



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA  
SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09  
CICLO XXIV°

Tesi di Dottorato di Ricerca

SCREENING DEI GENI “PACEMAKER” IN PAZIENTI  
CON EPILESSIA IDIOPATICA GENERALIZZATA:  
IDENTIFICAZIONE DI UNA MUTAZIONE RECESSIVA  
NEL CANALE hHCN2

Dottorando: Dott.ssa Stefania Coco

Matricola: R08184

Tutor: Chiar.mo Prof. Dario DiFrancesco

Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2010-2011

---

Alla mia  
splendida  
famiglia

---

<b>Indice</b>	
1. <b>Sommario</b>	1
2. <b>Introduzione</b>	3
2.1 Epilessia	3
Classificazione e forme cliniche	4
Eziopatogenesi	7
Proprietà elettriche delle cellule neuronali	7
2.2 Epilessie a carattere genetico	9
2.3 I canali HCN	16
2.4 La corrente $I_h$	21
2.5 Ruolo della corrente $I_h$ e dei canali HCN nell'eccitabilità e ritmicità neuronale	23
2.6 Canali HCN e canalopatie	29
3. <b>Scopo del lavoro</b>	31
4. <b>Materiali e metodi</b>	32
4.1 Reclutamento dei pazienti	32
4.2 Estrazione e quantificazione del DNA	32
4.3 Amplificazione ed analisi del DNA	34
Polymerase Chain Reaction (PCR)	34
Disegno dei primers e condizioni di amplificazione	34
4.4 Analisi dei frammenti amplificati	38
Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	38
Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)	39
4.5 Sequenziamento dei campioni mutati	41
4.6 Campioni 'particolari'	41
4.7 Mutagenesi e studi di espressione in vitro	43
Colture di cellule CHO	44
Colture di neuroni neocorticali neonatali di ratto	45
4.8 Immunofluorescenza	45
4.9 Elettrofisiologia	46
Analisi dei dati elettrofisiologici	47
4.10 Analisi statistica	49
5. <b>Risultati</b>	50
Risultati dello screening genetico	50
Risultati di elettrofisiologia e immunofluorescenza	59
6. <b>Discussione e conclusioni</b>	69
7. <b>Bibliografia</b>	76

## SOMMARIO

La corrente  $I_h$  è una corrente che si attiva in iperpolarizzazione ed è codificata dai canali HCN. Essa controlla l'integrazione sinaptica e l'eccitabilità intrinseca di molte aree del cervello. Considerando il ruolo centrale che i canali HCN rivestono nel *pacemaking* cardiaco, significative alterazioni nei geni che codificano per questi canali potrebbero rappresentare una delle cause sottese a contribuire all'epilettogenesi. Infatti, è noto che la corrente  $I_h$  risulta patologicamente alterata a seguito di convulsioni indotte sperimentalmente; inoltre molti studi indipendenti indicano un netto collegamento tra disfunzioni nei canali HCN e diverse forme di epilessia. Fino ad oggi, tuttavia, non era ancora stata individuata una prova diretta che mettesse in correlazione alterazioni funzionali nei canali HCN e sindrome epilettica.

Attraverso lo *screening* dei geni *Hcn1* e *Hcn2* in famiglie in cui l'epilessia è ricorrente, abbiamo identificato in un paziente con epilessia generalizzata idiopatica sporadica una particolare mutazione recessiva puntiforme di tipo *loss of function* nel gene che codifica per il canale HCN2. Dei 17 membri della stesso nucleo familiare, il probando era l'unico soggetto omozigote per la mutazione.

La mutazione (E515K) è stata mappata nella porzione *C-linker* della proteina, una regione nota per la sua azione modulatrice del *gating* del canale. L'analisi funzionale ha rivelato che i mutanti omomerici del canale HCN2, ma non i mutanti eteromerici o i canali *wild-type*, mostrano una forte inibizione della funzionalità, rappresentata da un netto spostamento verso potenziali negativi della curva di attivazione del canale e dal rallentamento nella cinetica di attivazione. Tutto ciò di fatto abolisce il contributo di HCN2 all'attività elettrofisiologica neuronale. Tramite trasfezione di canali HCN2 mutanti omomerici E515K in neuroni corticali neonatali di ratto, è stato inoltre osservato un decremento della soglia di *firing* del potenziale d'azione con

concomitante aumento della frequenza di *firing*. Questo si traduce in un incremento dell'eccitabilità cellulare. Al contrario, neuroni corticali neonatali di ratto trasfettati con canali HCN2 mutanti eteromerici E515K o con canali HCN2 *wild-type* non mostravano variazioni elettrofisiologiche significative.

Questo studio dimostra per la prima volta una potenziale correlazione eziopatologica tra una mutazione recessiva puntiforme di tipo *loss of function* nel gene HCN2 e l'epilessia generalizzata idiopatica.

## INTRODUZIONE

### 2.1 Epilessia

Con il termine epilessia ci si riferisce ad una "*affezione cronica ad eziologia diversa, caratterizzata dalla ripetizione di crisi che derivano da una scarica eccessiva di neuroni cerebrali*" (Organizzazione Mondiale della Sanità, O.M.S.). L'epilessia è una patologia neurologica caratterizzata dalla comparsa più o meno ricorrente di alterazioni delle funzioni cerebrali definite come crisi epilettiche (o accessi epilettici).

Etimologicamente il termine epilessia deriva dal verbo greco επιλαμβάνω (*epilamváo*) che, al passivo (ἐπιλαμβάνομαι, *epilamvánomai*), significa "essere colto di sorpresa", e sintetizza i caratteri fondamentali della crisi epilettica: imprevedibilità del suo manifestarsi e interruzione dello stato di coscienza.

Nel tempo l'epilessia è stata designata con nomi più o meno immaginifici che riflettono l'atteggiamento della cultura che li ha espressi. Termini descrittivi si ritrovano nelle tavolette babilonesi e si parla di "mal caduco" nella cultura medievale o il "male sacro" della cultura greca, alludendo ad una possibile origine soprannaturale del disturbo.

*"...essa non è a mio parere per nulla più divina o più sacra delle altre malattie, ma ha la stessa natura da cui le altre provengono..."* (Ippocrate, V secolo a.C.).

In Gran Bretagna le crisi epilettiche vengono identificate con il termine "*fit*" e negli USA con il termine "*seizure*".

Gli accessi epilettici e la condizione di accessi ripetitivi (epilessia) sono patologie molto frequenti nella popolazione mondiale. Secondo studi epidemiologici una diagnosi di epilessia viene fatta nel 3% dei soggetti che vivono fino agli ottanta anni.

L'insorgenza di una singola crisi epilettica isolata non è sufficiente dal punto di vista clinico per effettuare una diagnosi di epilessia. Per convenzione la diagnosi richiede almeno due crisi epilettiche non

strettamente correlate ad un disturbo sistemico, tossico o metabolico del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Le manifestazioni delle crisi epilettiche variano notevolmente: secondo la nomenclatura francese di Esquirol, si passa dal “petit mal” caratterizzato da brevi periodi di assenza, al “grand mal” caratterizzato da convulsioni o crisi tonico-cloniche.

### **Classificazione e forme cliniche**

La classificazione degli accessi epilettici e delle epilessie risulta molto complicata a causa della grande variabilità di sintomi direttamente collegati all'età d'insorgenza, alla zona colpita o alla risposta ai trattamenti farmacologici. Nell'ambito dell'epilessia si distinguono quindi forme cliniche diverse per eziologia, presentazione clinica e prognosi. Ad oggi ne sono state descritte più di 50 differenti tipologie.

In generale, si parlerà di:

- **Crisi epilettica:** occorrenza transitoria di segni e/o sintomi dovuti ad attività neuronale eccessiva e sincrona abnorme nell'encefalo.
- **Epilessia:** disturbo cerebrale caratterizzato da una persistente predisposizione a generare crisi epilettiche e dalle sue conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali.

(*International League Against Epilepsy, ILAE*) (Berg et al., 2010)

La classificazione degli accessi epilettici comprende due categorie principali:

- **Accessi parziali**
- **Accessi generalizzati**

Se la scarica epilettogena origina e si mantiene localizzata ad una popolazione neuronale ristretta (*focolaio epilettogeno*), le crisi sono definite **parziali** ed hanno una fenomenologia coerente con le funzioni delle specifiche aree corticali interessate. Se la scarica inizia localmente, ma si diffonde più o meno rapidamente a vaste aree corticali, vi può essere una *generalizzazione secondaria*, spesso con manifestazioni

convulsive. Gli accessi epilettici parziali possono essere a loro volta suddivisi in parziali *semplici* (senza alterazione dello stato di coscienza) o in parziali *complessi* (con alterazioni dello stato di coscienza). Il periodo di tempo intercorrente da un accesso epilettico parziale ed il ristabilimento delle funzioni neurologiche normali viene detto *periodo postictale*.

Le crisi primitivamente **generalizzate** sono sostenute da una scarica epilettica che fin dall'esordio interessa contemporaneamente vaste aree corticali di entrambi gli emisferi. Molte delle crisi descritte come generalizzate sono in realtà crisi parziali generate da una scarica locale che si diffonde così rapidamente da non permettere l'identificazione di scariche parziali iniziali. Le epilessie generalizzate si manifestano soprattutto durante il periodo infantile e sono di tipo *non convulsivo* (la cosiddetta *assenza*, in passato denominata *petit mal*), durano pochi secondi e sono associate a perdita di coscienza e arresto di tutte le funzioni motorie. Tuttavia la forma più comune di accesso epilettico generalizzato è l'accesso *convulsivo* (o *grand mal*): con movimenti di tipo motorio (mioclonico, tonico, clonico) o perdita del tono motorio (atonico).

Accanto alla distinzione "generalizzato" e "parziale", di carattere essenzialmente clinico, occorre considerarne un'altra basata sulle cause che determinano l'attacco epilettico. Le epilessie possono essere **sintomatiche**, se sono secondarie a danni cerebrali pregressi, stabilizzati o progressivi in qualche modo dimostrabili con indagini neuro-diagnostiche, oppure **idiopatiche** (o criptogeniche), se alla loro origine sembrano non esservi cause cliniche identificabili. Numerose evidenze suggeriscono che le epilessie idiopatiche possano avere origine genetica.

La classificazione delle epilessie riportata in tabella 1 viene continuamente aggiornata soprattutto in base ad osservazioni cliniche ma non in base all'identificazione di meccanismi cellulari, molecolari o genetici che ne condizionano la fisiopatologia.



<b>Accessi epilettici</b>	
<b>1.</b>	<p>Accessi epilettici parziali (focali)</p> <p><b>A.</b> Accessi epilettici parziali semplici (con sintomi motori, sensoriali, vegetativi o psichici)</p> <p><b>B.</b> Accessi epilettici parziali complessi</p> <p><b>C.</b> Accessi epilettici parziali che secondariamente evolvono verso forme di accessi epilettici generalizzati</p>
<b>2.</b>	<p>Accessi epilettici generalizzati (convulsivi o non convulsivi)</p> <p><b>A.</b> Assenza</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>I.</b> Tipica (petit mal)</p> <p style="padding-left: 20px;"><b>II.</b> Atipica</p> <p><b>B.</b> Mioclonici</p> <p><b>C.</b> Clonici</p> <p><b>D.</b> Tonici</p> <p><b>E.</b> Tonico-clonici</p> <p><b>F.</b> Atonici</p>
<b>Epilessie (classificazione abbreviata)</b>	
<b>1.</b>	<p>Epilessie e sindromi dipendenti dalla localizzazione</p> <p><b>A.</b> Idiopatiche con esordio dipendente dall'età (es.: epilessia benigna dell'infanzia con punte centro-temporali)</p> <p><b>B.</b> Sintomatiche (es.: epilessia post-traumatica)</p>
<b>2.</b>	<p>Epilessie e sindromi generalizzate</p> <p><b>A.</b> Idiopatiche con esordio dipendente dall'età (es.: epilessia mioclonica giovanile)</p> <p><b>B.</b> Idiopatiche e/o sintomatiche (es.: sindrome di Lennox-Gastaut)</p> <p><b>C.</b> Sintomatiche</p>
<b>3.</b>	<p>Epilessie e sindromi diverse da quelle riportate in 1 o 2</p> <p><b>A.</b> Con accessi epilettici sia parziali sia generalizzati (es.: accessi epilettici neonatali)</p> <p><b>B.</b> Senza accessi epilettici generalizzati o parziali non ambigui</p>
<b>4.</b>	<p>Sindromi speciali (es.: convulsioni febbrili)</p>

**Tabella 1.** Classificazione internazionale degli accessi epilettici e delle epilessie. Commissione per la Classificazione e la Terminologia della Società Internazionale per la Lotta contro l'Epilessia, 1985 (Kandel E.R, Principi di neuroscienze)

## **Eziopatogenesi**

Come accennato precedentemente, nella maggioranza dei casi le crisi sono dovute a danni cerebrali nuovi o preesistenti (epilessie sintomatiche); tra le cause più importanti di epilessia sintomatica vi sono le malformazioni (displasie, malformazioni vascolari), le encefalopatie fetali, infettive, postraumatiche), i tumori primitivi o secondari del sistema nervoso. Tuttavia, crisi epilettiche possono verificarsi anche a causa di disfunzioni di popolazioni neuronali (epilessie idiopatiche).

Nelle epilessie idiopatiche è dimostrata un'origine genetica (Berkovic et al., 2006). Alcune delle mutazioni responsabili sono state trovate in forme rare a trasmissione dominante. Tali mutazioni sono spesso a carico di subunità di canali ionici voltaggio-dipendenti o associati a recettori.

## **Proprietà elettriche delle cellule neuronali**

I primi studi sulla natura neurobiologica dell'epilessia sono da attribuirsi alle ricerche effettuate dal neurologo britannico John Hughlings Jackson intorno all'anno 1860. Tali studi permisero di definire la crisi epilettica *una scarica improvvisa, eccessiva e rapida di una popolazione più o meno estesa di cellule nervose*.

È logico supporre che gli accessi epilettici possano derivare direttamente o indirettamente da variazioni dell'eccitabilità di singoli o più neuroni.

Nelle diverse cellule neuronali il potenziale di membrana a riposo si aggira intorno a valori compresi tra i -40 e i -80 mV. Il potenziale di membrana a riposo è determinato principalmente dal gradiente di concentrazione e dalla permeabilità agli ioni K<sup>+</sup>. Il cambiamento di ciascuno di questi parametri influirà sul cambiamento del potenziale di membrana.

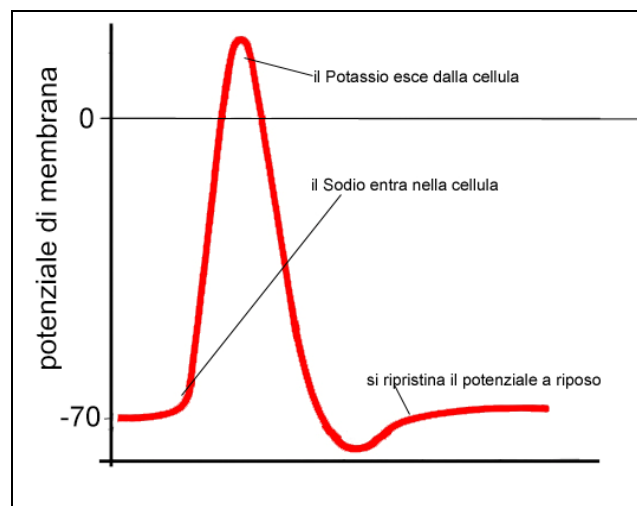
Una delle caratteristiche fondamentali dei neuroni è quella di essere cellule eccitabili. A differenza della maggior parte delle cellule dell'organismo, nelle cellule eccitabili il potenziale di membrana a riposo

può andare incontro a notevoli variazioni chiamate potenziali d'azione. A riposo la membrana del neurone è quasi impermeabile al  $\text{Na}^+$ . Se tuttavia la permeabilità a tale ione aumenta improvvisamente, questo entrerà nella cellula muovendosi secondo il proprio gradiente elettrochimico. L'aggiunta di ioni positivi nella cellula ne depolarizza la membrana e genera un segnale elettrico. Il movimento di ioni attraverso la membrana può anche iperpolarizzare la cellula: se aumenta improvvisamente la permeabilità al  $\text{K}^+$ , cariche positive vengono perse dalla cellula che diventa più negativa (si iperpolarizza).

Perché una cellula cambi la propria permeabilità ionica, il meccanismo più semplice è dato dall'apertura o dalla chiusura di particolari proteine chiamate *canali ionici* già presenti a livello della membrana. I canali ionici principali espressi a livello del neurone sono canali per il  $\text{Na}^+$ , canali per il  $\text{K}^+$ , canali per il  $\text{Ca}^{++}$ , canali per il  $\text{Cl}^-$  e altri canali a conduttanza mista attraverso cui passano sia  $\text{Na}^+$  che  $\text{K}^+$ .

I potenziali d'azione sono dovuti a variazioni del potenziale di membrana legate all'apertura dei canali voltaggio-dipendenti.

La figura 1 mostra le variazioni di voltaggio e permeabilità ionica durante un potenziale d'azione.



**Figura 1.** Rappresentazione schematica di un potenziale d'azione. FASE ASCENDENTE: ingresso di  $\text{Na}^+$  nella cellula; FASE DISCENDENTE: fuoriuscita ioni  $\text{K}^+$  dalla cellula.

Il potenziale d'azione comincia quando un potenziale graduato depolarizza la membrana fino al valore soglia intorno ai -55 mV. La fase ascendente del potenziale d'azione è legata ad un temporaneo aumento della permeabilità cellulare al Na<sup>+</sup>. Quando la cellula si depolarizza, i canali per il Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti si aprono e la membrana diviene bruscamente molto più permeabile al Na<sup>+</sup>. L'arrivo di cariche positive nel liquido intracellulare depolarizza la cellula. La fase discendente del potenziale d'azione corrisponde ad un aumento della permeabilità al K<sup>+</sup>. I suoi canali voltaggio-dipendenti, come quelli del Na<sup>+</sup>, cominciano ad aprirsi in risposta allo stimolo di depolarizzazione ma sono più lenti e raggiungono il picco di permeabilità più tardi rispetto a quelli del Na<sup>+</sup>.

Quando i canali del Na<sup>+</sup> si chiudono al picco del potenziale d'azione, i canali del K<sup>+</sup> sono ancora del tutto aperti. Sia il gradiente elettrico che il gradiente di concentrazione favoriscono la fuoriuscita del K<sup>+</sup> dalla cellula. È questa la fase discendente del potenziale d'azione che riporta la cellula verso il potenziale di riposo.

## **2.2 Epilessie a carattere genetico**

Lo studio di modelli sperimentali di epilessia ha evidenziato come alterazioni dei meccanismi di eccitabilità neuronale possano dipendere da cambiamenti nel flusso di ioni che attraversano i canali della membrana cellulare.

Ad oggi si stima che circa il 30 % delle epilessie di cui non si conoscono con esattezza le cause possano essere a carattere genetico (Berkovic et al., 2006). Soltanto una piccola parte di queste possono essere descritte su base monogenica e studi condotti su famiglie ne evidenziano i meccanismi di ereditarietà mendeliana. Nella maggior parte dei casi, le epilessie idiopatiche presentano una genetica più complessa a carattere poligenico ed un ruolo importante può essere assunto dalle interazioni di tipo ambientale (Helbig et al., 2008). Studi di biologia molecolare hanno mostrato come la maggior parte delle epilessie a carattere genetico siano causate da mutazioni in geni che

codificano per canali ionici espressi a livello della membrana neuronale: in letteratura sono presenti numerosi lavori che dimostrano come diverse forme di epilessia risultino in stretta correlazione con alcune **canalopatie**, cioè patologie associate ad alterazioni nella funzionalità dei canali ionici (Mulley et al., 2003; Steinlein, 2004; Turnbull et al., 2005; Lerche et al., 2005; Hirose et al., 2005; Avanzini et al., 2007; Catterall et al., 2008).

