogria, microcefalia e idrocefalo	AD	4q21-q22	-	89
Polimicrogria	AD	21q2	-	90
Polimicrogria e sindrome di Di George	AD	22q11.2	-	91
Polimicrogria e sindrome di Goldberg-Shprintzen	AR	10q21.3	KIAA1279	92
Polimicrogria e sindrome di Warburg Micro	AR	2q21.3	RAB3GAP1	93
ANOMALIE CROMOSOMICHE ED EPILESSIA				
Cromosoma 1	Delezione 1p36			94
Cromosoma 4	Delezione 4p16.3 (Sindrome di Wolf-Hirshhorn)			95
Cromosoma 6	Delezione 6q terminale			96
Cromosoma 12	Trisomia 12p			97
Cromosoma 14	Cromosoma 14 ad Anello			98
Cromosoma 15	Delezione 15q11-13 Disomia Uniparentale Mutazioni "Imprinting Center" Mutazioni Gene UBE3A (Sindrome di Angelman) Inv dup 15			100
Cromosoma 17	Delezione 17p13.3 (Sindrome di Miller-Dieker)			101
Cromosoma 20	Cromosoma 20 ad Anello			102
Cromosoma X	Sindrome del Cromosoma X fragile Sindrome di Klinefelter (XXY)			103 104
	Duplicazione (X) (p11.22-p11.23)			105
Cromosoma Y	47, XYY			106

TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO

- Negli ultimi 20 anni il gold standard è stato il metodo Sanger basato sull'uso di di-deossi nucleotidi applicati al metodo a terminazione di catena
- Utilizzato per il Progetto Genoma Umano (1990-2003), con l'obiettivo di determinare i 3 miliardi di paia di basi del genoma umano e fornire una completa risorsa sulla variabilità genetica umana, con creazione di data base

**Necessità di sequenziamento rapido, completo,
affidabile ed economico di interi genomi**



**Sviluppo di nuove tecnologie di sequenziamento
di nuova generazione**

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO

Esistono metodi di NGS di prima, seconda e terza generazione utilizzati per sequenziare il genoma e fornire i dati variabilità genetica umana

L'obiettivo è quello di distinguere se le variazioni di singolo nucleotide (SNVs) identificate possano essere o meno patogenetiche

I costi per il Whole Genome Sequencing (WGS) rimangono comunque proibitivi, una strategia alternativa è il sequenziamento delle regioni codificanti le proteine del genoma, Whole Exome Sequencing (WES)

PIATTAFORMA NGS PER LA DIGNOSI DELL'EPILESSIA

Nel nostro studio è stata utilizzata una piattaforma di seconda generazione “ILLUMINA GENOME ANALYZER”, in uso c/o questa Struttura in collaborazione con il Laboratorio di Biologia Generale e Genetica Medica - Dipartimento di Medicina Molecolare (Prof.ssa O. Zuffardi)

E' stata composta una piattaforma Next Generation contenente 106 geni responsabili dell'epilessia, per ogni paziente sono stati analizzati, in un unico esperimento, le porzioni codificanti di questi geni.

I geni sono stati selezionati sulla base dei seguenti criteri:

- 1) i geni associati con epilessia idiopatica,**
- 2) geni associati con l'epilessia sindromica;**
- 3) geni associati a epilessia e malformazioni cerebrali,**
- 4) geni che codificano per le proteine dei canali ionici non ancora associate con l'epilessia.**

Elenco dei 106 geni delle epilessie utilizzati nella piattaforma NGS

A2BP1, ALDH7A1, AP4E1, ARHGEF9, ARX, ASPM, ATP1A2, ATP6AP2, BRD2, CACNA1A, CACNA1G, CACNA1H, CACNB4, CASR, CCM2, CDKL5, CHRNA2, CHRNA4, CHRN2, CLCN2, CLN8, CNTNAP2, CSTB, DCX, DMD, DYRK1A, EFHC1, EPM2A, FLNA, FOXP1, GABBR1, GABRA1, GABRA6, GABRB3, GABRD, GABRG2, GJD2, GLUT1, GPR56, GRIK1, GRIN2A, GRIN2B, GPR98, HCN1, JRK, HTT, KCNA1, KCNAB2, KCND2, KCNJ10, KCNMA1, KCNN3, KCNQ2, KCNQ3, KCTD7, KRIT1, LGI1, LIS1, MAGI2, MECP2, MEF2C, MLLT3, NDP, NEDD4L, NHLRC1, NOTCH3, OPA1, OPHN1, OPRM1, PAX6, PCDH19, PDCD10, PDYN, PLCB1, POLG, PORCN, PPP2R2C, PQBP1, PRICKLE1, SCARB2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN3A, SCN9A, SHANK3, SLC1A3, SLC25A2, SLC2A1 (GLU1), SLC2A2 (GLUT2), SLC4A10, SLC4A3, SLC6A3, SLC9A6, SRPX2, ST3GAL5, STRADA (lyk5), STXBP1, SYN1, SYP, TAP-1, TBC1D24, TCF4, TUBA1A, TUBB2B, UBE3A.

La nostra piattaforma diagnostica dovrebbe consentire l'identificazione di SNVs, inserzioni e delezioni nei 106 geni selezionati che sono stati già stati collegati con diversi tipi di disturbi epilettici.

PAZIENTI CASI

- 20 pazienti affetti da diversi tipi di epilessia sia isolata, sia associata a disabilità intellettiva o ritardo psicomotorio seguiti c/o la Struttura Semplice Funzioni Speciali di Epilettologia dell'Infanzia e dell'Adolescenza (Responsabile Prof. Veggiotti), all'interno della Struttura Complessa di Neuropsichiatria Infantile (Direttore Prof. Balottin) c/o l'IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino di Pavia
- 4/20 pazienti: fenotipo ben noto
- 10/20 pazienti: fenotipo per cui il background genetico è largamente sconosciuto
- 6/20 pazienti: aspecifica manifestazione di crisi epilettiche con o senza ritardo mentale
- 8/20 pazienti presentano familiarità positiva per epilessia, i rimanenti invece sono casi sporadici.

PAZIENTI CONTROLLI

I soggetti di controllo sono stati reclutati tra i donatori di sangue. La valutazione clinica dei controlli è stata limitata alle risposte ad un questionario strutturato di medicina generale con particolare attenzione a tutti i sintomi neurologici o cardiaci. Solo gli individui con un'anamnesi remota e prossima negative sono stati inclusi

Dal campione ai risultati

In collaborazione con il Laboratorio di Biologia Generale e Genetica Medica - Dipartimento di Medicina Molecolare (Prof.ssa O. Zuffardi), Policlinico San Matteo, sono state eseguite queste procedure con i campioni di sangue prelevati:

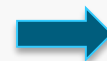
- Estrazione del DNA genomico
- Preparazione dei campioni
- Cluster Generation
- Corsa su Illumina Genome Analyzer IIx, sequenziamento multiplo
- Sequenziamento Sanger delle SNVs identificate

RISULTATI



**Mutazioni in 8 dei 20 pazienti (40%),
causative di malattia, confermate dal
sequenziamento convenzionale Sanger
e, ove possibile, convalidato dai test dei
genitori e dall'analisi della
segregazione**

Nel primo gruppo dei pazienti con fenotipo ben noto, che suggeriva uno o più geni candidati, la percentuale delle mutazioni è stata del 75% (3/4)

PZ	S	ETA'	DX	CLINICA	EEG	AED	RMN	FAM.	MUTAZIONI
1- E.M. (83-11)	F	17 aa	Encefalopatia epilettica in soggetto con anomalia malformativa cerebrale (doppia corteccia).	Parto alla 36esima settimana per PROM. Tappe sviluppo in ritardo. Dai 10 aa crisi generalizzate e parziale. ENgrimaces facciali, impaccio motorio. RM grave.	Numerosissime scariche di polipunta onda diffuse che nel sonno diventano per lunghi tratti sub continue.	VPA + CBZ + ETS	Anomalia malformativa caratterizzata dalla presenza di una spessa banda di sostanza grigia eterotopica completa "doppia corteccia"	Dubbia consanguineità tra i genitori.	DCX c.298S3C>T (p.rg100X) , chr X SHANK3 c.898C> T (p.Arg300Cys), chr 22
2- G.P. (84-11)	F	14 aa	Encefalopatia piridossino-dipendente.	A 2 gg crisi TCG. Dal mese crisi parziali e generalizzate FCresistenti e stato di male, miglioramento con introduzione di Piridossina. A 6 aa QI 8 aa QI 10 aa QI 92. Disturbo funzionale con dispercezioni visive.	Modeste anomalie lente posteriori bilaterali prevalenti a sx	LMT + Piridossina	Nella norma.	Non riferita.	ALDH7A1 c.1405+5G>A e p.Asn167Ser, chr 5
3- S.F. (85-11)	M	14 aa 5mm	Epilessia Piridossino-dipendente	A 1 mese primi episodi critici, presenti fino al 2000 quando è stata introdotta terapia con Vit B6 con controllo delle crisi. Da 10 aa non più crisi. EN e livello cognitivo adeguati.	In passato anomalie a tipo O lenta diffusa di grande ampiezza a cui incostantemente corrispondono mioclonie diffuse. Attualmente modeste anomalie.	Piridossina.	Nella norma.	Zio della md con quadro di disabilità motoria, disturbo dell'eloquio, lentamente progressiva ad esordio in età tardo infantile (7-8 aa).	
4- S.T.	M	4aa 5mm	Sindrome di Dravet, mutazione del sito di spicing c.1029-2A<G allo stato di eterozigosi nel gene SCN1A.	Prime tappe sviluppo psicomotorio e del linguaggio adeguati a , GQ di 92. Dai crisi in iperpiressia a partenza focale. Persistenza di crisi. Deterioramento cognitivo GQ 69.6/100 poi GQ 48.6. EN: stereotipie, impaccio, RM..	Organizzazione povera, modeste anomalie puntute centrali e sul Vertice.	VPA + TPM + CBM + Stiripentolo	Nella norma	Non riferita	SCN1A c.1029-2A<G, chr 2