I canali ionici coinvolti appartengono sia alla classe dei canali attivati da ligando (recettore GABA<sub>A</sub> e recettore nicotinic dell'acetilcolina) (tabella 2) sia alla classe dei canali voltaggio-dipendenti (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>) (tabella 3).

CANALE	GENE	FENOTIPO
<b>Recettore nicotinic dell'acetilcolina</b>	CHRNA4	ADNFLE
	CHRN2	ADNFLE
	CHRNA2	ADNFLE
<b>Recettore GABA<sub>A</sub></b>	GABRG2	FS / GEFS+
	GABRA1	IGE
	GABRD	IGE / GEFS+

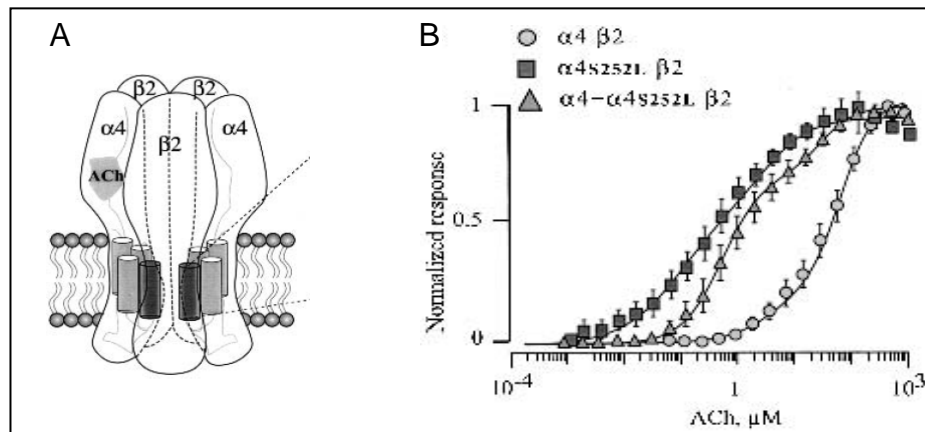
**Tabella 2.** Canali ioni attivati da ligando associati ad alcune forme di epilessia umana. ADNFLE: epilessia frontale notturna autosomica dominante; FS: attacchi febbrili; GEFS+: epilessia generalizzata con attacchi febbrili; IGE: epilessia idiopatica generalizzata.

CANALE	GENE	FENOTIPO
<b>Canale del sodio</b>	SCN1A	SMEI /GEFS+
	SCN2A	BFNS
	SCN1B	GEFS+
<b>Canale del potassio</b>	KCNQ2	BFNS
	KCNQ3	BFNS
	KCNA1	Epilessia parziale con episodi di atassia
	KCNMA1	Epilessia e discinesia
	KCNJ11	Epilessia e diabete neonatale
<b>Canale del calcio</b>	CACNA1H	IGE
	CACNA1A	Epilessia, atassia, emicrania
	CACNB4	JME
<b>Canale del cloro</b>	CLCN2	IGE
<b>Canali HCN</b>	HCN1-2	da indagare

**Tabella 3.** Canali ionici voltaggio-dipendenti associati ad alcune forme di epilessia umana; SMEI: epilessia mioclonica severa d'infanzia; GEFS+: epilessia generalizzata con attacchi febbrili; BFNS: epilessia benigna neonatale; IGE: epilessia idiopatica generalizzata; JME: epilessia mioclonica giovanile.

### RECETTORE NICOTINICO DELL'ACETILCOLINA

I recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs) costituiscono un gruppo di canali ionici attivati da ligando permeabili al  $\text{Na}^+$ , al  $\text{K}^+$  e al  $\text{Ca}^{++}$  (figura 2A). L'espressione di questi canali è molto diffusa nel cervello ed in particolare a livello pre-sinaptico e post-sinaptico di interneuroni e neuroni piramidali. Una delle caratteristiche che accomuna tutte le mutazioni finora individuate è l'aumentata sensibilità dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (figura 2B) (Bertrand, 2002; Hoda et al., 2008), implicati nella modulazione del rilascio di neurotrasmettitori quali il GABA ed il glutammato (Alkondon and Albuquerque, 2004).



**Figura 2.** **A)** i canali nAChRs sono dei pentameri, l'isoforma piú espressa nel cervello è costituita dalle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  codificate rispettivamente dai geni *CHRNA4* e *CHRN2*. **B)** Curva dose-risposta dell'acetilcolina per una delle mutazioni,  $\alpha 4\text{S}252\text{L}$ , associate con l'ADNFLE. Il canale che porta la mutazione  $\alpha 4\text{S}252\text{L}$  in eterozigosi (triangoli) all'aumentare dell'acetilcolina mostra una maggiore conduttanza rispetto al canale *wt* (cerchi) (Bertrand et al., 2002). Anche tutte le altre mutazioni associate all'ADNFLE sottoposte alla stessa analisi mostrano un comportamento simile. (Bertrand et al., 2002).

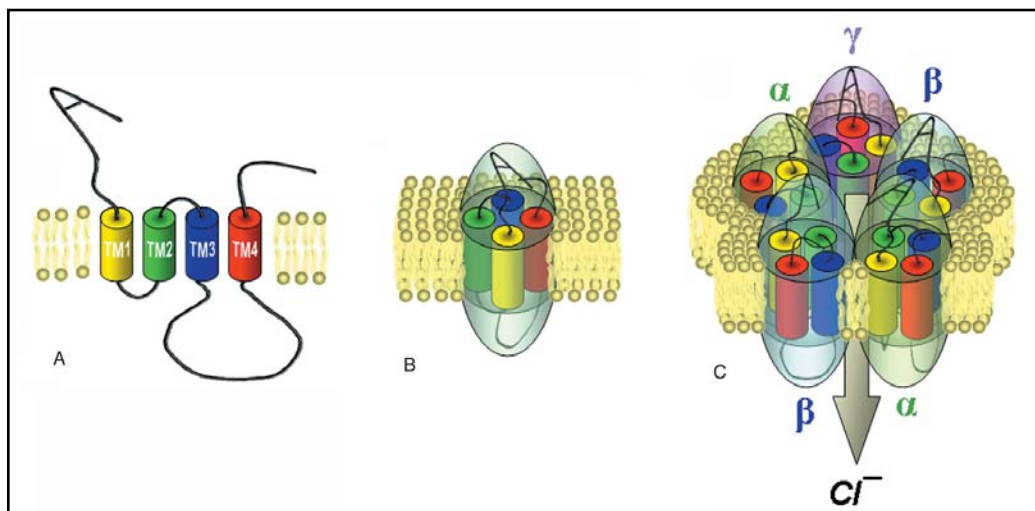
Mutazioni responsabili dell'insorgenza dell'epilessia notturna autosomica dominante del lobo frontale (*Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*, ADNFLE) sono state individuate nei geni *ChrnA4* e *ChrnB2* (Steinlein et al., 1995; De Fusco et al., 2000). Entrambi i geni codificano per subunità dei recettori nicotinici dell'acetilcolina.

Nella figura 2B è possibile osservare la curva dose-risposta dell'acetilcolina per una delle mutazioni ( $\alpha 4\text{S}252\text{L}$ ) associate con

l'ADNFLE. Il canale che porta la mutazione  $\alpha 4S252L$  in eterozigosi (triangoli), all'aumentare della concentrazione di acetilcolina, mostra una maggiore conduttanza rispetto al canale *wt* (cerchi) (Bertrand et al., 2002). Tutte le altre mutazioni associate all'ADNFLE, sottoposte alla stessa analisi, mostrano un comportamento simile.

### RECETTORE GABA<sub>A</sub>

L'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) costituisce il principale neurotrasmettitore inibitorio presente a livello del SNC. Sono stati descritti 3 tipi di recettori per il GABA: i recettori ionotropi GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> ed il recettore metabotropo GABA<sub>B</sub>. Tutte le mutazioni finora documentate sono state identificate nel recettore GABA<sub>A</sub> (figura 3). Ne costituiscono degli esempi le mutazioni R43Q (Bianchi et al., 2002), K289M (Baulac et al., 2001) e A322D (Krampfl et al., 2005) tutte associate a una riduzione dell'effetto inibitorio mediato dal recettore GABA<sub>A</sub> e a un'ipereccitabilità neuronale.

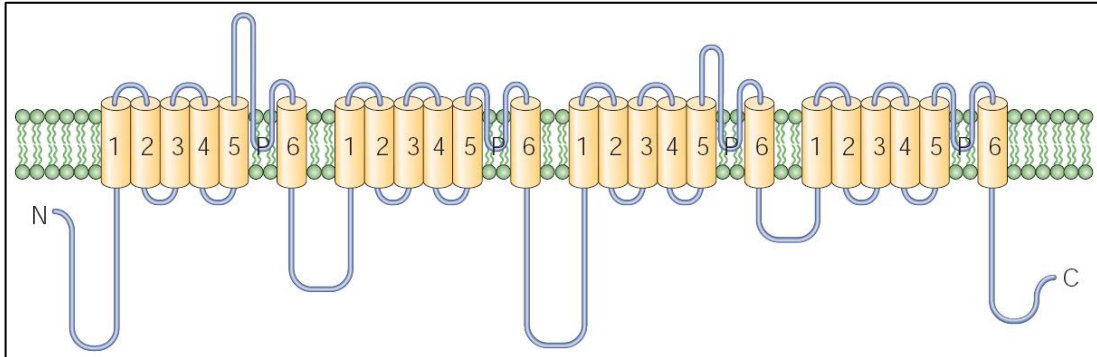


**Figura 3.** Il recettore GABA<sub>A</sub> è un pentamero costituito da diverse subunità polipeptidiche che si assemblano per formare un canale permeabile al  $Cl^-$ .

### CANALE DEL SODIO VOLTAGGIO-DIPENDENTE

Il canale voltaggio-dipendente per il sodio è formato da un'unica catena polipeptidica che contiene quattro domini omologhi (subunità  $\alpha$ ), ciascuno dei quali comprende sei domini transmembrana (figura 4). I quattro domini si assemblano a formare un poro che rende la

membrana cellulare permeabile allo ione  $\text{Na}^+$ . Alle subunità  $\alpha$  si associano due subunità  $\beta$  che accelerano la cinetica di apertura del canale.



**Figura 4.** Struttura del canale del sodio voltaggio-dipendente. È costituito da un'unica catena polipeptidica formata da quattro domini omologhi. I quattro domini si assemblano per formare il poro (Steinlein O.K., 2004).

Ciò che rende il canale del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendente importante per l'eccitabilità neuronale è il suo coinvolgimento nell'inizio e nella propagazione del potenziale d'azione. Nove geni codificano per la subunità  $\alpha$  del canale mentre quattro geni codificano per le subunità  $\beta$  (Catteral et al., 2005). Mutazioni nelle subunità  $\alpha$  e nelle subunità  $\beta$  sono già state descritte e risultano associate ad alcune forme di epilessia umana.

I geni *Scn1A* e *Scn2A* codificano per canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti caratterizzati da una rapida inattivazione. Tutte le mutazioni ad oggi descritte in letteratura causano un rallentamento nell'inattivazione del canale (Mulley et al., 2005; Berkovic et al., 2004; Heron et al., 2002; Striano et al., 2006; Herlenius et al., 2007). Il gene *Scn1B* codifica per la subunità  $\beta 1$  importante per la modulazione del *gating* e per la regolazione dell'espressione dei livelli di canale (Isom, 2002). La mutazione C121W del gene, descritta per la prima volta in associazione a sindrome epilettica generalizzata caratterizzata da attacchi febbrili, è di tipo *loss of function* (Wallace et al., 1998).

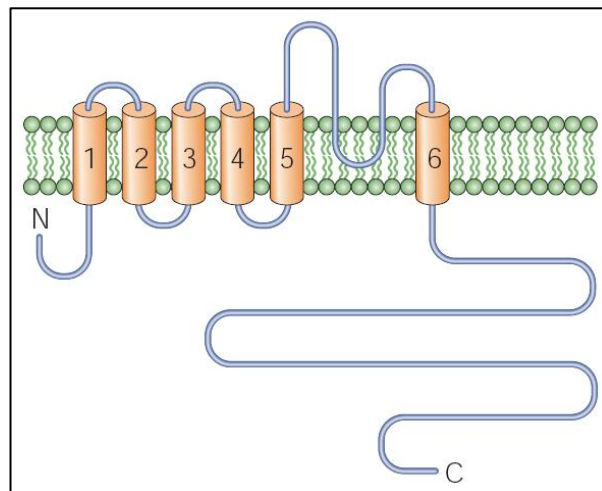
#### CANALE DEL POTASSIO VOLTAGGIO-DIPENDENTE

I canali del potassio costituiscono il gruppo più variabile di canali ionici con più di settanta subunità differenti conosciute.



Questi canali possono essere classificati in base al numero di domini transmembrana presenti in una singola subunità. I canali del  $K^+$  voltaggio-dipendente possiedono sei domini transmembrana (figura 5) ed includono varie sottofamiglie come i canali KCNQ,  $K_v1$ ,  $K_{Ca1}$  (Alexander et al., 2008). Mutazioni in queste sottoclassi sono già state descritte come causa di alcune forme di epilessia.

I geni *KcnQ2* e *KcnQ3* codificano per le subunità del canale M, un canale del potassio voltaggio-dipendente contraddistinto da una lenta cinetica di apertura e diffuso in modo ubiquitario nel cervello. Più di cinquanta mutazioni nei geni *KcnQ2* e *KcnQ3* sono state identificate e descritte in famiglie affette da epilessia neonatale benigna. Nei casi finora individuati i geni sopracitati presentano delezioni e/o inserzioni che rendono la proteina non funzionale o cambiamenti amminoacidici che causano una diminuzione della corrente di potassio (Bassi et al., 2005; Biervert et al., 1998; Borgatti et al., 2004).



**Figura 5.** Struttura di una subunità del canale del potassio voltaggio dipendente (Steinlein O.K., 2004).

Il gene *KcnA1* codifica per il canale del potassio  $K_v1$ . Mutazioni in questo gene sono descritte in letteratura in pazienti affetti da atassia episodica di tipo 1 (Browne et al., 1994) e, in alcuni casi, in sindromi di tipo epilettico.

Il gene *KcnmA1* codifica per la subunità implicata nella formazione del poro del canale  $K_{Ca1}$  (canale del potassio  $Ca^{++}$  dipendente). La

mutazione D434G, identificata in una famiglia affetta da epilessia idiopatica generalizzata, causa un aumento della sensibilità al  $\text{Ca}^{++}$  e una maggior probabilità di apertura del canale (Du et al., 2005).

Il gene *KcnJ11* codifica per la subunità responsabile della formazione del poro nel canale del potassio ATP sensibile. Mutazioni in eterozigosi riscontrate a livello del gene *KcnJ11* possono causare diabete neonatale e in alcuni casi sembrano essere associate a forme di epilessia (Proks et al., 2004).

#### CANALE DEL CALCIO VOLTAGGIO-DIPENDENTE

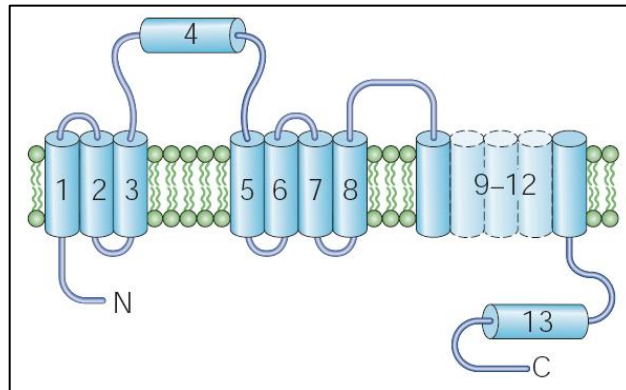
I canali del calcio voltaggio-dipendenti sono coinvolti in numerosi processi a livello della cellula nervosa e la loro espressione (sia pre-sinaptica sia post-sinaptica) riveste un ruolo cruciale nell'eccitabilità neuronale.

Studi di elettrofisiologia indicano che esistono almeno sei classi di canali del calcio voltaggio-dipendenti: L, N, P, Q, R e T (Catterall, 2000). I canali del calcio voltaggio-dipendenti possono essere classificati in canali ad 'alto voltaggio' e canali a 'basso voltaggio' in base al potenziale di membrana a cui si attivano. Studi condotti in modelli animali mostrano come difetti a livello dei geni che codificano per i canali del  $\text{Ca}^{++}$  ad alto voltaggio possono essere implicati in patologie a carattere epilettico. Ad esempio il gene *CacnB4* codifica per la subunità  $\beta 4$  del canale: una mutazione che determina la perdita del sito di legame con la subunità  $\alpha 1$  è stata studiata in associazione ad atassia ed accessi epilettici (Mori et al., 2000; Zwingman et al., 2001; Burgess et al., 1997). Il gene *CacnA1H* codifica per canali del calcio a basso voltaggio; a livello di questo gene sono state descritte più di trenta mutazioni riconducibili ad un aumento della corrente di calcio ed associate a casi di epilessia generalizzata (Chen et al., 2003; Heron et al., 2007; Vitko et al., 2005).

#### CANALE DEL CLORO VOLTAGGIO-DIPENDENTE

Anche i canali del cloro voltaggio-dipendenti giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'eccitabilità neuronale.

In particolare mutazioni a carico dei geni che codificano per la famiglia dei canali Cloro (figura 6) potrebbero essere responsabili di alcune forme di epilessia generalizzata.



**Figura 6.** Struttura di una subunità del canale del cloro voltaggio-dipendente (Steinlein O.K., 2004).

### 2.3 I canali HCN

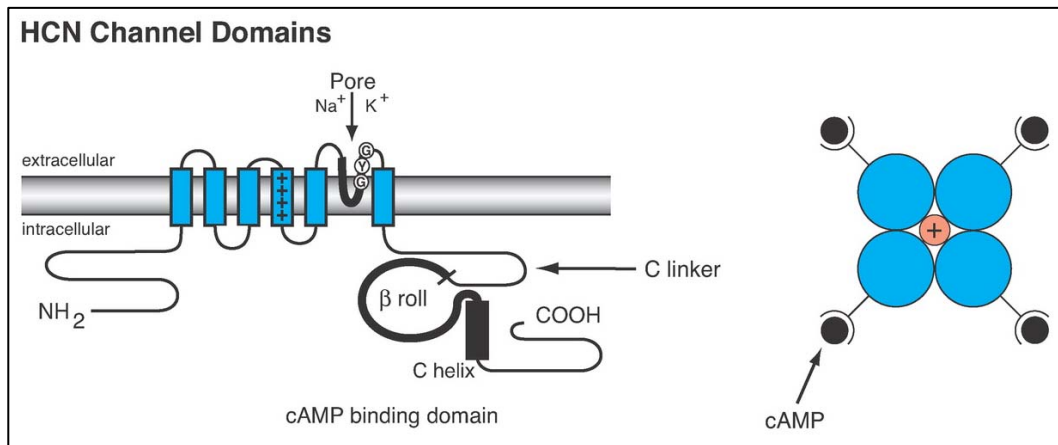
A livello del SNC, oltre ai canali precedentemente descritti, vengono espressi altri canali ionici designati *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel* (HCN), canali ionici attivati in iperpolarizzazione e regolati da nucleotidi ciclici.