Nel secondo gruppo dei pazienti con fenotipo per cui il background genetico è largamente sconosciuto, la percentuale di mutazione è stata del 30% (3/10)

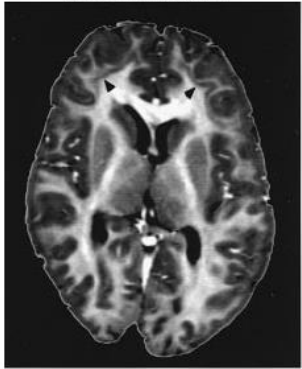
1- E.B. (14-11)	M	9aa 3mm	Epilessia mioclonica	Grave RM (deterioramento cognitivo), crisi miocloniche o TCG. EN. Segni cerebellari.	Tracciati lento, P-O e PP sia multifocali che scariche con mioclonie generalizzate.	VPA + ETS + NTZ + HC + PB	Nella norma.	Non riferita	
2- M.D.M. (8-11)	M	6aa 11mm	Epilessia mioclonica	Dai 4aa crisi con caduta del capo, mioclono negativo AASS e tronco. QIT 124, QIV 119, QIP 124. EN nella norma.	Scariche di PP-O che corrispondono a mioclonie parcellari.	VPA, LMT	Non eseguita	Fratello di S.D.M. (7-11)	
3- S.D.M. (7-11)	M	14aa 10mm	Epilessia generalizzata	Un episodio critico con mioclonie AASS. QIT 121, QIV 118, QIP 120. EN nella norma.	Scariche P-O lenta, PP-O lenta a 3.5 Hz, a dubbia partenza focale (frontale)	LMT	Nella norma	Fratello di M.D.M. (8-11)	
4- D.G.	F	26 mm	Convulsioni febbrili Plus	Dagli numerosi episodi di CF anche con lieve iperpiressia. Sviluppo psicomotorio e linguaggio adeguati (GQ = 116). EN nella norma.	Nella norma	VPA	Non eseguita	Importante familiarità per CF + da parte della famiglia del pd (vedi risultati)	GABRG2 c.351dup, chr 5 
5- M.M. (12-11)	M	6aa 9 mm	EPR	Non sicuri episodi critici. EN e cognitivo nella norma.	P lenta seguita da O in sede T-C bilateralmente, in sonno sub-continue.	Nessuna	Non eseguita	Familiarità per EPR (vedi risultati)	GRIN2A p.Asp776Tyr, chr 16 
6- J.M. (9-11)	M	8 aa	Ritardo mentale lieve-moderato in paziente con epilessia mioclonica	Prime tappe sviluppo psicomotorio e del linguaggio in epoca. A 4 aa prime crisi miocloniche, Q.S. 90,4. Attualmente EN nella norma. RM (QIT 53). Da qualche anno non più crisi.	Buona organizzazione sia in veglia che in sonno senza che siano riconoscibile anomalie epilettiformi	VPA + LMT	Non eseguita.	Md affetta da epilessia generalizzata in terapia. Il fratello della md soffriva di epilessia a tipo assenza. Il pd della Sig.ra ha presentato un episodio critico nei primi mesi di vita.	
7- A.M.	M	16 aa	Convulsioni Febbrili Plus	A 2 aa esordio, convulsione in iperpiressia, ultima a 6 aa e dopo sospensione VPA a 11 aa. EN, QI nella norma.	Anomalie puntute.	VPA sospeso nel 2006.	Non eseguita.	Importante familiarità per CF+ nella famiglia del ramo paterno. Anche il fratello ha presentato CF+.	
8- G.P.	F	7 aa	GEFS+ (Neg analisi geentica per SCN1A)	A crisi TCG in iperpiressia, in seguito ulteriori epiusodi anche in apiressia. Tappe sviluppo in epoca. E, livello cognitivo nella norma. Da 2 anni non più crisi.	Molte anomalie diffuse di grande ampiezza a tipo PPO.	LEV	Nella norma.	Emicrania in linea materna.	
9- M.R. (91-11)	F	5aa 7mm	CF	Due convulsioni febbrili. EN e cognitivo adeguato.	Nella norma	Nessuna	Non eseguita	Pd una convulsione febbrile, Md CF + Assenze	SCN2A c.1490G>A, chr 2
10- T.Z.	M	12 aa	GEFS+ (Neg analisi geentica per SCN1A).	CF a 3 aa, a 6 aa sospesa th. A 15 aa crisi TCG in apiressia e uno in iperpiressia. Altri episodi a 16 aa. EN e livello cognitivo nella	P e PPO generalizzate, poi solo modeste anomalie.	VPA dai 3 ai 6 aa con beneficio. Poi ancora VPA.	Asimmetria ippocampale, incompleta rotazione struttura	Pd con CF. Sorella con CF e fotosensibilità.	

Nel terzo gruppo dei pazienti con manifestazione aspecifica di crisi epilettiche con o senza ritardo mentale, la percentuale di mutazione è stata del 33% (2/6)

1- A.D.	M	5aa 11mm	Encefalopatia epilettica, pregressa S. di West, ipotiroidismo	Grave ritardo psicomotorio, dai spasmi in flessione poi crisi parziali, reflusso GE, ipotiroidismo	Ipsaritmici in passato. Scarsa organizzazione, non figure fisiologiche. O lente e anomalie multifocali.	VPA + TPM + LMT	RMN pseudoatrofia iatrogena o atrofia cerebrale?	Non riferita	
2- A.E.M.	M	3aa	Encefalopatia epilettica	A 23mm crisi TCG, poi crisi parziali e generalizzate pluriquotidiane. Grave ritardo psicomotorio. Ipercinesie diffuse.	P e PP-O di grande ampiezza diffusa, non attività fisiologica.	LMT + VPA + HC	Nella norma	Non riferita, genitori consanguinei (cugini primi)	
3- A.G. (98-11)	F	15 aa	Encefalopatia epilettica in paziente con quadro malformativo complesso.	Ad riscontro di pregressa emorragia cerebrale e blocco flusso liquorale, derivazione ventricolo peritoneale. Crisi focali e spasmi. A 1 aa QS 58.6. Grave RM, linguaggio assente, deambulazione con l'utilizzo di tutori AFO gamba-piede.	Anomalie a tipo P-O atipica sulle regioni anteriori di entrambi gli emisferi che si attivano nel sonno anche in lunghe sequenze.	VPA + ETS + CBZ + FLB +	Quadro malformativo complesso, con anomalia di Chiari associata a schizencefalia temporale bilaterale a labbra aperte e possibile displasia setto-ottica. Presenti gli esiti degli ematomi frontali. Marcata dilatazione ex-vacuo del sistema ventricolare sovratentoriale.	Non riferita.	GRIN2B c.2096A>G, chr 12
4- G.N. (3-11)	M	4 aa	Epilessia parziale in paziente con sclerosi temporomesiale sinistra e alterazioni displasiche del polo temporale sinistro	A convulsione in iperpiressia. Sviluppo psicomotorio adeguato. Ulteriori episodi con mioclonie, stato di male. A 2 aa QS 90. Non più crisi da un anno e 1/2. EN nella norma.	Modesta asimmetria interemisferica per destra più lenta di sinistra non anomalie epilettiformi.	VPA + TPM	Anomalie compatibili con sclerosi temporomesiale sx, associata ad alterazioni displasiche del polo temporale sx.	Non riferita.	
5- M.P. (13-11)	M	4 aa	Encefalopatia congenita di ndd.	A insorgenza episodi critici. Spasmi ed ipsaritmia. Grave ritardo psicomotorio, non controllo completo del tronco, ipotonia, strabismo, stereotipie motorie.	Poco organizzato, lento, asimmetria interemisferica per dx più lenta di sx., Non anomalie epilettiformi.	VPA + LEV + NTZ	Atrofia cerebrale diffusa di discreta-marcata entità con aree terminali e ritardo della mielinizzazione.	Zia materna deceduta per grave cardiopatia in S. di Down.	
6- M.S. (963-09)	M	7aa 9mm	Encefalopatia epilettica e DPS	Dai 3gg crisi TCG poi crisi a partenza focale. Ritardo acquisizioni psico-motorie. Quadro DPS. Impaccio motorio. Linguaggio assente. Grave RM.	Anomalie P e P-O sulle regioni C e F di sx.	VPA	Nella norma	Non riferita	KCNQ2 c.923C>T, chr 20