Dal punto di vista molecolare, i canali HCN sono stati descritti alla fine degli anni '90 (Santoro et al., 1998) e presentano un'alta similarità con i canali del  $K^+$  voltaggio-dipendenti (Kv). Questa classe di canali ionici presenta due caratteristiche biofisiche fondamentali: la voltaggio dipendenza e la modulabilità da parte dei nucleotidi ciclici.

In tutti i modelli animali finora studiati, sono state identificate quattro isoforme di canali HCN (HCN 1-4); nell'uomo i geni che codificano per queste quattro isoforme mappano su cromosomi diversi (Vaccari et al., 1999):

- **Hcn1** : cromosoma 5p12
- **Hcn2** : cromosoma 19p13.3
- **Hcn3** : cromosoma 1q22
- **Hcn4** : cromosoma 15q24-25

Studi di cristallografia a raggi X condotti su omologhi dei canali HCN suggeriscono che la forma attiva del canale sia costituita da quattro proteine che si assemblano tridimensionalmente generando un poro. Il canale ionico, una volta formato, permette il passaggio di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  attraverso la membrana. Il rapporto di permeabilità  $\text{PNa}^+/\text{PK}^+$  varia da 0,2 a 0,4 (DiFrancesco et al., 2003).



**Figura 7.** Struttura dei geni HCN. **A destra:** schema dell'organizzazione tetrameric del canale con indicati i quattro nucleotidi ciclici (cerchi neri) che si legano al canale promuovendone l'apertura. **A sinistra:** topologia a livello della membrana di una singola subunità del canale HCN: i segmenti transmembrana S1-S6 (rettangoli azzurri), il segmento positivo S4, il loop contenente la sequenza GYG formante il poro, il C-linker della regione carbossi-terminale, seguito da un dominio CNBD di 120 aminoacidi che consiste in un dominio  $\beta$ -roll e  $\alpha$ -elica. Le estremità amino e carbossi terminali sono scarsamente conservate tra le isoforme. (Robinson & Siegelbaum, 2003).

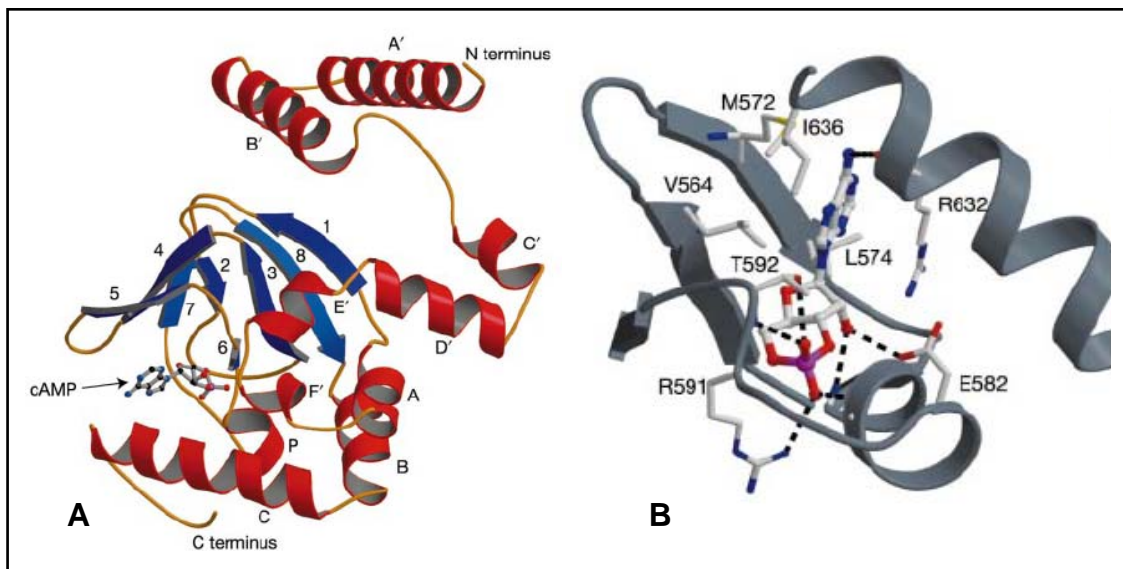
La struttura di ogni subunità è caratterizzata dalla presenza di una regione transmembrana, di una regione N-terminale e di una C-terminale; quest'ultime sono entrambe rivolte verso l'ambiente intracellulare ([figura 7](#)).

La regione transmembrana conferisce al canale caratteristiche fondamentali come la capacità di stabilizzarsi in membrana, la responsività a variazioni di voltaggio e la capacità di condurre specie ioniche. Tale regione è costituita da sei domini ad  $\alpha$ -elica (S1-S6) connessi da loop idrofilici disposti ad ansa che si affacciano sia sul versante interno sia sul versante esterno della cellula. Le caratteristiche idrofobiche delle porzioni transmembrana stabilizzano il canale in

membrana grazie ad interazioni con la componente apolare del doppio strato lipidico.

I segmenti S5 e S6 ed il tratto compreso tra questi, chiamato segmento P, costituiscono la parete del poro del canale. Analogamente ai canali Kv, il segmento P presenta una tripletta conservata nelle quattro isoforme della proteina costituita dagli amminoacidi glicina-tirosina-glicina (G-Y-G) e responsabile del filtro di selettività ionica. La capacità dei canali HCN di essere permeabili anche agli ioni Na<sup>+</sup> sembra essere dovuta alla presenza di amminoacidi diversi a valle del motivo GYG rispetto ai canali Kv: amminoacidi diversi possono influenzare la forma e la struttura del poro modificandone la permeabilità ionica (Kaupp and Seifert, 2001).

Il segmento S4 rappresenta la porzione del canale adibita a sensore del voltaggio. La capacità di questa struttura di rilevare cambiamenti nel potenziale di membrana è collegata alla presenza di amminoacidi carichi positivamente (due lisine, sette arginine e due istidine) che risentirebbero dello stimolo di iperpolarizzazione facilitando la transizione del canale verso lo stato aperto.



**Figura 8:** A. struttura cristallina ottenuta ai raggi X del C-linker e del CNBD in complesso con il cAMP (subunità HCN2 di topo). La struttura fondamentale del complesso è colorata in base alla sua struttura secondaria. B. Alcuni dei residui principali che coordinano il legame del cAMP. (Zagotta et al., 2003).

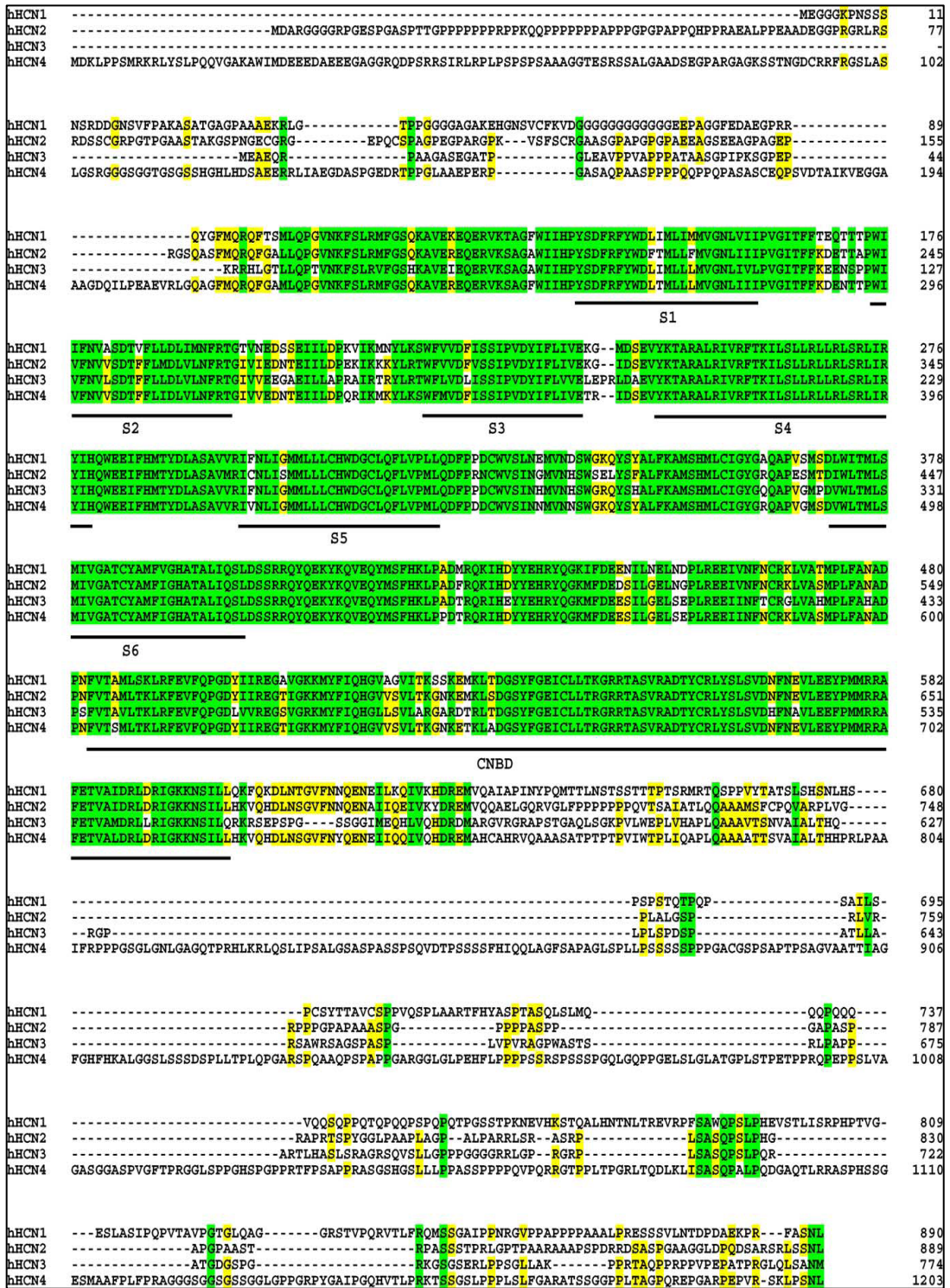
La porzione prossimale C-terminale media la regolazione dei canali HCN da parte dei nucleotidi ciclici AMPc e GMPc ([figura 8](#)). Questa regione è caratterizzata dalla presenza del dominio CNBD (*Cyclic Nucleotide Binding Domain*) (costituito da circa 120 aa e con struttura a  $\beta$ -roll) e da una regione *C-linker* che connette il CNBD al segmento S6 (di circa 80 aa). Un recente modello (Craven et al., 2006) suggerisce che, in assenza di AMPc, il CNBD si comporta come un dominio strutturale autoinibitorio: tale fenomeno sembra essere dovuto all'interazione con il *C-linker* che limita la capacità del canale ad aprirsi in risposta alle variazioni di voltaggio. Al contrario, il legame del AMPc al CNBD, ne promuove variazioni conformazionali in grado di trasferirsi al *C-linker* e da qui ad altre regioni del canale, modificandone la struttura quaternaria e rimuovendo la restrizione imposta dall'interazione CNBD-*C-linker*.

La porzione distale del C-terminale (a valle del dominio CNBD) può essere coinvolta nel legame di numerose proteine *scaffold* (TRIP8b, Filamina A, Mint2, S-SCAM). Queste proteine controllano il *trafficking* del canale attraverso i compartimenti subcellulari e, in particolari cellule, possono guidarne l'espressione in membrana (Biel et al., 2009).

La porzione N-terminale, infine, sembrerebbe conferire alle subunità del canale la capacità di tetramerizzare, requisito fondamentale per costituire un canale attivo (Tran et al., 2002).

L'analisi dei residui amminoacidi delle diverse isoforme HCN mostra un elevato grado di omologia nelle regioni comprese tra il segmento S1 e il CNBD (80-90%) mentre le principali differenze si osservano nelle regioni N-terminale (a monte di S1) e C-terminale (a valle del CNBD) ([figura 9](#)).

Le differenze strutturali che si osservano nelle regioni terminali possono in parte spiegare le differenze funzionali delle quattro isoforme.



**Figura 9.** Regioni conservate tra le diverse isoforme HCN umane. Sequenze da UniProtKB/Swiss-Prot, sequence id.: O60741 (HCN1), Q9UL51 (HCN2), Q9P1Z3 (HCN3), Q9Y3Q4 (HCN4). Allineamento eseguito con software ClastalW 2.0.10. In giallo i residui aminoacidici conservati, in verde i residui comuni alle quattro isoforme.

La distribuzione tissutale delle diverse isoforme di canali HCN è stata indagata da molti gruppi di ricerca. In generale, questi studi hanno mostrato come i canali HCN siano per lo più espressi in tessuti eccitabili come il cuore o il SNC.

Nel SNC la distribuzione delle quattro isoforme varia a seconda del tipo cellulare. L'isoforma HCN1 sembra essere ampiamente espressa nell'ippocampo, nella neocorteccia, nella corteccia cerebellare e nel tronco encefalico (Moosmang et al., 1999; Santoro et al., 2000). HCN2, diversamente da HCN1, viene espresso ubiquitariamente da tutte le regioni del SNC anche se l'espressione maggiore viene osservata nel talamo e nel tronco encefalico (Biel et al., 2009). L'isoforma HCN3 viene espressa nel SNC a livelli molto bassi mentre l'isoforma HCN4 è fortemente espressa nei nuclei talamici e nel bulbo olfattivo (Moosmang et al., 1999; Notomi et al., 2004).

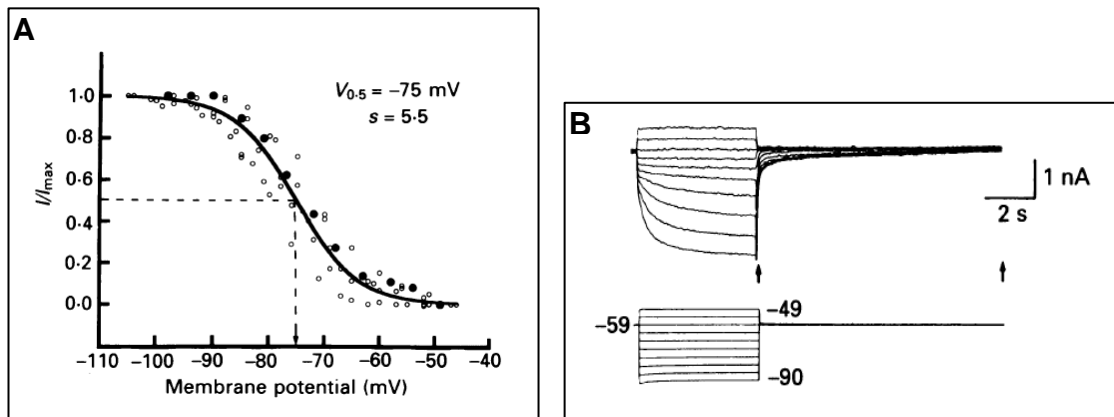
## 2.4 La corrente $I_h$

I canali HCN sono canali a conduttanza mista  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , caratterizzati da una corrente cationica entrante che si attiva lentamente in iperpolarizzazione. Questa particolare corrente è stata identificata per la prima volta a livello cardiaco nelle cellule “*pacemaker*” del nodo senoatriale (NSA) e, considerata la sua particolare natura, è stata definita “*funny*” ( $I_f$ , *funny current*) (Brown et al., 1979; DiFrancesco, 1993). Come accennato precedentemente, i canali HCN sono largamente espressi anche nelle cellule neuronali e in questa sede la loro corrente viene più comunemente definita  $I_h$  ( $I_h$ , *hyperpolarization-activated current*).

La soglia di attivazione di questa corrente è in funzione del tipo cellulare considerato e generalmente viene compresa tra valori di potenziale tra i -65 e i -35 mV, mentre il valore di potenziale a cui sono attivati il 50% dei canali ( $V_{1/2}$ ) è, nella maggior parte delle cellule, di circa -75 mV. In figura 10 viene mostrata una tipica curva di attivazione in cui la frazione di canali aperti ( $I/I_{\max}$ ) è posta in relazione ai valori di



potenziale intracellulari (Pape, 1996). Come si può notare, i punti sperimentali vengono descritti in modo adeguato dalla distribuzione sigmoideale di Boltzmann.



**Figura 10. A.** Esempio di una curva di attivazione della corrente  $I_h$  calcolata sui dati ricavati da sette cellule neuronali. I pallini pieni rappresentano i dati ottenuti dall'analisi della cellula del riquadro B. **B.** Tracce di corrente di una cellula neuronale ottenute applicando degli *steps* di potenziali iperpolarizzanti da -40 a -90 mV (McCormick and Pape, 1990).

La conduttanza mista al  $\text{Na}^+$  e al  $\text{K}^+$ , caratteristica dei canali HCN, determina un potenziale d'inversione della corrente intorno a -20 mV, valore intermedio ai potenziali di equilibrio delle due specie ioniche permeanti, calcolati secondo l'equazione di Nerst (Pape, 1996).

Nelle condizioni ioniche fisiologiche, l'effetto netto della conduttanza mista e della diversa permeabilità ai due cationi, mostrato dai canali HCN, è quello di determinare, al potenziale diastolico, una corrente netta entrante e depolarizzante.

Altra caratteristica della corrente  $I_h$  è quella di mostrare delle lente cinetiche di attivazione e deattivazione con valori di costante ( $\tau_{on}$ ,  $\tau_{off}$ ) comprese tra i 100 ms e alcuni secondi.

La modulazione da parte di nucleotidi ciclici quali il AMPc e il GMPc costituisce un'ulteriore peculiarità: variazioni nelle loro concentrazioni intracellulari possono influire sulla cinetica di attivazione e sull'apertura dei canali HCN (DiFrancesco e Tortora, 1991).

Una volta identificati e clonati i geni dei canali HCN, è stato possibile esprimere le quattro isoforme in sistemi di espressione eterologa: gli

esperimenti hanno mostrato che le diverse subunità possono coassemblare formando strutture sia omotetrameriche che eterotetrameriche, dando origine ad un'ampia varietà di isoforme di canali HCN con differenti proprietà funzionali (cinetica di attivazione, voltaggio dipendenza, diversa sensibilità ai nucleotidi ciclici).

All'interno della famiglia dei canali HCN, l'isoforma HCN1 mostra cinetiche di attivazione e deattivazione più veloci (a -95 mV,  $\tau_{act} = 0.11$  s), mentre l'isoforma HCN4 presenta cinetiche più lente (a -95 mV,  $\tau_{act} = 2,52$  s) (Altomare et al., 2001); le isoforme HCN2 e HCN3 presentano cinetiche intermedie, simili tra loro (rispettivamente: a -95 mV,  $\tau_{act} = 1.13$  s e a -100 mV,  $\tau_{act} = 1.24$  s).

Per quanto riguarda la voltaggio-dipendenza, il potenziale di mezza attivazione ( $V_{1/2}$ ) delle 4 isoforme umane HCN1-4 è rispettivamente di -73, -92, -77, -81 mV (Stieber et al., 2005) (Accili et al., 2002); i valori  $V_{1/2}$  riportati in letteratura sono variabili ma in generale indicano valori più negativi per HCN2 rispetto ad HCN4 e HCN1 (Chen et al., 2001).

Anche per quanto riguarda la sensibilità al AMPc, le quattro isoforme si comportano in maniera differente. L'effetto più rilevante si osserva nelle isoforme HCN2-4: il AMPc sposta l'attivazione dei canali verso potenziali più positivi (spostamento di circa 15 mV). Al contrario, HCN1 manifesta una ridotta sensibilità al AMPc, con uno spostamento di +5 mV (Moroni et al., 2001; Santoro et al., 1998). L'isoforma HCN3, sorprendentemente, risulta invece insensibile all'attività modulatoria del nucleotide ciclico (Stieber et al., 2005).