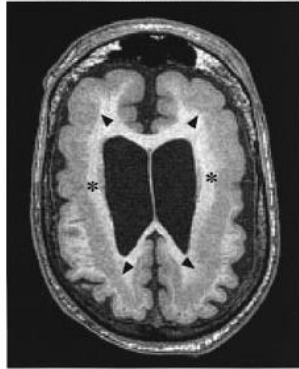
Partial frontal SBH



Diffuse SBH



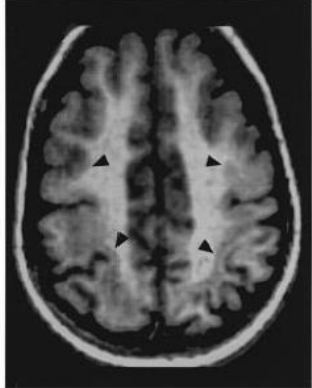
Anterior pachygyria-posterior SBH



Partial posterior SBH



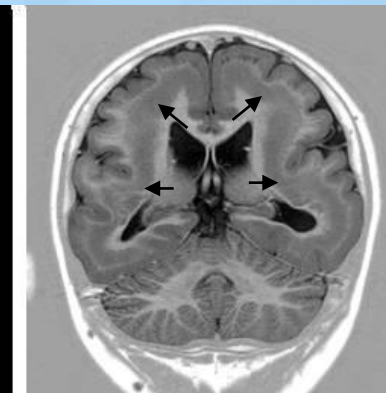
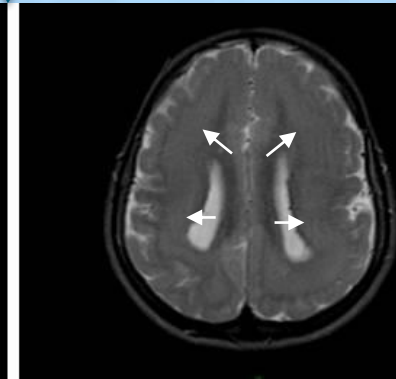
Intermediate posterior SBH



Diffuse SBH, posterior predominance



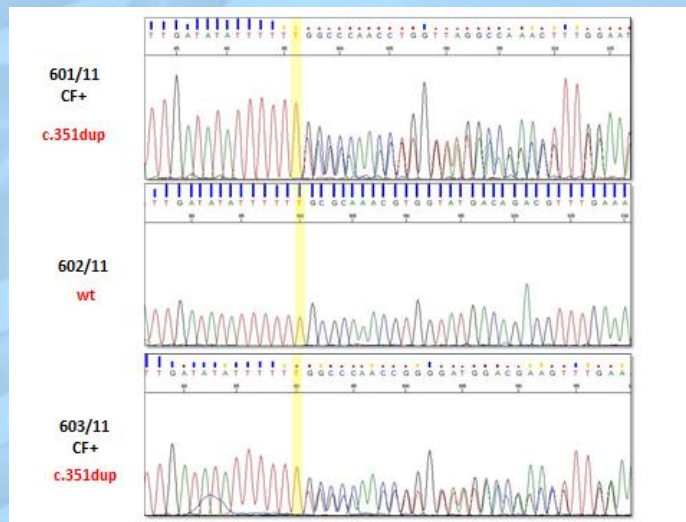
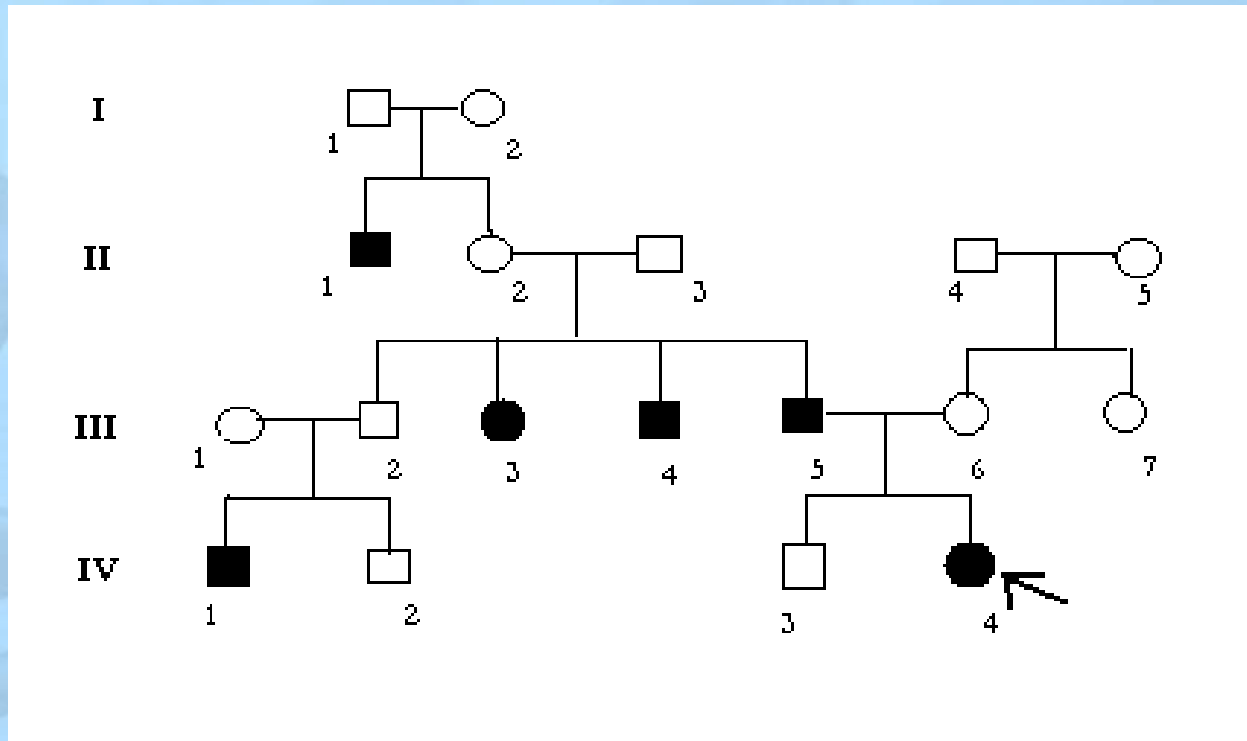
RMN della nostra paziente (E.M., nata il 20/02/95, 83-11)



Tagli assiali di RMN encefalo di 6 pazienti inclusi nello studio di D'Agostino et al., le figure rappresentano i diversi sottotipi di SBH.



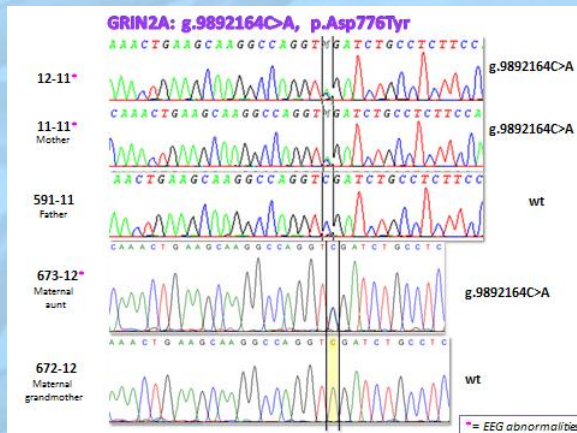
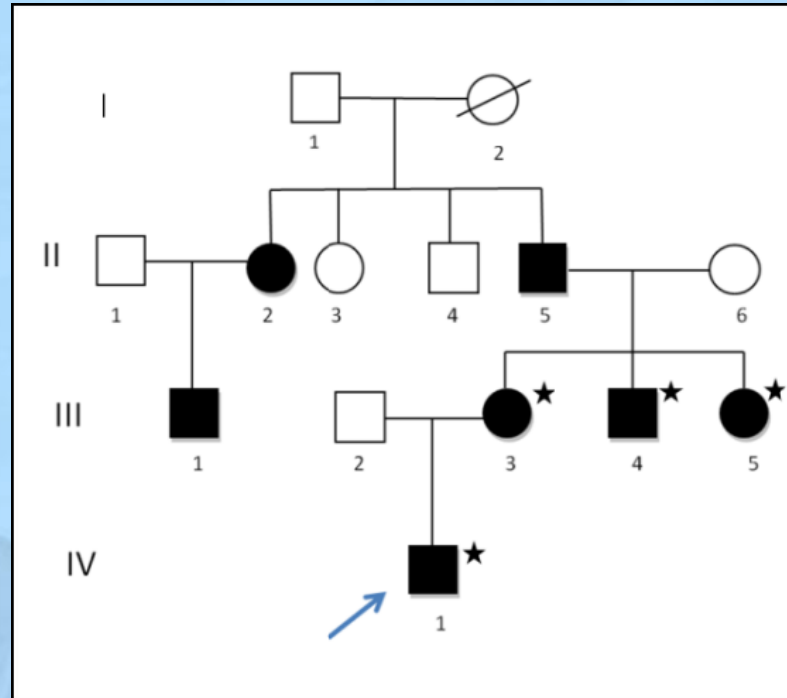
D.G., 16/05/10, 601-11



Il Sequenziamento Sanger conferma la mutazione in GABRG2 nella probanda (IV-4, 601-11) e nel padre affetto (III-5, 603-11). Non presente la mutazione nella madre sana (III-6, 602-11).



M.M., nato il 03/10/05, 12-11



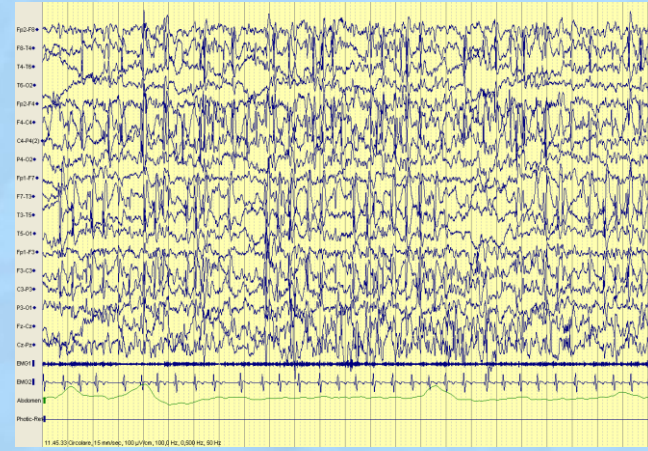
Il Sequenziamento Sanger conferma la mutazione in GRIN2A nel probando (IV-1, 12-11), nella madre affetta (III-3, 11-11) e nella zia materna affetta (IV 5, 673-12). Non presente la mutazione nel padre sano (IV-2, 591-11) e nella nonna materna sana (II-6, 672-12)