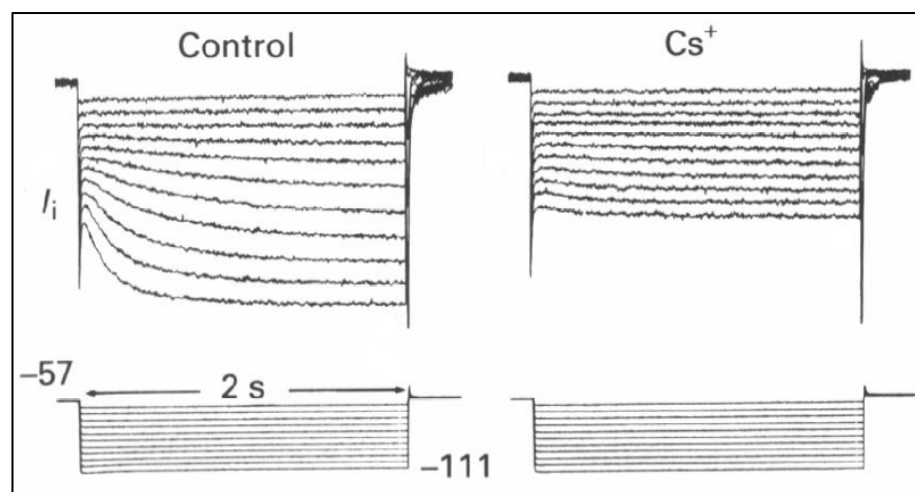
Le isoforme eterotetrameriche dei canali mostrano proprietà funzionali intermedie (Chen et al., 2001; Altomare et al., 2003; Ishii et al., 2001; Xue et al., 2002).

## **2.5 Ruolo della corrente $I_h$ e dei canali HCN nell'eccitabilità e ritmicità neuronale**

Grazie alle sue caratteristiche, la corrente  $I_h$  mostra una serie di proprietà essenziali per la regolazione e il controllo dell'eccitabilità delle

cellule che la esprimono. Due sono le funzioni fisiologiche che assumono particolare importanza: il contributo nella generazione del potenziale di riposo ( $V_R$ ) e la capacità di mantenere stabile il  $V_R$  controllandone le oscillazioni.

Nelle cellule neuronali il principale stimolo nella determinazione del potenziale di riposo è l'elevata permeabilità della membrana cellulare agli ioni  $K^+$ . Nonostante ciò il valore di  $V_R$  risulta più positivo rispetto al potenziale di equilibrio (circa  $-75$  mV). Questa differenza può essere spiegata grazie all'esistenza di alcune correnti depolarizzanti che contrastano parzialmente l'effetto iperpolarizzante dovuto all'elevata permeabilità della membrana allo ione  $K^+$ . Tra queste correnti fondamentale è la corrente  $I_h$ . L'importanza del ruolo della corrente nelle cellule nervose è stata dimostrata mediante un approccio farmacologico utilizzando lo ione cesio ( $Cs^+$ ) come bloccante dei canali HCN ([figura 11](#)).



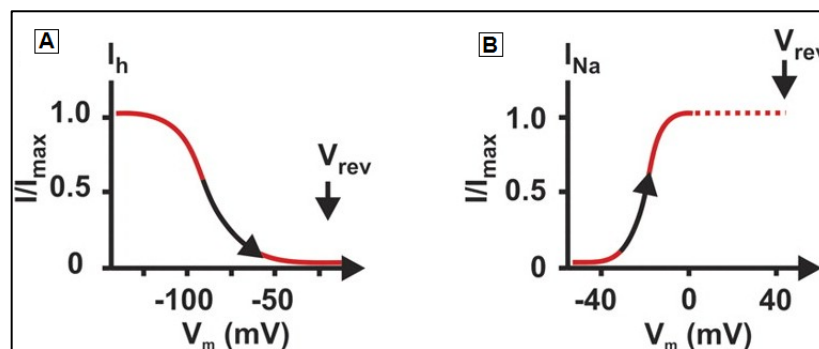
**Figura 11.** Blocco della corrente  $I_h$  somministrando  $Cs^+$  10 mM (McCormick e Pape, 1990).

Somministrando il  $Cs^+$ , infatti, si osserva un'iperpolarizzazione del potenziale di membrana, confermando l'effetto depolarizzante della corrente  $I_h$  e il suo contributo nella determinazione del valore di  $V_R$  (Maccaferri et al., 1993; McCormick e Pape, 1990).

I canali HCN, aperti costitutivamente a riposo, stabilizzano il  $V_R$  abbassando la resistenza d'ingresso della membrana ( $R_M$ ), definita come il rapporto tra la variazione del voltaggio e la corrente richiesta per realizzarla; in ogni cellula questo valore è indice del numero di canali che sono aperti al potenziale di riposo. Alcuni esperimenti (Pape, 1994) mostrano come neuroni privati della corrente  $I_h$  aumentino la propria  $R_M$ ; ne deriva che ogni ingresso di corrente in cellula sarà in grado di evocare una maggiore variazione del potenziale di membrana rispetto alla situazione opposta in cui la  $I_h$  è presente.

Osservazioni sperimentali (Edman et al., 1992) hanno mostrato come la corrente sia in grado di ridurre l'eccitabilità della cellula e le fluttuazioni del potenziale di riposo dovute a fenomeni quali variazioni nell'omeostasi del potassio, variazioni di temperatura e pH.

Al contrario di quanto succede per i canali del  $Ca^{++}$  e del  $Na^+$  voltaggio-dipendenti che sono totalmente attivi al loro potenziale di inversione ( $V_{rev}$ ), la corrente  $I_h$  ha un  $V_{rev}$  che sta alla base della curva di attivazione ([figura 12](#)).



**Figura 12. A.** Il potenziale d'inversione della corrente  $I_h$  cade alla base della curva di attivazione. Una parziale attivazione della corrente guida il potenziale di membrana verso il potenziale d'inversione alla base della curva. In questo modo si verifica una auto-inibizione da parte della corrente  $I_h$  al fine di stabilizzare il potenziale di membrana. **B.** Esempio di corrente voltaggio-dipendente ( $I_{Na}$ ) che ha potenziale d'inversione all'apice della curva di attivazione (Biel et al., 2009).

Se la membrana viene iperpolarizzata, aumenta la frazione di canali HCN aperti e si genera una corrente depolarizzante che trascina il potenziale di membrana verso il potenziale di inversione della  $I_h$ ; se

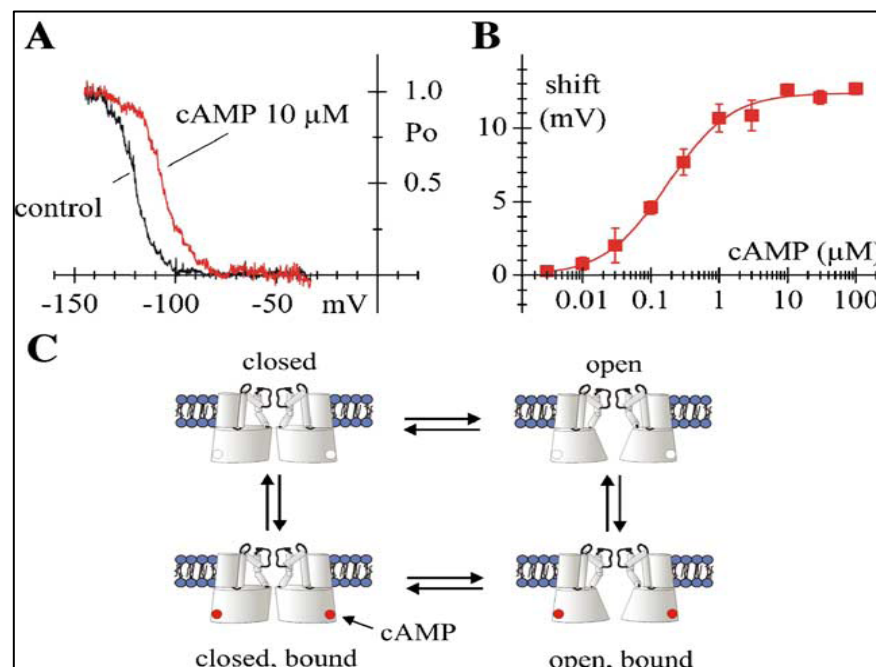
invece la membrana si depolarizza, il numero di canali HCN aperti tenderà a diminuire determinando quindi la comparsa della corrente (Biel et al., 2009).

Al contrario di quanto affermato finora, la  $I_h$  può assumere un ruolo fondamentale anche nel favorire l'eccitabilità delle cellule nervose. Come già ricordato, l'eccitabilità varia in funzione del potenziale di membrana a riposo; la corrente  $I_h$ , influenzando il valore di  $V_R$ , può rendere la membrana dei neuroni che la esprimono più eccitabile.

Oltre alle funzioni finora citate che contraddistinguono i neuroni, la corrente *pacemaker* conferisce attività spontanea ad alcune cellule che la esprimono. Le suddette, in assenza di ogni altro stimolo esterno, sono in grado di generare in modo autonomo potenziali d'azione. Questa peculiarità dipende dalle proprietà fisiologiche della corrente *pacemaker* in grado di attivarsi in iperpolarizzazione ed è stata ampiamente descritta e documentata studiando la funzione dei canali HCN nel tessuto cardiaco.

L'automatismo del battito cardiaco è dovuto alla presenza di particolari cellule chiamate cellule *pacemaker* a livello del nodo seno-atriale (NSA). I potenziali d'azione che si originano in queste cellule al termine della ripolarizzazione non presentano potenziali di riposo stabili ma sono caratterizzati da una fase chiamata di depolarizzazione diastolica lenta compresa tra valori di -65 e -40 mV. Durante questa fase, la membrana raggiunge il valore soglia necessario per l'attivazione dei canali del  $Ca^{++}$  di tipo L e T responsabili della generazione di un nuovo potenziale d'azione. La depolarizzazione *pacemaker* è dovuta a diverse correnti depolarizzanti, tra le quali la corrente  $I_f$  (come viene chiamata la corrente  $I_h$  nel cuore) gioca un ruolo fondamentale. Nel NSA la corrente *pacemaker* presenta una soglia di attivazione intorno ai -40/-35 mV e metà dei canali HCN risultano aperti per valori di voltaggio intorno ai -70/-65 mV: questo suggerisce che sia proprio la  $I_f$  responsabile della fase di depolarizzazione diastolica lenta (DiFrancesco et al., 1986).

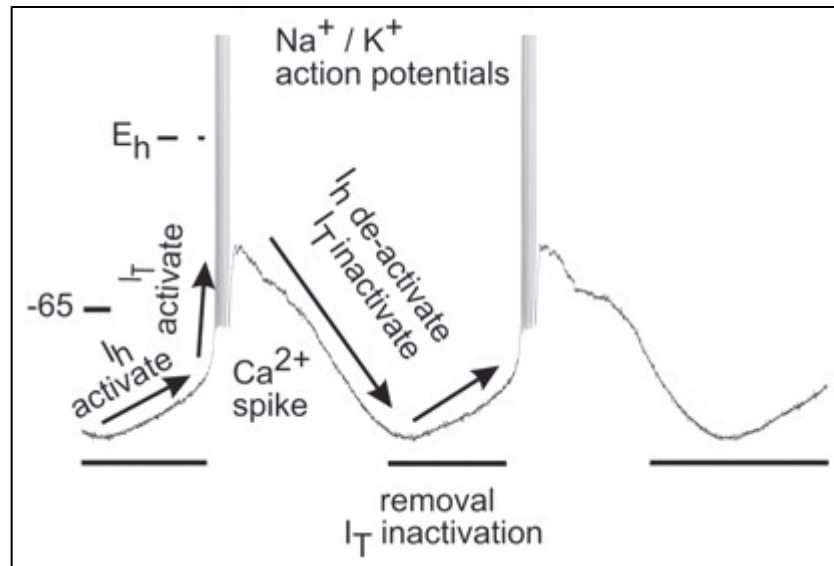
Grazie alle particolari caratteristiche di modulazione, la corrente *pacemaker* assume un ruolo fondamentale anche nella regolazione del battito cardiaco da parte del sistema nervoso autonomo. L'attivazione di recettori  $\beta$ -adrenergici causa un aumento di AMPc; al contrario l'attivazione di recettori muscarinici M2 ne causa una diminuzione. La concentrazione intracellulare di AMPc può modulare la corrente  $I_f$  ([figura 13](#)) andando a modificare la pendenza della depolarizzazione diastolica lenta e a influenzare il tempo necessario per l'innesco del successivo potenziale d'azione (DiFrancesco e Mangoni, 1994).



**Figura 13.** **A.** Curva di probabilità di apertura dei canali ( $P_o$ ) misurata in un esperimento di *patch-clamp* in condizioni di controllo e durante la perfusione di AMPc 10  $\mu$ M. L'azione del cAMP è quella di spostare la curva di attivazione verso voltaggi più positivi (circa 14 mV nel caso riportato). **B.** Curva dose-risposta dello *shift* indotto da AMPc (dati indicati come media  $\pm$  SEM). **C.** Schema base della modulazione del canale da parte del AMPc (Baruscotti et al., 2005).

Analogamente a quanto avviene nel NSA, oscillazioni ritmiche del potenziale di membrana vengono osservate anche in un ampio numero di neuroni nel SNC (Kandel et al., 2003). In particolare i neuroni della porzione talamo corticale sono in grado di scaricare spontaneamente brevi raffiche di potenziali d'azione in assenza di alcuno stimolo. Questo

particolare profilo di scarica è dovuto all'azione della corrente  $I_h$  e a una corrente di calcio ( $I_T$ ) ([figura 14](#)).



**Figura 14.** Profilo di scarica dei potenziali d'azione nei neuroni talamo-corticali (Biel et al., 2009)

Anche in questi neuroni la corrente pacemaker sostiene la fase di depolarizzazione lenta accompagnando il potenziale di membrana verso il valore soglia di apertura dei canali  $Ca_T$ . La corrente di calcio rende più ripida la fase di depolarizzazione permettendo il raggiungimento del valore soglia per l'innescò di un nuovo potenziale d'azione. La depolarizzazione prodotta durante la generazione dei potenziali d'azione provoca l'inattivazione dei  $Ca_T$  e fa chiudere i canali HCN. L'iperpolarizzazione, che fa seguito al treno di potenziali d'azione, toglie i canali  $Ca_T$  dallo stato di inattivazione e fa riaprire i canali HCN dando inizio ad un ciclo successivo del ritmo (McCormick e Huguenard, 1992). Il Talamo rappresenta la principale stazione di stimoli in entrata e in uscita dalla corteccia e si pensa che questa attività oscillatoria dei neuroni talamici rappresenti una sorta di meccanismo di controllo (McCormick e Bal, 1997).

## 2.6 Canali HCN e canalopatie

I canali HCN presenziano a importanti funzioni come la modulazione dell'eccitabilità e ritmicità neuronale, l'integrazione del segnale e la plasticità cellulare (Pape, 1996; Robinson e Siegelbaum, 2003; Biel et al., 2009).

È logico supporre che anche alterazioni a livello di questi canali possano influire sulla capacità delle cellule neuronali di integrare correttamente stimoli inibitori ed eccitatori, condizione fondamentale per un normale funzionamento dei circuiti neuronali. In base a tali presupposti, tra i canali ionici coinvolti nell'eccitabilità neuronale, i canali HCN stanno, negli ultimi anni, suscitando notevole interesse da parte di numerosi gruppi di studio nazionali e internazionali.

A causa del loro ruolo nell'eccitabilità neuronale, eventuali disfunzioni nei canali HCN possono contribuire all'insorgenza di quadri patologici riconducibili a specifiche forme di epilessia (Bender e Baram, 2008; Reid et al., 2009; Dube et al., 2009; Dyhrfeld-Johnsen et al., 2009; Lewis e Chetkovich, 2011).

HCN1 e HCN2 sono le due isoforme espresse a livello dei dendriti distali delle cellule piramidali nell'ippocampo e nella neocorteccia (Notomi e Shigemoto, 2004).

Numerosi studi dei canali HCN1 e HCN2 condotti su modelli *knockout* (KO) murini, comprovano l'esistenza di un legame tra alterazione funzionale dei canali HCN ed epilettogenesi: nei topi KO per HCN1 la mancata espressione del gene *Hcn1* e della relativa proteina in membrana porta all'abolizione della corrente  $I_h$  con conseguente aumento dell'eccitabilità corticale (Huang et al., 2009). Nei neuroni corticali la mancanza dei canali HCN1 aumenta la resistenza in ingresso a livello delle terminazioni dendritiche, portando da una maggiore integrazione sinaptica e all'incremento del *firing* (Huang et al., 2009). Per lo stesso modello murino HCN1-null, anche nei neuroni piramidali CA1 dell'ippocampo è stata osservata una maggiore eccitabilità dendritica (Nolan et al., 2004; Tsay et al., 2007). Inoltre, ad avvalorare il



ruolo *down*-regolativo sull'epilettogenesi della corrente  $I_h$ , topi KO per HCN2 (cioè, con deficit globale della proteina HCN2) presentano crisi di assenza spontanee (Ludwig et al., 2003). Crisi di assenza generalizzata (con complessi punta-onda a 3-4 Hz e ritmo di fondo normale) sono state osservate anche in topi mutanti per HCN2 (topi apatetici), nei quali le proteine canale HCN2, mancando del C-terminale, possiedono bassi livelli di espressione (Chung et al., 2009).

In pazienti con convulsioni febbrili familiari o sporadiche sono state identificate diverse varianti dei canali HCN1 e HCN2: in tutti questi casi però non è stato possibile evidenziare significativi cambiamenti funzionali mutazione-dipendenti dei canali HCN (Tang et al., 2008). Un recente studio ha identificato una variante HCN2 in pazienti con convulsioni febbrili o epilessia genetica con convulsioni febbrili (GEFS+, *Genetic Epilepsy with Febrile Seizures plus*): tale variante è costituita da una delezione di 3 proline consecutive (delPPP) nel C-terminale, che, secondo analisi statistiche, porta ad un aumento dell'ampiezza della corrente nei canali mutati (Dibbens et al., 2010). Tuttavia non è stato sperimentalmente chiarito come questa mutazione influenzi le proprietà funzionali del canale ed aumenti l'eccitabilità neuronale.

Pertanto, pur essendoci in letteratura numerose evidenze che indicano un chiaro legame tra disfunzioni dei canali HCN ed epilettogenesi, non è stata finora fornita una prova oggettiva che metta in correlazione funzionale una specifica mutazione nei geni HCN con l'aumentata eccitabilità neuronale epilettogena.

## SCOPO DEL LAVORO

Nel laboratorio di Fisiologia Molecolare e Neurofisiologia dell'Università degli Studi di Milano (Dipartimento di Scienza Biomolecolare e Biotecnologie) è già da tempo in corso uno studio sul ruolo dei canali HCN e della corrente  $I_f$  nel contesto di patologie cardiache.

I canali HCN sono canali ionici attivati in iperpolarizzazione e regolati da nucleotidi ciclici. Vengono espressi a livello della membrana cellulare di cellule eccitabili e la loro permeabilità nei confronti di  $Na^+$  e  $K^+$  origina una corrente ionica coinvolta nella regolazione di importanti funzioni fisiologiche.