M.M., nato il 03/10/05, 12-11

EEG 2012 (M.M., 6 aa 8 mm, IV 1, 12-11): attività di punta lenta seguita da onda in sede T-C bilateralmente, che in sonno si attiva diventando sub-continua. Non assume terapia.

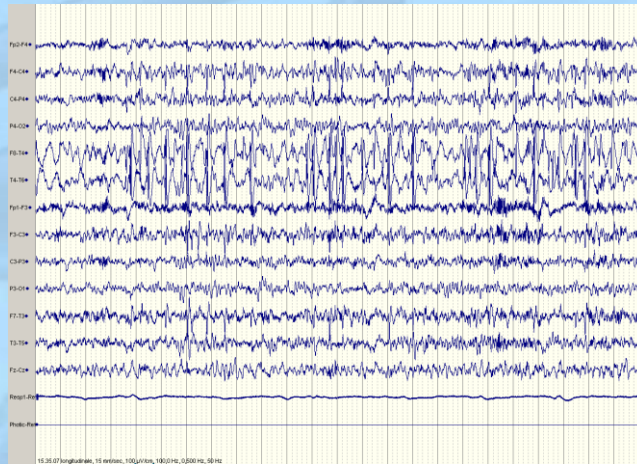


Tracciato in veglia (M.M., 2012)

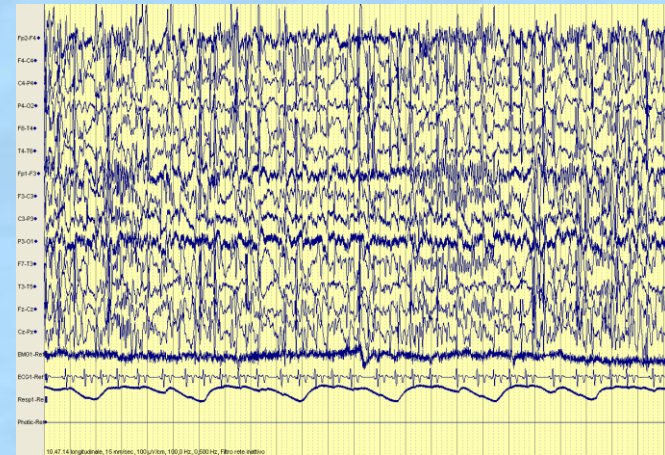


Tracciato in sonno (M.M., 2012)

EEG 2003 (L.M., 6 aa, III 5, 673-12): anomalie a tipo punta difasica-onda lenta di grande ampiezza sulle regioni F-C-T, con netta prevalenza a dx. In sonno le anomalie si attivano nettamente in frequenza divenendo pressoché subcontinue sulle regioni centrottemporali di destra, senza tuttavia generalizzare. QIT 71, QIV 74, QIP 73.



Tracciato in veglia (L.M., 2003)



Tracciato in sonno (L.M., 2003)

EEG (A.M., nata nel 1975, a 5 aa, III 3, 11-11): anomalie epilettiformi plurifocali. Focolaio più attivo centrale sx. In sonno netta attivazione delle anomalie: due focolai indipendenti di P ripetitive, uno in O dx, uno in T posteriore sx (più evidente in sonno).

EEG 2009 (L.M., 12 aa, III 5, 673-12): modestamente diminuite le anomalie precedentemente segnalate

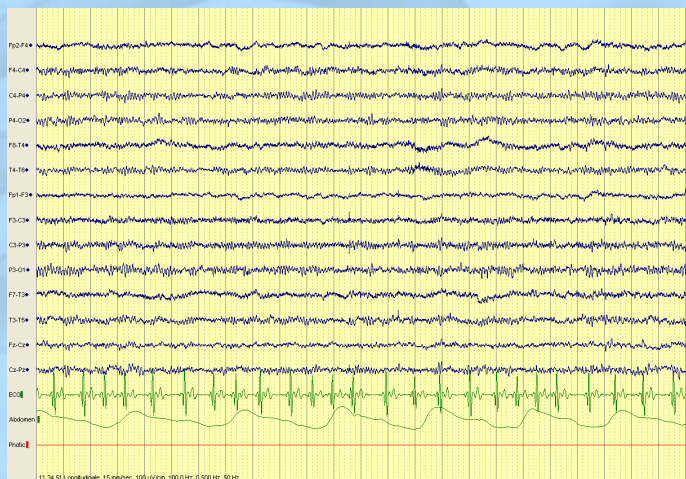


Tracciato in veglia (L.M., 2009)

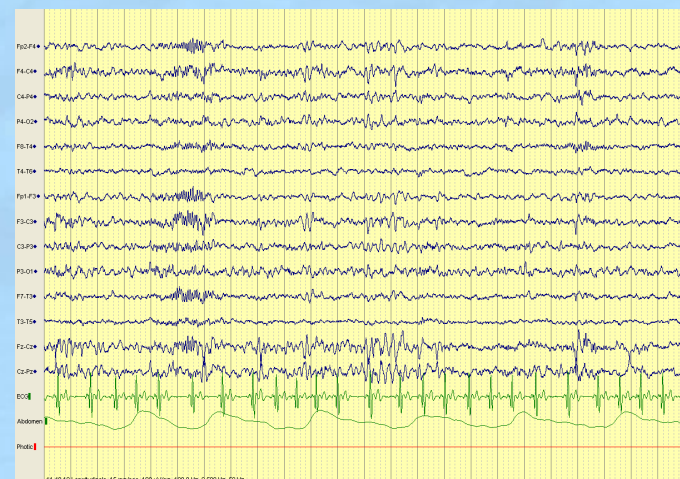


Tracciato in sonno (L.M., 2009)

EEG 2012 (L.M. 15 aa, III 5, 673-12): nei limiti di norma



Tracciato in veglia (L.M., 2012)



Tracciato in sonno (L.M., 2012)

EEG (A.M., nata nel 1975, a 13-14 aa, III 3, 11-11): dopo sospensione della terapia, nella norma.



Epilepsia, **53**(12):1–12, 2012

doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03516.x

FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH

Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders

*Johannes R. Lemke, †Erik Riesch, †Tim Scheurenbrand, †Max Schubach, †Christian Wilhelm, †Isabelle Steiner, *Jörg Hansen, *Carolina Courage, *Sabina Gallati, ‡Sarah Bürki, ‡Susi Strozzi, ‡Barbara Goeggel Simonetti, ‡Sebastian Grunt, ‡Maja Steinlin, §Michael Alber, §Markus Wolff, ¶Thomas Klopstock, **Eva C. Prott, ††Rüdiger Lorenz, ‡‡Christiane Spaich, §§Sabine Rona, ¶¶Maya Lakshminarasimhan, ¶¶Judith Kröll, ¶¶Thomas Dorn, ¶¶Günter Krämer, ***Matthis Synofzik, †††Felicitas Becker, †††Yvonne G. Weber, †††Holger Lerche, †Detlef Böhm, and †***Saskia Biskup

CONCLUSIONI

- NGS si è rivelato uno strumento efficace per individuare i difetti genetici presenti nei pazienti con fenotipi epilettici altamente eterogenei, 40% di mutazioni nel campione (8/20 pazienti).
- L'alta percentuale di mutazioni nel gruppo con fenotipo noto dimostra che un fenotipo clinico specifico indichi già la possibile presenza di geni specifici e di conseguenza un utilizzo di metodi tradizionali potrebbe essere la scelta diagnostica più facile da effettuare.
- Il risultato ottenuto nel secondo gruppo dei pazienti con fenotipo per cui il background genetico è largamente sconosciuto, dimostra che l'utilizzo di NGS può essere la metodica preferenziale, il sequenziamento tradizionale può essere molto complesso a causa della moltitudine di geni potenzialmente causativi di un certo fenotipo.
- Il sequenziamento con il pannello per l'epilessia di NGS per l'ultimo sottogruppo di bambini ha permesso la rilevazione di mutazioni in pazienti con quadri clinici poco chiari, gli approcci di sequenziamento convenzionali molto probabilmente non riuscirebbero a rilevare le aberrazioni genetiche
- La conferma di mutazioni già rilevate con il metodo tradizionale ha fortemente sottolineato l'attendibilità di queste nuove metodiche diagnostiche.

CONCLUSIONI

- **NGS rappresenta un veloce e conveniente metodo di screening diagnostico per analizzare le basi genetiche della epilessia.**
- **Nei prossimi anni si prevede l'utilizzo di NGS nella clinica e nella diagnostica. Per rendere ciò possibile sarà necessario razionalizzare i processi di preparazione del campione, insieme a miglioramenti nella tecnologia ed in particolare nella precisione, grazie studi di validazione.**
- **Il trattamento delle grandi quantità di dati di sequenza in uscita rappresenta una sfida per la bioinformatica clinica di laboratorio.**
- **L'interpretazione corretta dei risultati del sequenziamento richiede un'ulteriore caratterizzazione delle varianti genomiche presenti nelle regioni analizzate.**

Grazie per l'attenzione



**Ricordando sempre questo dolce
sorriso...**