L'espressione delle isoforme HCN1 e HCN2 a livello del cervello ha spostato l'attenzione su un possibile ruolo dei canali *pacemaker* nel contesto di patologie del SNC. In particolare è stata posta l'attenzione sullo studio di sindromi epilettiche, soprattutto in seguito all'osservazione sperimentale di un coinvolgimento di altri canali ionici quali  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{++}$  in alcune forme di epilessia idiopatica. L'ipotesi che mutazioni a carico dei canali HCN possano essere implicate nella fisiopatogenesi di alcune forme di epilessia è supportata dalla creazione di un modello animale *knock-out* per il gene *Hcn2* che manifesta un fenotipo epilettico (Ludwig et al., 2003).

Alla luce di queste premesse e per indagare ulteriormente la correlazione tra disfunzioni dei canali HCN ed epilettogenesi, si è deciso di effettuare uno *screening*, utilizzando l'approccio del gene candidato, dei geni *Hcn1* e *Hcn2* in un pool di pazienti con epilessia idiopatica parziale o generalizzata e le loro rispettive famiglie. Una volta individuate alterazioni nella sequenza genica, l'obiettivo è stato quello di caratterizzarle da un punto di vista funzionale e definirne il possibile coinvolgimento nella patologia.

## **MATERIALI E METODI**

### **4.1 Reclutamento dei pazienti**

Tutti i protocolli impiegati in questo progetto di ricerca sono stati esaminati e approvati dai comitati etici dell'Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza e dell'Università degli Studi di Milano.

I pazienti sono stati reclutati dal Dipartimento di Neurologia e Neuroscienze dell' Azienda Ospedaliera San Gerardo di Monza (Centro per l'Epilessia, Clinica di Neuropsichiatria Infantile e Neurofisiologia Pediatrica). Per lo studio è stato selezionato un *pool* di 113 pazienti di età variabile (67 adulti e 46 adolescenti) che presentavano epilessia idiopatica generalizzata o parziale, sia sporadica che familiare. Nello *screening* è stato anche incluso un gruppo di controllo di 350 soggetti non epilettici. Tutti i soggetti hanno sottoscritto un consenso informato.

La diagnosi di epilessia è stata fatta in accordo con la Classificazione Internazionale delle Crisi Epiletiche redatta dalla *International League Against Epilepsy* (ILAE) (Berg et al., 2010). Pazienti con epilessia sintomatica o altre canalopatie note non sono stati inclusi in questo studio.

### **4.2 Estrazione e quantificazione del DNA**

Da ciascun soggetto sono stati prelevati 5 ml di sangue (trattati con sodio-citrato per prevenirne la coagulazione) o un campione di saliva.

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero o dal campione di saliva utilizzando un kit commerciale (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen) secondo protocollo standard (tabella 4).

Il DNA è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro Ultrospec® 1100 pro (Amersham Biosciences). Una stima quali-quantitativa del DNA estratto è stata inoltre effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% confrontando la banda del DNA genomico con quelle del ladder da 1 Kb (GeneRuler® 1 kb DNA Ladder, Fermentas).

**PROTOCOLLO STANDARD DI ESTRAZIONE CAMPIONI EMATICI**

- Mettere 200 µl di sangue in una provetta da 1,5 ml
- Aggiungere 20 µl di *QIAGEN Protease (o Proteinase K)* al campione di sangue
- Aggiungere 200 µl di *Buffer AL* e agitare con vortex per 15 s
- Incubare a 56°C per 10 minuti
- Aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%) e agitare con vortex per 15 s
- Posizionare una colonna con filtro nell'apposito tubo raccogli campione. Aggiungere la mix nella colonna con filtro e centrifugare a 8000 rpm (6000 g) per 1 minuto
- Eliminare l'eluato e porre la colonna con filtro in un nuovo tubo raccogli campione
- Aggiungere nella colonna con filtro 500 µl di *Buffer AW1* e centrifugare a 8000 rpm (6000 g) per 1 minuto.
- Eliminare l'eluato e porre la colonna con filtro in un nuovo tubo raccogli campione
- Aggiungere 500 µl di *Buffer AW2* e centrifugare a 14000 rpm (20000 g) per 3 minuti
- Eliminare l'eluato e centrifugare nuovamente per 1 minuto
- Porre la colonna con filtro in una provetta da 1,5 ml ed aggiungere 200 µl di acqua MilliQ (MilliPore™)
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugare a 8000 rpm (6000 g) per 1 minuto
- Conservare il campione a +4°C in attesa della successiva analisi

**PROTOCOLLO STANDARD DI ESTRAZIONE TAMPONE BOCCALE**

- Mettere il tampone boccale in una provetta da 2 ml ed aggiungere 400 µl di PBS
- Aggiungere 20 µl di *QIAGEN Protease (o Proteinase K)* e 400 µl di *Buffer AL* al campione ed agitare con vortex per 15 s
- Incubare a 56° C per 10 minuti
- Aggiungere 400 µl di etanolo (96-100%) e agitare con vortex per 15 s
- Posizionare una colonna con filtro nell'apposito tubo raccogli campione. Aggiungere la mix nella colonna con filtro e centrifugare a 8000 rpm (6000 g) per 1 minuto
- Eliminare l'eluato e porre la colonna con filtro in un nuovo tubo raccogli campione
- Aggiungere nella colonna con filtro 500 µl di *Buffer AW1* e centrifugare a 8000 rpm (6000 g) per 1 minuto
- Eliminare l'eluato e porre la colonna con filtro in un nuovo tubo raccogli campione
- Aggiungere 500 µl di *Buffer AW2* e centrifugare a 14000 rpm (20000 g) per 3 minuti
- Eliminare l'eluato e centrifugare nuovamente per 1 minuto
- Porre la colonna con filtro in una provetta da 1,5 ml ed aggiungere 150 µl di acqua MilliQ
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e centrifugare a 8000 rpm (6000 g) per 1 minuto
- Conservare il campione a +4°C in attesa della successiva analisi

**Tabella 4.** Protocolli di estrazione del DNA genomico (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, Third Edition, April 2010).

### 4.3 Amplificazione e analisi del DNA

#### Polymerase Chain Reaction (PCR)

Lo *screening* delle possibili mutazioni presenti nei geni umani Hcn1 e Hcn2 è stata condotta sul DNA genomico opportunamente amplificato nelle regioni codificanti di interesse tramite la tecnica PCR. La reazione di amplificazione è stata ottenuta utilizzando l'enzima FastStart® Taq polimerasi (Roche).

#### Disegno dei primers e condizioni di amplificazione

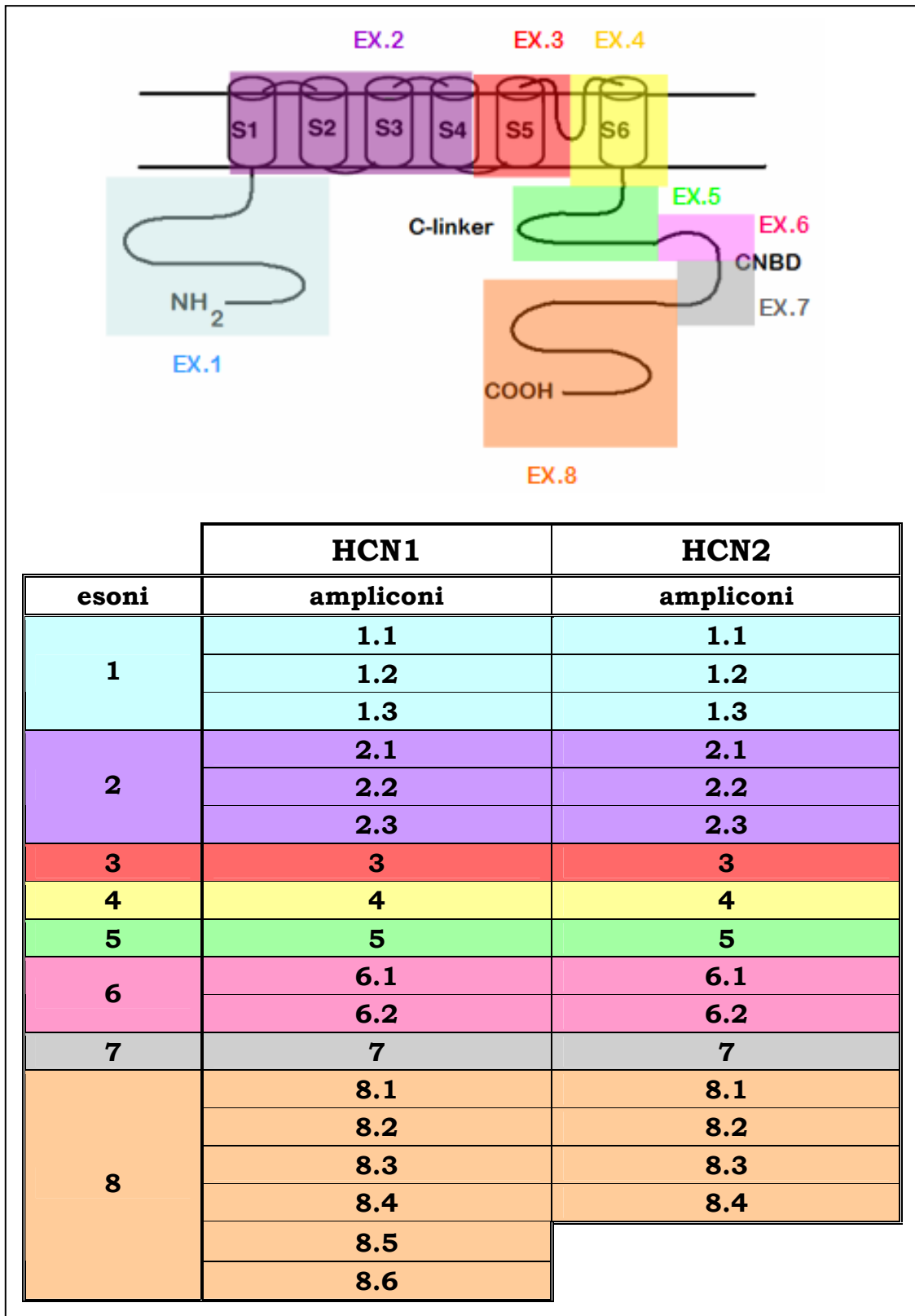
Gli 8 esoni che costituiscono il gene Hcn1 sono stati suddivisi in 18 ampliconi di dimensioni comprese tra i 188 e i 324 nt mentre gli 8 esoni che costituiscono il gene Hcn2 sono stati suddivisi in 16 frammenti dalle dimensioni comprese tra i 164 e i 327 nt ([figura 15](#)).

Per ognuno di questi frammenti abbiamo progettato una coppia di primers mediante l'utilizzo del *software* Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) ([tabella 5](#)).

La mix di reazione utilizzata è stata:

	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale
<b>DNA</b>	100 ng/μl	5 ng/μl
<b>PCR Buffer</b>	10X	1X
<b>GC-RICH solution</b>	5X	1X
<b>dNTPs</b>	100 mM (per ogni dNTP)	0,2 mM (per ogni dNTP)
<b>Oligo forward</b>	25 μM	1,25 μM
<b>Oligo reverse</b>	25 μM	1,25 μM
<b>Taq Polimerasi</b>	5U/μl	0.05 U/μl
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	Al volume finale di 20 μl	

A seconda del frammento da amplificare sono state messe a punto delle condizioni ottimali che variano nel numero di cicli di reazione, nell'enzima usato e nella temperatura di annealing (di ibridazione) dei primers ([tabella 6](#)).



**Figura 15.** Rappresentazione schematica della struttura dei canali HCN. Nella tabella si evidenziano i frammenti in cui sono stati suddivisi gli 8 esoni dei geni Hcn1 e Hcn2.

Gene	Amplicone	Primer forward	Primer reverse	bp
Hcn1	Exon 1.1	taccctctcggetacgtgtc	ccacctgaagcacacggag	265
	1.2	ggacgatggcaacacgcgtct	ctctgcatgaagccgactg	246
	1.3	ctccgtgtgcttcaaggtgg	gcggggaagcgcgtttca	324
	Exon 2.1	gggggataggctggttattt	gggtccaggatgatttcaga	261
	2.2	aggactgggactgtcaatgaa	cgcaagagactgagaattttg	218
	2.3	aagacagccaggcacttc	catggaaaagagtctgcgaa	244
	Exon 3	acgctacacaacatcaatgc	ggcacaacgttgaaaagtca	301
	Exon 4	gccatcctaattggctcagtc	tggttaaagacattggcgata	301
	Exon 5	tgatttctgatacacccctaacaatg	aacgtggactagaagatttcca	287
	Exon 6.1	ttcagcatgtttttctccaga	tccaggttgaacacctca	188
	6.2	ccatgctgagcaagttgaga	ctgacatgctgacatctccaaa	247
	Exon 7	tcaaacaagtcattcttctttgtg	gcaaacctgtattatgccagga	264
	Exon 8.1	tctcacttggcgttgcac	tcggggtcgtagtagacgat	252
	8.2	aaacatgacaggagatggtg	ggggaggcatagtggaaagt	287
	8.3	agcctgtctcacagcaacct	cgctgcttctgtgcacttcat	300
	8.4	ccgctcgaactttccactat	tgggatgaggtctggaaatc	282
	8.5	ggaagtcaggccactctcc	tgcgtctgggtctgtgttta	301
	8.6	gtcacctcttccgacagat	ggccacagctgtctaaaatc	288
Hcn2	Exon 1.1	cggctccgctccgactg	ctgcccttggccgtgctc	325
	1.2	cagccgcgacagctcgtg	cgcagcgagaacttgttgac	315
	1.3	agcttcatgcagcgcag	ctcccaggcgtccaag	236
	Exon 2.1	cgtcccccaaggaagagt	atctccgtgtgtcctcgat	278
	2.2	cttcaaggatgagaccactgc	gctgaggatcttggatgaagc	295
	2.3	catcttcttatcgtggag	ccatgcaccattatagcc	206
	Exon 3	gctggggctctgaaggtg	ctgtatgggagcctgcgtct	277
	Exon 4	gaggaccgaggctcctg	gcctccccatcagaacc	327
	Exon 5	gaccagcctcgcctctcc	gtaccggaggctgcctcccgc	214
	Exon 6.1	tctctcagacgaggaaactgg	cttcgcgatgatgtagtca	250
	6.2	gccaacgccgacccaactt	gtgccccctccccctccag	230
	Exon 7	gcgcccgcctcgtccagcaac	tctctgatgccttgccacgc	262
	Exon 8.1	gcaggcgtccctgtgcacac	gccacctgcgggcagaagctc	282
	8.2	gtcacctcggccatgccac	ggcgcgacgcgggctcag	289
	8.3	accgcgacctcgcctacg	agctgctggccggcgtgt	164
	8.4	actgtccgctcgcagccct	ggcagcgcaatggcatggct	294

**Tabella 5.** Primers usati per lo screening dei geni Hcn1 e Hcn2. Per ogni amplicone si riportano le sequenze dei primers e la lunghezza in paia di basi del frammento amplificato.

Gene	Amplicon	Condizioni di PCR		bp
<b>Hcn1</b>	Exon 1.1	62°x30"	35 cicli	265
	1.2	62°x30"	30 cicli	246
	1.3	62°x30"	30 cicli	324
	Exon 2.1	62°x40"	30 cicli	261
	2.2	62°x40"	30 cicli	218
	2.3	59°x30"	30 cicli	244
	Exon 3	62°x40"	30 cicli	301
	Exon 4	64°x40"	30 cicli	301
	Exon 5	62°x40"	30 cicli	287
	Exon 6.1	62°x40"	30 cicli	188
	6.2	62°x40"	30 cicli	247
	Exon 7	62°x40"	30 cicli	264
	Exon 8.1	62°x40"	35 cicli	252
	8.2	62°x40"	35 cicli	287
	8.3	62°x40"	35 cicli	300
	8.4	62°x40"	35 cicli	282
	8.5	62°x40"	35 cicli	301
	8.6	59°x40"	35 cicli	288
<b>Hcn2</b>	Exon 1.1	70°x30"	30 cicli	325
	1.2	64°x30"	30 cicli	315
	1.3	68,2°x40"	30 cicli	236
	Exon 2.1	65,7°x30"	30 cicli	278
	2.2	67,3°x30"	14 cicli	295
		60,3°x30"	19 cicli	
	2.3	53°x40"	30 cicli	206
	Exon 3	70°x40"	30 cicli	277
	Exon 4	66,3°x30"	30 cicli	327
	Exon 5	TD 70° x30" (-0,5° ogni ciclo)	30 cicli	214
	Exon 6.1	58,3°x30"	35 cicli	250
	6.2	70°x30"	30 cicli	230
	Exon 7	TD 68°-58°x30"	6x5 cicli	262
	Exon 8.1	70°x30"	30 cicli	282
	8.2	70°x35"	30 cicli	289
8.3	70°x35"	30 cicli	164	
8.4	70°x35"	30 cicli	294	

**Tabella 6.** Programmi di amplificazione per i geni Hcn1 e Hcn2. Per ogni amplicone si riportano le Tm dei primers e il numero di cicli effettuati.



Per verificare la resa del processo di amplificazione e le dimensioni dei frammenti ottenuti, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Parallelamente ai campioni amplificati è stato caricato un ladder da 100 bp (GeneRuler® 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas).

#### **4.4 Analisi dei frammenti amplificati**

Per eseguire lo screening dei geni Hcn1 e Hcn2 alla ricerca di possibili mutazioni, i prodotti di PCR così ottenuti sono stati analizzati mediante le tecniche del *Single-Strand Conformational Polymorphism* (SSCP) e *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography* (DHPLC). Per entrambe le tecniche, tracciati elettroforetici o cromatografici differenti da quello *wild-type*, suggeriscono la presenza di mutazioni che dovranno poi essere confermate mediante sequenziamento diretto.

##### **Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

Tecnica elettroforetica che permette di discriminare eventuali sostituzioni nucleotidiche evidenziandole sottoforma di patterns di corsa differenti rispetto al campione *wild-type*.

L'SSCP costituisce una delle metodiche più utilizzate nell'individuazione di mutazioni puntiformi. La tecnica prevede l'amplificazione dei frammenti di DNA mediante PCR, la loro denaturazione a 95°C per 10 minuti con l'aggiunta di un uguale volume di agente denaturante (formammide) e successiva corsa su gel di poliacrilammide al 6% (rapporto acrilammide:bis-acrilammide = 29:1) in condizioni non denaturanti. Come buffer di corsa è stato utilizzato tampone TBE 1X. L'apparato per elettroforesi utilizzato è il modello Hoefer® SQ3 Sequencer (Amersham Biosciences).

Durante l'elettroforesi, i frammenti di DNA a singola elica migrano in modo specifico in base alla loro sequenza: se la sequenza del frammento in esame risulta differente rispetto al frammento *wild-type*, anche per un singolo nucleotide, ciò che si osserva, dopo colorazione Silver

Staining, è un pattern elettroforetico differente fra campione in esame e campione *wild-type*.

La tecnica SSCP permette di individuare circa l'80% delle mutazioni.

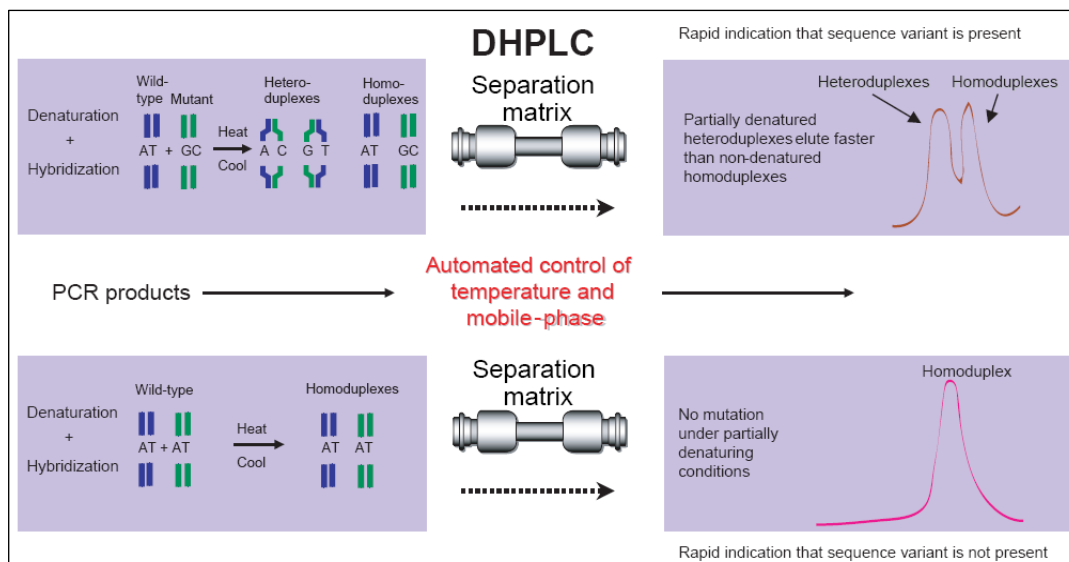
### Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Tecnica cromatografica parzialmente denaturante che permette di identificare singole sostituzioni nucleotidiche o piccole inserzioni e/o delezioni in regioni amplificate di un gene.

La cromatografia ad alte prestazioni in condizioni denaturanti (DHPLC) è una tecnica che permette di discriminare molecole di DNA eteroduplex da molecole di DNA omoduplex attraverso una separazione cromatografica eseguita in particolari condizioni di temperatura. Frammenti di DNA eteroduplex si formano quando un frammento mutato ed uno *wild-type*, amplificati mediante PCR, vengono denaturati termicamente e poi fatti rinaturare insieme (figura 16).

La tecnica DHPLC possiede una sensibilità di circa il 95%.

L'apparato utilizzato è il modello WAVE® System 3500 (Transgenomic).



**Figura 16.** Individuazione di mutazioni tramite DHPLC. I prodotti di PCR in seguito a denaturazione e rinaturazione formano quattro tipi di riappaiamenti, due omoduplex e due eteroduplex. I frammenti vengono separati attraverso una matrice unica (DNASep®), utilizzando un gradiente di acetonitrile (da Lilleberg, 2003).

Le condizioni di corsa (temperature) di ciascun amplicone sono state determinate mediante l'utilizzo del software Wavemaker® (Transgenomic) sulla base della sequenza di DNA da analizzare.

Il principio di separazione cromatografica si basa sul meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (IP-RP-HPLC).

La fase stazionaria è costituita da particelle di polistirene-divinilbenzene sottoposte a reazione di alchilazione (DNASep®, Transgenomic).

La fase mobile è una miscela di due soluzioni: la soluzione A (trietilammonioacetato [TEAA] 100 mM, pH 7,0) e soluzione B (TEAA 100 mM + 25% di acetonitrile, a pH 7,0).

Il TEAA è costituito da una porzione apolare e da una zona carica positivamente. È in grado di fungere da molecola ponte permettendo l'interazione dei frammenti di DNA con la matrice idrofobica della colonna. In base al tipo di frammento che si vuole analizzare, viene determinata una particolare temperatura applicata alla colonna. A questo valore di temperatura si verifica il disappaiamento dei filamenti eteroduplex in corrispondenza della mutazione dando luogo a porzioni a singola elica. Queste regioni disappaiate presentano una minore densità di gruppi fosfato e, di conseguenza, una minore densità di carica rispetto ai filamenti a doppia elica. Ne deriva una minore ritenzione da parte della fase stazionaria ed un tempo di eluizione inferiore a quello dei filamenti omoduplex.

L'utilizzo di un gradiente di solvente organico (acetonitrile), che compete nel legame alla resina del TEAA, porta all'eluizione dei frammenti in base alla loro sequenza ed è in grado di separare le molecole a singola elica da quelle a doppia elica. Per prime vengono eluite le molecole a singolo filamento, poi quelle parzialmente denaturate (eteroduplex) ed infine quelle completamente appaiate a doppio filamento (omoduplex). Il DNA eluito viene rivelato da un sistema spettrofotometrico che misura in continuo l'assorbanza a 260 nM.

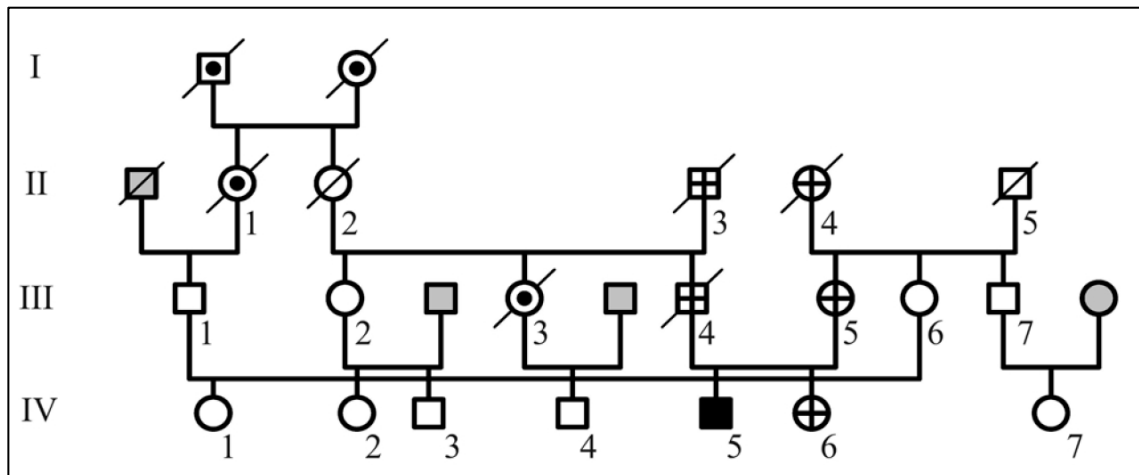
## 4.5 Sequenziamento dei campioni mutati

L'identificazione finale dei polimorfismi e delle mutazioni trovate è stata eseguita tramite sequenziamento diretto (Bio-Fab Research, Italia).

Lo screening genetico eseguito mediante le tecniche precedentemente descritte, ha permesso di identificare variazioni nella sequenza nucleotidica dei campioni analizzati in seguito al confronto con un campione *wild-type*. Nei casi in cui è stata individuata una presunta mutazione, il frammento in esame è stato riamplicato, purificato mediante kit commerciale NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) secondo protocollo standard, e sequenziato allo scopo di determinarne l'esatta sequenza.

## 4.6 Campioni 'particolari'

Nel caso di un probando (IV-5 in [figura 17](#)), per il quale è stata identificata una interessante mutazione in omozigosi nell'esone 5 del gene *Hcn2* (posizione 1543, sostituzione G>A), è stato necessario eseguire l'analisi genetica sui famigliari per chiarirne le modalità di trasmissione.



**Figura 17.** Epilessia generalizzata idiopatica in un paziente con una mutazione nel canale HCN2 (IV-5). Pedigree della famiglia del probando (4 generazioni). I famigliari deceduti sono indicati con un trattino obliquo, i famigliari il cui DNA non era reperibile sono indicati con un punto, i famigliari con la mutazione sono indicati con una croce. In grigio, gli individui non correlati.

Per i familiari deceduti imparentati col probando mutato (II-2, II-3, II-4, II-5 e III-4 in [figura 17](#)) il DNA è stato estratto da oggetti personali (II-2, II-3, II-4), da un campione biptico paraffinato di tessuto gastrico (II-5) e da un calcolo renale (III-4). In breve, le procedure di estrazione del DNA sono state le seguenti:

#### Calcolo renale

La superficie esterna della calcolo renale è stata raschiata con un bisturi sterile per eliminare possibili contaminazioni esterne. Il calcolo è stato tagliato in due parti e sono stati prelevati 5 gr di materiale interno. Tale materiale è stato polverizzato in azoto liquido e demineralizzato in EDTA (0,5 M) in agitazione per 3 ore. Dopo centrifugazione (4000 rpm per 3 minuti) ed eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso nel tampone di estrazione Stain Extraction Buffer (SEB) e addizionato di proteinasi K. La sospensione è stata incubata in agitazione *overnight* a 56° C e il giorno seguente si è proceduto con l'estrazione del DNA genomico tramite il kit commerciale QIAamp® DNA Blood Maxi Kit (Qiagen) secondo protocollo standard.

#### Tessuti inclusi in paraffina

Il campione è stato raschiato con la lama di un bisturi sterile per eliminare possibili contaminazioni esterne. Sono stati poi isolati due frammenti di tessuto e trattati, per l'estrazione del DNA genomico, con il kit commerciale QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo standard.

#### Oggetti personali

*Fazzoletto*: la zona contenente materiale organico è stata identificata tramite osservazione con luce a 445 nm (Crime-lite® Blue, Crimesight Technologies). La regione di interesse è stata poi isolata e trattata, per l'estrazione del DNA genomico, con il kit commerciale QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo standard.

*Protesi dentaria, occhiali*: il materiale organico presente su questi oggetti è stato raccolto per mezzo di tamponi di cotone inumiditi con acqua MilliQ® che sono stati poi trattati, per l'estrazione del DNA genomico, con il kit commerciale QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo standard.

La scarsa quantità e l'elevata frammentazione del DNA estratto dai suddetti campioni ha richiesto l'accorciamento dell'amplicone sull'esone 5 (86 bp). Sono quindi stati disegnati dei nuovi primers fiancheggianti la regione mutata di interesse: 5'-ACTTCCGCCAGAAGATCCAC-3'(For) e 5'-GTTGAGCTCGCCCAGGAT-3' (Rev).

Per confermare la natura endogena del DNA estratto e escludere possibili contaminazioni, i campioni sono stati amplificati con i kit commerciali AmpFISTR Profiler and AmpFISTR MiniFiler (Applied Biosystems) al fine di ottenerne i profili genetici identificativi (analisi dei polimorfismi STR) e confrontarli con quelli dei parenti in vita. L'analisi dei polimorfismi STR è stata ottenuta tramite elettroforesi capillare su analizzatore ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e risolta mediante softwares GeneScan v3.1.2 e Genotyper v2.1 (Applied Biosystems).

#### **4.7 Mutagenesi e studi di espressione in vitro**

Il vettore d'espressione con il gene Hcn2 mutato (mutazione 1543G>A) è stato ottenuto inserendo inizialmente il gene HCN2 *wild-type* in un vettore d'espressione pcDNA™ 3.1/Hygro (Invitrogen). La mutazione trovata è stata poi introdotta utilizzando il kit commerciale QuikChange® II XL (Stratagene) con i seguenti primers: 5'-AGGGCAAGATGTTTGACAAGGACAGCATCCTGGGC-3' (For); 5'-GCCCAGGATGCTGTCCTTGTC AACATCTTGCCCT-3' (Rev). La corretta inserzione della mutazione è stata poi confermata mediante sequenziamento diretto.

Gli esperimenti di trasfezione transiente sono stati condotti su due linee cellulari:

- cellule immortalizzate derivate dall'ovaio di criceto (CHO, *Chinese Hamster Ovary*)
- neuroni corticali neonatali di ratto CD (Charles River) isolati al giorno postnatale 3 (P3)

Per la trasfezione sono stati utilizzati i kit commerciali StoS<sup>®</sup> Transfection KIT (GeneSpin) (per le cellule CHO) e Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen) (per i neuroni corticali neonatali di ratto), seguendo i rispettivi protocolli standard. Le cellule sono state co-trasfettate con due plasmidi, uno contenente il gene *Hcn2* (*wild-type* omomero o mutato omomero o *wt*/mutato eteromero) e l'altro contenente il gene codificante per la Green Fluorescent Protein (GFP) (pmaxGFP<sup>®</sup>, Amara Biosystems) (CHO) o il gene codificante per la Yellow Fluorescent Protein (pEYFP-N1<sup>®</sup>, Clontech) (neuroni corticali).

Per ogni piastra Petri da 35 mm sono state utilizzate le seguenti quantità:

- per le cellule CHO: 1,5 µg di vettore HCN2 e 0,5 µg di vettore GFP
- per i neuroni: 3 µg di vettore HCN2 e 0,1 µg di vettore EYFP

Per gli esperimenti sui mutanti eteromerici (*wt*/mutato), per ogni piastra sono state utilizzate uguali quantità di vettore HCN2 *wild-type* e vettore HCN2 mutato (cellule CHO: 0,75 µg; neuroni: 1,5 µg).

Ogni esperimento di trasfezione è stato condotto in triplo.

### **Culture di cellule CHO**

Per lo studio della mutazione inizialmente sono stati condotti esperimenti di espressione funzionale in vitro su cellule CHO. Le cellule sono state coltivate in un terreno di mantenimento costituito da F-12 Ham's Medium (Euroclone) addizionato con 10% in volume di siero bovino (FBS, Gibco), 1% di antibiotici (Penicillin-Streptomycin solution, SIGMA), L-glutamina 1 mM e NaHCO<sub>3</sub> 12,5 mM. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37° C con una percentuale di CO<sub>2</sub> al 5%. Il giorno precedente l'esperimento di trasfezione, le cellule sono state

staccate dalla piastra con tripsina-EDTA 0,25% e piastrate in petri da 35 mm ad una confluenza del 50-60%.

### **Culture di neuroni neocorticali neonatali di ratto**

I neuroni neocorticali neonatali di ratto sono stati isolati al giorno post-natale 3 (P3). I ratti sono stati anestetizzati (con isoflurano) e decapitati; i cervelli sono stati rimossi e posti in un medium di dissociazione mantenuto in ghiaccio. Il medium (pH 7,2) contiene: acido isetionato sodico 134 mM, glucosio 23 mM, HEPES 15 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, acido chinurenico 10 mM. La corteccia cerebrale è stata isolata manualmente con micropinzette, tagliata in frammenti e digerita per 20 minuti a 37° C nel medium di dissociazione addizionato con 1,3 mg/ml di proteasi (tipo XIV, Sigma). Il tessuto è stato quindi risciacquato due volte nello stesso medium e dissociato meccanicamente utilizzando una pipetta Pasteur sterile. I neuroni dissociati sono stati piastrati (ad una densità di 1,5×10<sup>6</sup> cellule) su petri da 35 mm rivestite di poli-D-lisina. Dopo incubazione di 1 ora a 37° C e CO<sub>2</sub> al 5%, il medium di dissociazione è stato sostituito con terreno di coltura Neurobasal (Invitrogen) integrato con B27 (Invitrogen), Glutamax-I 1 mM (Invitrogen), 10 ng/ml di β-FGF (Invitrogen), 50 U/ml di penicillina G (Sigma) e 50 µg/ml di streptomina (Sigma). Le colture neuronali sono state mantenute a 37° C in CO<sub>2</sub> al 5% e transfettate lo stesso giorno.

## **4.8 Immunofluorescenza**

Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti su entrambe le tipologie cellulari. Le cellule sono state fissate in ghiaccio con formaldeide al 2%, permeabilizzate e immobilizzate in tampone fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) addizionato con sieroalbumina bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) all'1%, Triton X-100 al 0,3% e *Normal Donkey Serum* (NDS) al 10%, e incubate *overnight* a 4° C in camera umida con anticorpi primari (Rabbit anti-HCN2 policlonale, 1:100, Alomone Labs; Rabbit anti-YFP 1:500, AbCam). I



campioni sono stati poi risciacquati in PBS e incubati per 1 ora in camera umida e al buio con anticorpi secondari Donkey anti-Rabbit coniugati con fluorofori (Alexa Fluor® Green 488 e Red 594, 1:1000, Molecular Probes). Dopo un risciacquo finale con PBS, sono stati montati i vetrini coprioggetto utilizzando il montante Vectashield® Mounting Media (Vector Labs) addizionato contenente glicerolo e 4,6-DiAmino-Phenyl Indole (DAPI). Le immagini in fluorescenza sono state acquisite tramite un microscopio videoconfocale (Visual Confocal Microscopy, ViCo® Nikon).

#### **4.9 Elettrofisiologia**

Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule (CHO/neuroni) sono state staccate con tripsina e ripiastrate in piastre Petri da 35 mm ad una confluenza sufficientemente bassa da ottenere cellule isolate.

Le cellule in piastrina sono state poste sotto il microscopio ad inversione e le cellule esprimenti GFP/YFP sono state selezionate per lo studio della corrente  $I_h$  generata dall'espressione dei canali HCN2 *wilde-type* e/o mutati. L'analisi è stata effettuata con la tecnica del *patch-clamp* in configurazione *whole-cell* e tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente (25-26° C).

Entrambi i tipi cellulari sono stati inizialmente perfusi con una soluzione fisiologica: 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM D-glucose e 5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4).

Le soluzioni sperimentali utilizzate per lo studio della corrente  $I_h$  sono riportate in [tabella 7](#) per le cellule CHO e in [tabella 8](#) per neuroni. Inoltre, per valutare gli effetti di concentrazioni saturanti di AMPc sulla curva di attivazione della corrente  $I_h$ , sono state condotte alcune misure aggiungendo AMPc 10  $\mu$ M alla soluzione della pipetta (DiFrancesco e Tortora, 1991).

	<b>Soluzione extracellulare ad alto potassio (pH 7.4)</b>	<b>Soluzione intracellulare (pH 7.2)</b>
<b>NaCl</b>	110 mM	10 mM
<b>KCl</b>	30 mM	130 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,8 mM	
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,5 mM	0.5 mM
<b>HEPES-NaOH</b>	5 mM	-
<b>HEPES-KOH</b>	-	5 mM
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	1 mM *	-
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	2 mM *	-
<b>NiCl<sub>2</sub></b>	100 µM *	-
<b>EGTA</b>	-	1 mM
<b>Na-ATP</b>	-	2 mM
<b>Na-GTP</b>	-	0,1 mM
<b>Fosfocreatina</b>	-	5 mM

**Tabella 7.** Composizione delle soluzioni utilizzate per gli esperimenti di elettrofisiologia sulle cellule CHO (\* consentono di bloccare eventuali correnti contaminanti, di potassio e calcio, ed aumentare così la risoluzione della corrente  $I_h$ ).

	<b>Soluzione extracellulare (pH 7.4)</b>	<b>Soluzione intracellulare (pH 7.2)</b>
<b>NaCl</b>	129 mM	-
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,25 mM	-
<b>KCl</b>	3 mM	15 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,6 mM	-
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1,8 mM	-
<b>D-glucosio</b>	35 mM	-
<b>HEPES-NaOH</b>	10 mM	-
<b>HEPES-KOH</b>	-	10 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-	2 mM
<b>K-gluconato</b>	-	120 mM
<b>EGTA</b>	-	0,2 mM
<b>Na-ATP</b>	-	2 mM
<b>Na-GTP</b>	-	0,2 mM
<b>fosfocreatina</b>	-	20 mM
<b>leupeptina</b>	-	0,1 mM

**Tabella 8.** Composizione delle soluzioni utilizzate per gli esperimenti di elettrofisiologia sulle cellule neuronali.

### **Protocolli di acquisizione e analisi dei dati elettrofisiologici**

Le curve di attivazione delle correnti  $I_h$  sono state ottenute applicando un protocollo che prevede, partendo da un potenziale di riposo di -35 mV, dei gradini iperpolarizzanti test con intervalli di 10 mV (da -45 a -145 mV per i canali *wild-type* e mutato eteromero; da -45 e -165 mV per il canale mutato omomero) e con una durata

sufficiente da permettere alla corrente di raggiungere lo stato stazionario. A ogni potenziale test segue un gradino a potenziale di piena attivazione (-145 mV per i canali *wild-type* e mutato eteromero; -165 mV per il canale mutato omomero) e una depolarizzazione a +5 mV che consente di deattivare i canali.

Le ampiezze delle correnti registrate durante il gradino di piena attivazione sono state poi normalizzate al valore massimo e i valori così ottenuti sono stati interpolati con l'equazione di Boltzmann:

$$y = 1 / ( 1 + \exp ( V - V_{1/2} ) / s )$$

dove  $V$  indica il potenziale di registrazione,  $y$  la variabile di attivazione,  $V_{1/2}$  il valore di voltaggio al quale metà dei canali sono attivati e  $s$  l'inverse slope factor della curva di attivazione.

Le costanti di tempo di attivazione sono state ottenute interpolando le tracce di corrente registrate ai diversi potenziali test con la funzione mono-esponenziale:

$$I_t = I_{\infty} ( 1 - e^{-t/\tau} )$$

dove  $\tau$  è la costante di tempo, definita come il tempo necessario al raggiungimento del 63% della corrente allo stato stazionario ( $I_{\infty}$ ) e  $I_t$  è la corrente al tempo  $t$ .

Per calcolare le costanti di tempo di deattivazione è stato applicato un protocollo di voltaggio in cui sono stati applicati gradini depolarizzanti test con intervalli di 10 mV (da -65 a +5 mV per i canali *wild-type* e mutato eteromero; da -95 a +5 mV per il canale mutato omomero), preceduti da un gradino a potenziale di piena attivazione (-145 mV per i canali *wild-type* e mutato eteromero; -165 mV per il canale mutato omomero) e partendo da un potenziale di riposo di -35 mV. Le costanti di tempo di deattivazione sono state ottenute interpolando le tracce di corrente registrate ai diversi potenziali test con la funzione mono-esponenziale.

Nelle cellule CHO, la conduttanza della corrente  $I_h$  ( $g_h$ ) (pS/pF) è stata calcolata usando l'equazione:

$$g_h = I_h / (V - V_h)$$

dove  $V$  indica il potenziale di registrazione e  $V_h$  il potenziale di inversione della corrente  $I_h$  ( $-17.2 \pm 1.5$  mV,  $n=9$ ).

Conduttanza e densità di corrente sono state calcolate normalizzando l'ampiezza di corrente ( $I_h$ ) per la capacità della cellula.

Per le registrazioni in *current-clamp*, utilizzate per valutare l'effetto dell'espressione dei canali HCN2 *wt* e mutati sull'eccitabilità dei neuroni, il potenziale di membrana è stato mantenuto a  $-70$  mV.

I protocolli utilizzati per stimolare le cellule sono stati generati attraverso un apposito *software* (Clampfit® 9.2, Axon Instruments) interfacciato con un convertitore analogico/digitale (Digidata® 1322A, Axon Instruments) connesso ad un amplificatore da patch-clamp (Axopatch® 200B, Axon Instruments).

I dati grezzi sono stati analizzati utilizzando i *softwares* Clampfit® 9.2 e Origin® 7.0 (OriginLab).

#### **4.10 Analisi statistica**

Per entrambi i tipi di cellulari e in ciascun esperimento, sono state confrontate le proprietà dei canali HCN2 mutati *vs* i canali HCN2 *wild-type*.

I dati ottenuti sono stati presentati come valore medio  $\pm$  media degli errori standard (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.). Le differenze statistiche sono state valutate mediante il test ANOVA a una via, seguito da test esatto di Fisher per la valutazione della significatività, o mediante il test  $t$  di Student per popolazioni indipendenti. Il livello di significatività statistica è stato fissato a  $P = 0,05$ .

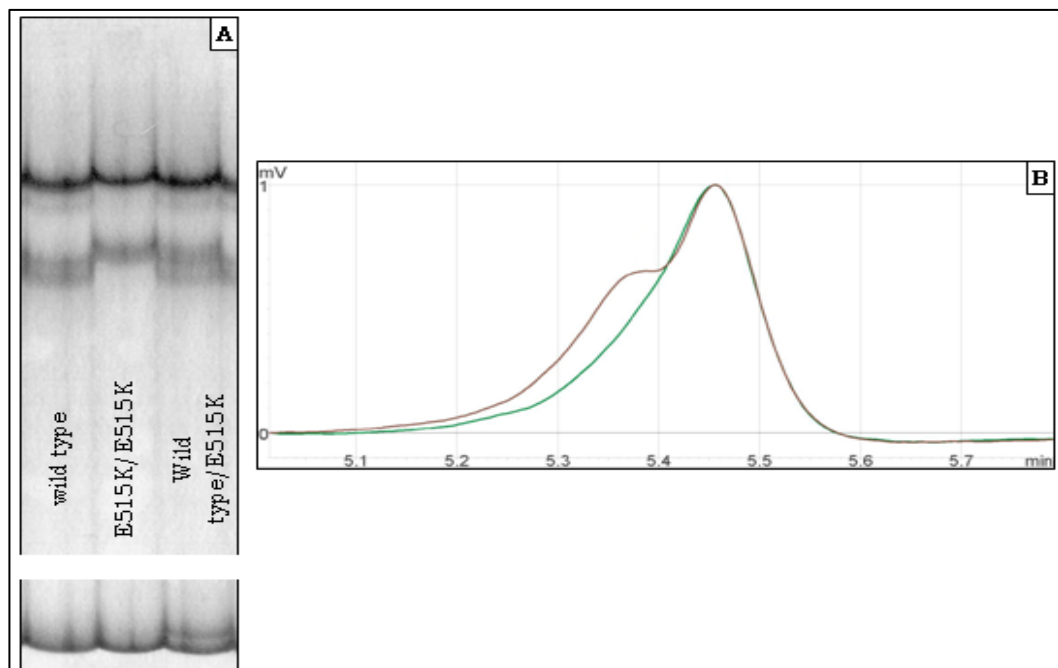
## Risultati

La corrente pacemaker  $I_h$  mostra una serie di proprietà essenziali per la regolazione ed il controllo dell'eccitabilità delle cellule del SNC. Tra queste le più rilevanti sono: il contributo alla generazione del potenziale di riposo ( $V_R$ ) e la capacità di mantenere stabile il  $V_R$  stesso controllandone le oscillazioni. Mutazioni nei geni codificanti per i canali HCN, in particolare delle isoforme HCN1 e HCN2, potrebbero essere implicate in alterazioni dell'eccitabilità neuronale e, di conseguenza, in patologie del SNC.

### Risultati dello screening genetico

Allo scopo di individuare polimorfismi e/o mutazioni nei geni hHcn1 e hHcn2, abbiamo effettuato lo *screening* della sequenza di tali geni in pazienti affetti da epilessia idiopatica generalizzata o parziale, sia sporadica che familiare.

Tutte le PCR sono state ottimizzate per le successive analisi su SSCP e DHPLC.



**Figura 18.** Risultati dello *screening* dell'esone 5 del gene hHcn2. Mutazione E515K. **A.** *patterns* di corsa su SSCP; **B.** cromatogramma su DHPLC.

La tecnica elettroforetica SSCP prevede la corsa di amplificati denaturati su gel di poliacrilammide al 6%. Il *pattern* di corsa dei vari campioni differisce in base alla mobilità elettroforetica dei singoli filamenti (presenza e tipologia di strutture secondarie) ([figura 18A](#)). Differenze osservate nei *patterns* di corsa (rispetto al campione wt) suggeriscono la presenza di mutazioni, verificate poi tramite sequenziamento.

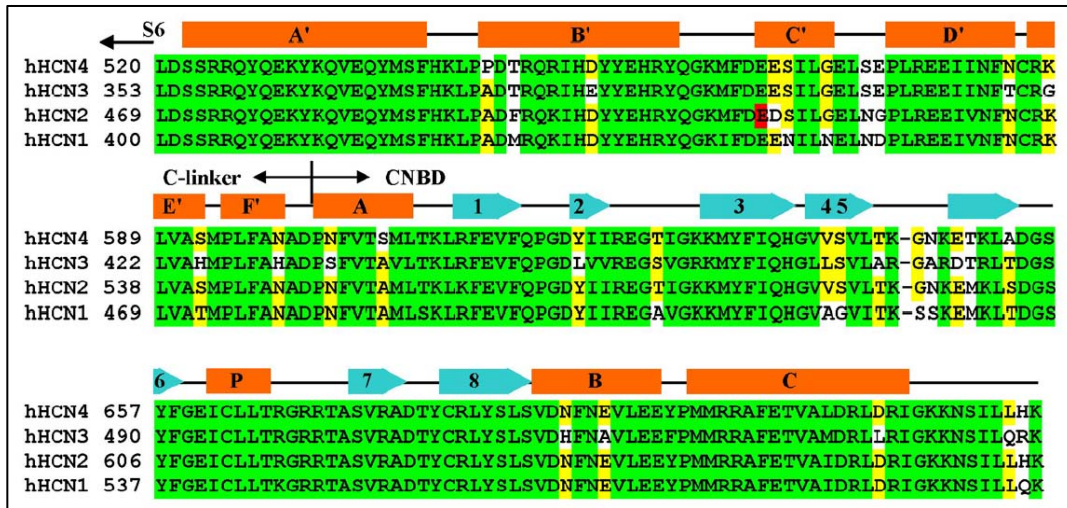
La tecnica cromatografica DHPLC sfrutta la differente velocità di eluizione di frammenti di DNA eteroduplex rispetto a frammenti omoduplex ([figura 18B](#)). Per la sua elevata sensibilità ed automaticità, questa tecnica è stata maggiormente utilizzata nel nostro studio.

Nell'analisi dei geni hHcn1 e hHcn2 abbiamo deciso di porre la nostra attenzione su polimorfismi o mutazioni osservati nelle regioni codificanti, tralasciando le variazioni delle regioni introniche ad eccezione delle zone in prossimità dell'esone (circa -20 bp/+20 bp dall'esone), interessanti per eventuali siti di *splicing* alternativi.

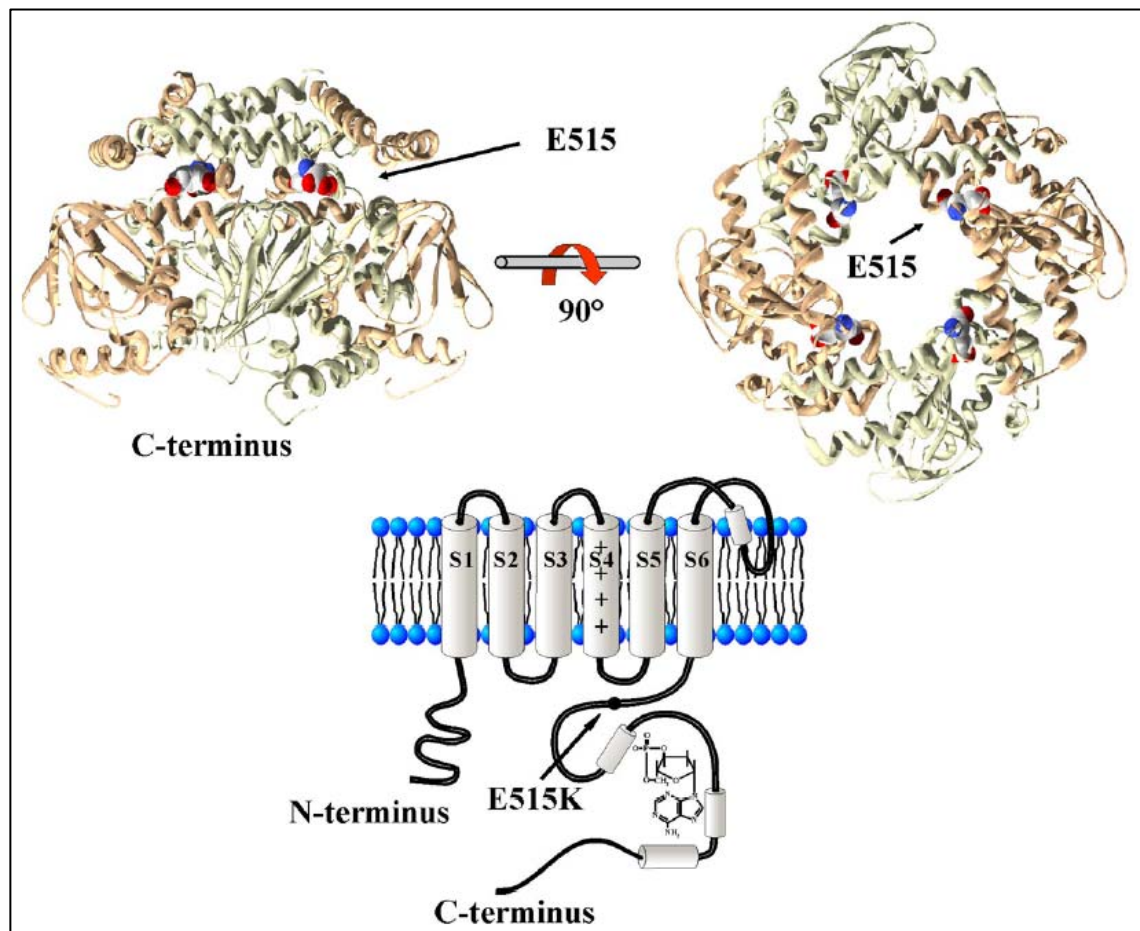
In totale sono stati identificati 17 polimorfismi (*Single Nucleotide Polymorphisms* [SNPs] o delezioni) già segnalati nella banca dati del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)) o presenti in letteratura ([tabella 9](#)), eccetto una mutazione, la E515K (mappata sull'esone 5 del gene hHcn2, posizione 1543G>A del cDNA, codone GAG in AAG). Questa mutazione missenso porta alla sostituzione aminoacidica, in posizione 515, di un acido glutammico (E) (aminoacido acido) in una lisina (K) (aminoacido basico). E515 si trova all'interno del C-linker, importante regione che collega l'ultimo dominio transmembrana (S6) al CNBD ([figura 20](#), in basso).

gene	posizione	cambio nucleotidico	eventuale cambio aminoacidico	frequenza allelica (%) (n=226)	presenza nel dbSNP o in letteratura
<b>Hcn1</b>	Exon 1	124 C>T	P42S	0.44	rs56164833
		187_195 del	G63-65del	0.88	rs56064803
		193_201 del	G65-67del	0.88	rs55852304
	Exon 8	1797 A>G	S599S	0.44	rs148932124
<b>Hcn2</b>	Exon 2	714 T>C	D238D	3.98	rs56342526
		723 T>C	T241T	3.98	rs56131056
		858 T>C	Y286Y	0.44	rs55659726
		915 C>T	F305F	0.44	rs56170955
		963 C>T	R321R	0.88	rs55780677
		1089 G>A	A363A	1.33	rs55839339
	Exon 3	1167 T>C	P389P	5.75	rs12981860
		1185 G>A	P395P	1.33	rs139997813
	Exon 4	1239 G>C	L413L	4.87	rs3752158
		1452 G>A	E484E	0.44	rs34397648
	Exon 5	<b>1543 G&gt;A</b>	<b>E515K</b>	<b>0.88</b>	-
	Exon 6	1644 C>T	A548A	0.44	rs2301778
	Exon 7	1872 T>C	A624A	2.21	rs1054786

**Tabella 9.** Elenco degli SNPs trovati nei pazienti epilettici con rispettivi cambi aminoacidici sinonimi o missenso, e frequenze alleliche. Tutti gli SNPs identificati (tranne 154 3G>A, in grassetto) sono stati precedentemente segnalati nel database dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

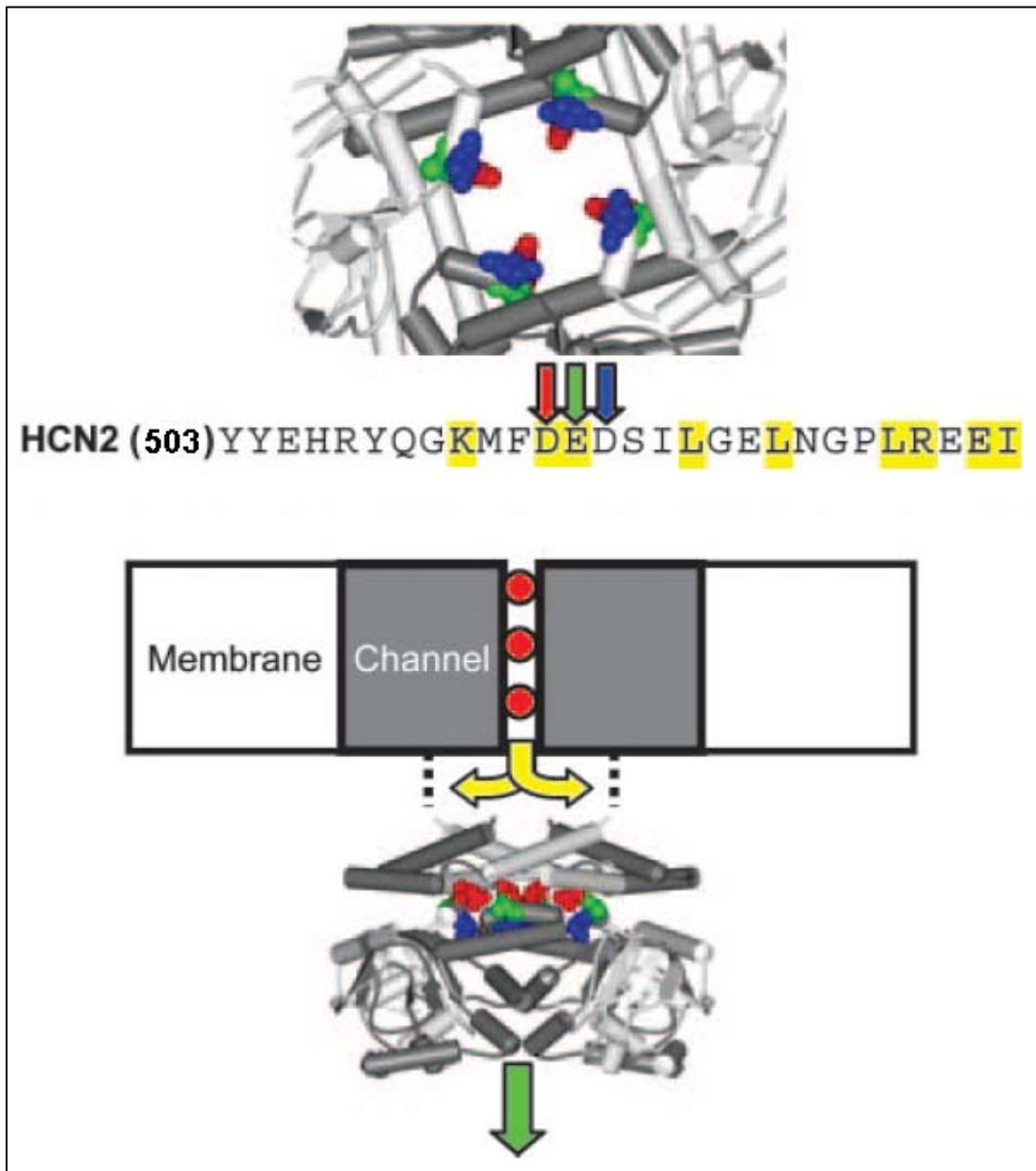


**Figura 19.** Topologia e allineamento della sequenza C-terminale delle quattro isoforme del canale HCN umano. La regione C-linker e il dominio per il AMPc (*Cyclic Nucleotide Binding Domain*, CNBD). A'-F' e A-C sono  $\alpha$ -eliche (P è il poro), 1-8 sono  $\beta$ -sheets (Zagotta et al., 2003). In rosso è evidenziato l'acido glutammico in posizione 515: è conservato in tutte le isoforme e fa parte dell'elica C'.



**Figura 20.** In alto: rappresentazione 3D della sequenza proteica al C-terminale in conformazione tetramERICA (proteina hHCN2), vista perpendicolarmente (sinistra) e parallelamente (destra) rispetto ai quattro assi (Zagotta et al., 2003). Le strutture sferiche rappresentano i residui E515. In basso: schema di una subunità hHCN2 che mostra la posizione approssimativa del residuo E515 nel C-linker.

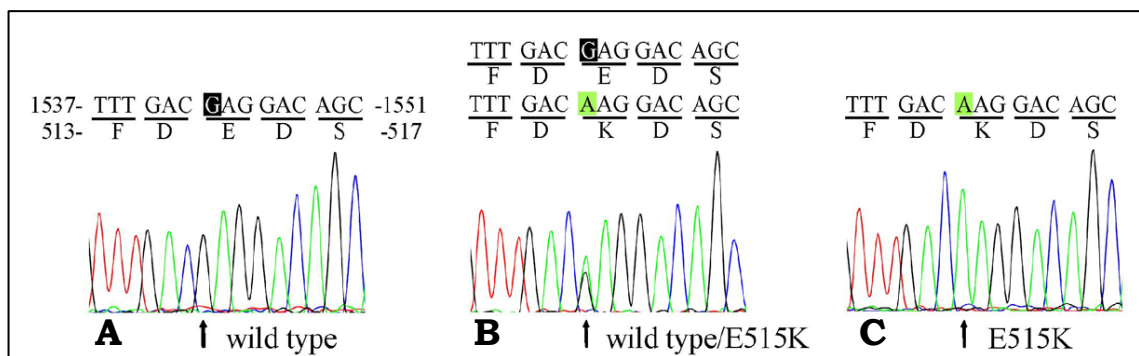




**Figura 21. In alto:** Struttura cristallina della regione carbossi-terminale del canale HCN2, con un ingrandimento dell'anello di residui carichi (D514 in rosso, E515 in verde e il D516 in blu) e la sequenza corrispondente. In basso: percorso di permeazione degli ioni che potrebbe uscire dal canale prima (freccie gialle) o dopo (freccia verde) l'anello di cariche (Johnson e Zagotta, 2005).

Il residuo E515 è altamente conservato all'interno della famiglia dei canali hHCN ([figura 19](#)), suggerendo una netta rilevanza funzionale. Infatti, alcuni dati pubblicati indicano che, in questa regione, i residui aminoacidici dotati di carica sono coinvolti nel controllo del meccanismo di *gating* del canale HCN2 (Decher et al., 2004). In particolare, E515 fa parte di un anello di residui contigui a carica negativa (D514, E515 e D516 in hHCN2) che rivestono e delimitano l'estremità citoplasmatica

del canale ([figura 20](#), in alto, e [figura 21](#)), potendo in tal modo modularne il *gating* (Johnson e Zagotta, 2005). Nell'isoforma HCN4, inoltre, sono note mutazioni al C-terminale che ne modificano la funzionalità, causando aritmie (Schulze-Bahr et al., 2003; Ueda et al., 2004; Milanesi et al., 2006).



**Figura 22.** Elettroferogrammi delle sequenze che identificano: **C.** la sostituzione nucleotidica in omozigosi di una guanina (G) in una adenina (A) (freccia) in posizione 1543 (cDNA del gene hHcn2) presente nel paziente epilettico IV-5 di [fig. 10](#), con conseguente sostituzione in posizione 515 (sequenza proteica) dell'acido glutammico (E) con la lisina (K); **B.** la stessa sostituzione in eterozigosi è presente nella sorella (IV-6), nei genitori (III-4, III-5) e nei nonni (II-3, II-4) del probando. **A.** la sequenza *wild-type*.

Come accennato in precedenza, la mutazione E515K del gene hHcn2 è stata riscontrata in omozigosi in un paziente con epilessia idiopatica generalizzata sporadica ([figura 17](#), individuo IV-5, e [figura 22](#)).

Il probando soffre di una grave forma di epilessia caratterizzata da crisi di assenza e crisi tonico-cloniche. La comparsa delle prime manifestazioni della malattia si è avuta all'età di 12 anni, senza convulsioni febbrili durante l'infanzia. Nelle immagini di risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) l'encefalo è apparso entro limiti standard, mentre l'analisi elettroencefalografica (*Electroencephalography*, EEG) ha rivelato la presenza generalizzata di complessi punta-onda ([figura 23](#)). La terapia con Valproato non ha permesso di controllare i sintomi in modo soddisfacente e il paziente, all'età di 28 anni, ha iniziato un trattamento con Lamotrigina in associazione al Valproato. Questo trattamento ha diminuito in modo sostanziale la frequenza e la gravità delle crisi, ma dopo 14 mesi è stato

interrotto per la persistenza di lieve sintomatologia epilettica e la comparsa di effetti collaterali (contrazioni miocloniche). Anche la terapia con Topiramato è risultata inefficace. Il paziente è attualmente trattato con Levetiracetam.



**Figura 23.** Registrazione EEG (ampiezza: 100  $\mu\text{V}/\text{cm}$ ) che mostra la presenza di complessi punta-onda sincroni e generalizzati, con prevalenza sulle derivazioni anteriori (FP1-F7 e FP2-F8).

Per lo studio familiare della mutazione E515K, abbiamo successivamente esteso l'analisi genetica ad alcuni membri della famiglia del probando.

Nel caso dei parenti deceduti, l'analisi genetica identificativa (AmpF1STR Profiler and AmpF1STR MiniFiler) eseguita sul DNA estratto da campioni biologici 'difficili' ha permesso di escludere qualsiasi

---

contaminazione da DNA esogeno umano. I profili identificativi ottenuti dai campioni 'difficili' sono risultati leggibili, interpretabili e paragonabili ai profili ottenuti dal probando o dai familiari direttamente correlati. In figura 24, il profilo del DNA ottenuto dal calcolo renale (individuo II-4 di [figura 17](#), padre del probando) è perfettamente comparabile col profilo del figlio (individuo IV-5 di [figura 17](#), probando) e con quello della moglie (individuo III-5 di [figura 17](#), madre del probando). L'analisi conferma il legame di parentela tra questi individui, e quindi la bontà dell'estratto.

Lo *screening* del gene *hHcn2* nei famigliari ha permesso di individuare alcuni casi in cui la mutazione E515K è presente in eterozigosi ma mai associata ad un fenotipo epilettico: la mutazione è stata trovata in due nonni del probando ([figura 17](#), individui II-3 e II-4), nei genitori del probando ([figura 17](#), individui III-4 e III-5) e nella sorella del probando ([figura 17](#), individuo IV-6). Tutti gli altri famigliari sono risultati *wild-type*. Nessuno dei parenti presenta o ha presentato mai sintomi della malattia.

Anche il gruppo di controllo (350 soggetti non epilettici) è stato analizzato alla ricerca della mutazione E515K, trovando un unico caso in cui la mutazione è presente in eterozigosi.

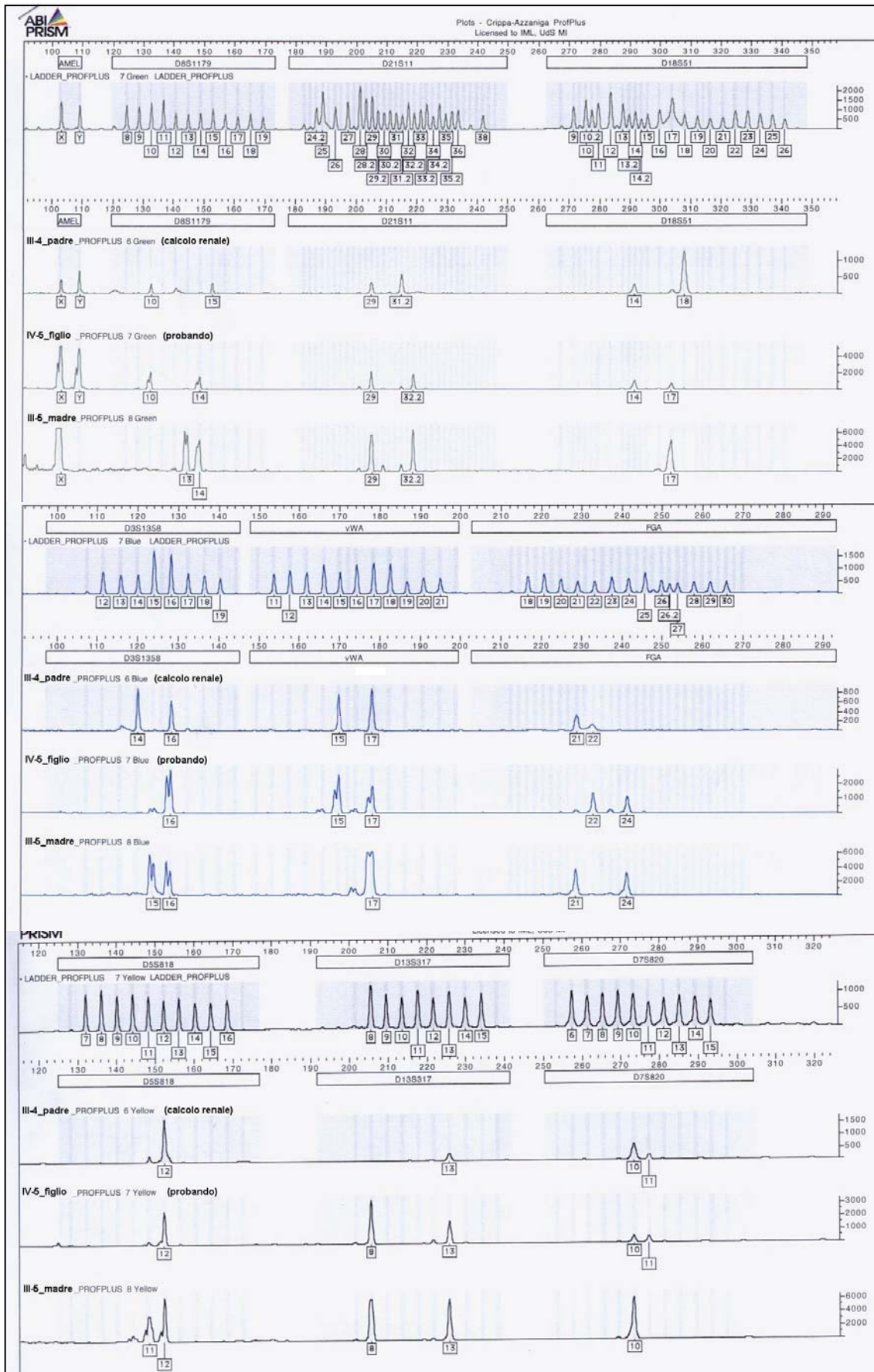


Figura 24A. Comparazione dei profili genetici (AmpF/STR Profiler, Applied Biosystems)

## Risultati di elettrofisiologia e immunofluorescenza

In primo luogo abbiamo voluto indagare **(1)** se la mutazione E515K possa modificare le proprietà biofisiche dei canali HCN2, e in secondo luogo, **(2)** se la mutazione E515K possa alterare il contributo funzionale dei canali HCN2 sull'attività neuronale.

**(1)** Per verificare se la mutazione E515K modifichi le caratteristiche biofisiche del canale, abbiamo transfettato le cellule CHO con il plasmide contenente il cDNA del gene hHcn2 *wild-type* (*wt*), o recante la mutazione E515K (E515K), oppure eguali quantità dei 2 plasmidi (co-trasfezione, *wt*/E515K) in modo da simulare le condizioni di eterozigosi. Secondo il test statistico ANOVA a una via e il test di Fisher, le efficienze di espressione dei diversi canali (*wt*, *wt*/E515K e E515K/E515K) nelle cellule CHO non sono risultate significativamente diverse. Le conduttanze dei canali a piena attivazione normalizzate (misurate a -135 mV per i canali *wt* e *wt*/E515K, e a -165 mV per i canali E515K) sono state rispettivamente di  $16,1 \pm 3,8$  pS/pF ( $n=8$ ),  $15,7 \pm 5,5$  pS/pF ( $n=7$ ) e  $11,0 \pm 3,7$  pS/pF ( $n=12$ ). Tuttavia, i canali E515K si attivano a voltaggi molto più negativi rispetto ai canali *wt* ([figura 25A](#)) a causa di uno spostamento di circa -30,6 mV della loro curva di attivazione, mentre le curve di attivazione dei canali *wt* e *wt*/E515K coincidono. I potenziali di mezza attivazione  $V_{1/2}$  e gli *inverse slope factors*, calcolati utilizzando l'equazione di Boltzmann, risultano essere:  $V_{1/2} = -71,9 \pm 2,4$  e  $s = 6,6 \pm 0,9$  mV per i canali *wt* ( $n=8$ ),  $V_{1/2} = -70,5 \pm 2,0$  e  $s = 6,3 \pm 0,3$  mV per i canali *wt*/E515K eteromerici ( $n=8$ ) e  $V_{1/2} = -102,5 \pm 1,8$  e  $s = 11,0 \pm 0,5$  mV per i canali E515K omomerici ( $n=13$ ) ([figura 25B](#)).

Va chiarito che, quando vengono coespresse subunità *wt* e subunità mutate di un canale nello stesso sistema eterologo, è logico considerare che nella cellula si formino canali *wt*/mutati eteromerici, *wt* omomerici e mutati omomerici. Tuttavia, dato che le due subunità hanno simili livelli di espressione, la distribuzione dei costrutti omomerici ed eteromerici può essere calcolata utilizzando semplici regole combinatorie: il numero totale di possibili costrutti tetramerici sarà 16

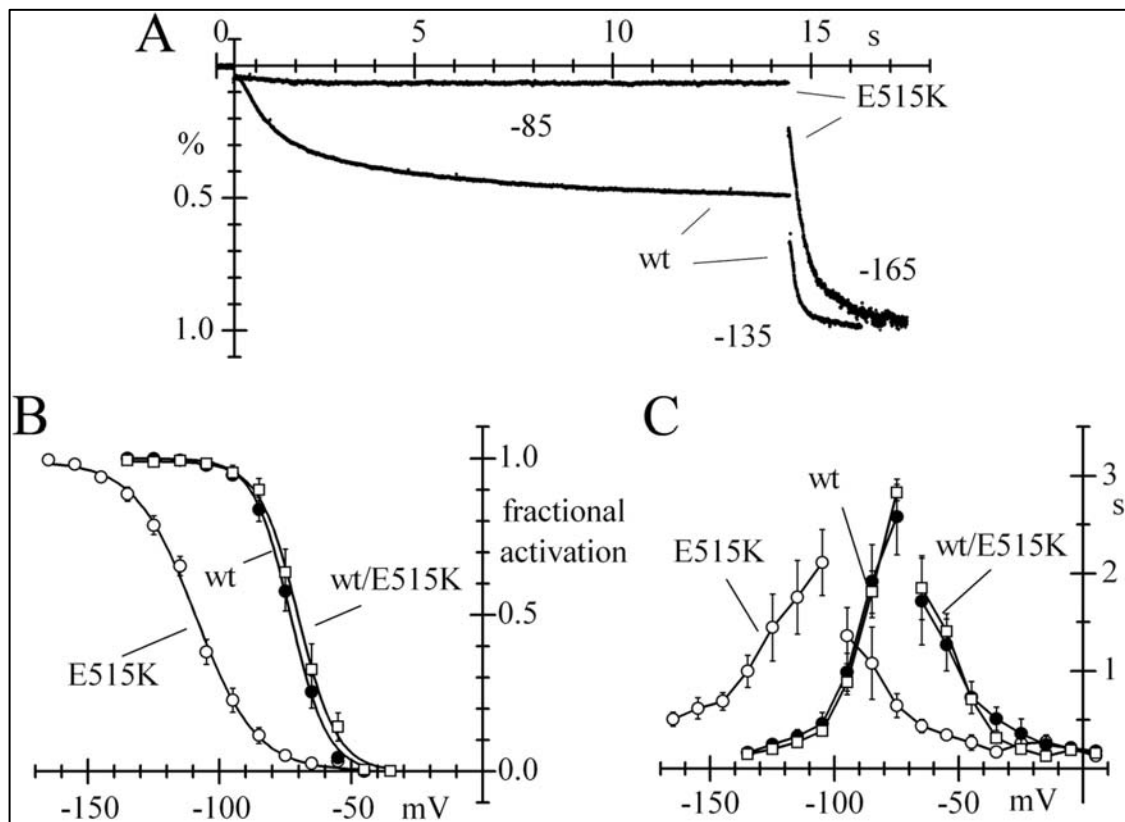
( $2^4 = 16$ ), e l'unico costruito in cui tutte le subunità sono mutate contribuirà per una minima frazione (1/16, cioè per il 6,25%) sul totale della corrente registrata. È presumibile che tale frazione contribuisca a uno *shift* della curva di attivazione dell'ordine di 1,9 mV (cioè 30.6 mV/16), un valore troppo piccolo per influire in maniera rilevabile. Questa osservazione sostiene l'ipotesi che la mutazione E515K sia funzionalmente recessiva e alteri le proprietà del canale solo nei costrutti omomerici.

È stato inoltre osservato che le curve delle costanti di tempo per i canali omomerici E515K traslano verso valori più negativi, indicando un'attivazione più lenta e una deattivazione più veloce rispetto ai canali *wt*, mentre la cinetica dei canali eteromerici *wt/E515K* rimane inalterata ([figura 25C](#)).

Per verificare che il largo *shift* osservabile in [figura 25](#) non sia dovuto alla diversa sensibilità al AMPc dei canali mutati rispetto ai canali *wild-type*, abbiamo misurato le curve di attivazione della corrente  $I_h$  in presenza di concentrazioni intracellulari saturanti di AMPc (DiFrancesco e Tortora, 1991). L'interpolazione dei dati tramite l'equazione di Boltzmann restituisce i potenziali di mezza-attivazione e gli *inverse slope factors* rispettivamente di  $V_{1/2} = -64,7 \pm 2,2$  e  $s = 8,2 \pm 0,5$  mV per i canali *wt* (n=6) e  $V_{1/2} = -102,2 \pm 2,7$  e  $s = 11,4 \pm 0,7$  mV per i canali E515K omomerici (n=4). Il AMPc sposta quindi le curve di attivazione dei due tipi di canali verso valori più positivi in modo simile (rispettivamente di 7,2 e 7,3 mV). Questo risultato gioca a favore dell'ipotesi che lo spostamento verso potenziali più negativi della curva di attivazione dei canali mutati E515K omomerici sia una proprietà costitutiva nuova indotta dalla mutazione.

Il potenziale di attivazione più negativo e l'attivazione lenta della corrente a potenziali di riposo, suggeriscono che, a valori di voltaggio fisiologici, il contributo dato dalla corrente dei canali HCN2 omomerici E515K è fortemente ridotto, se non del tutto abolito. Inoltre, poiché i canali *wt/E515K* eteromerici hanno le stesse proprietà dei canali *wt*, i

nostri dati indicano che l'espressione della mutazione E515K è recessiva in relazione alle proprietà biofisiche di HCN2.

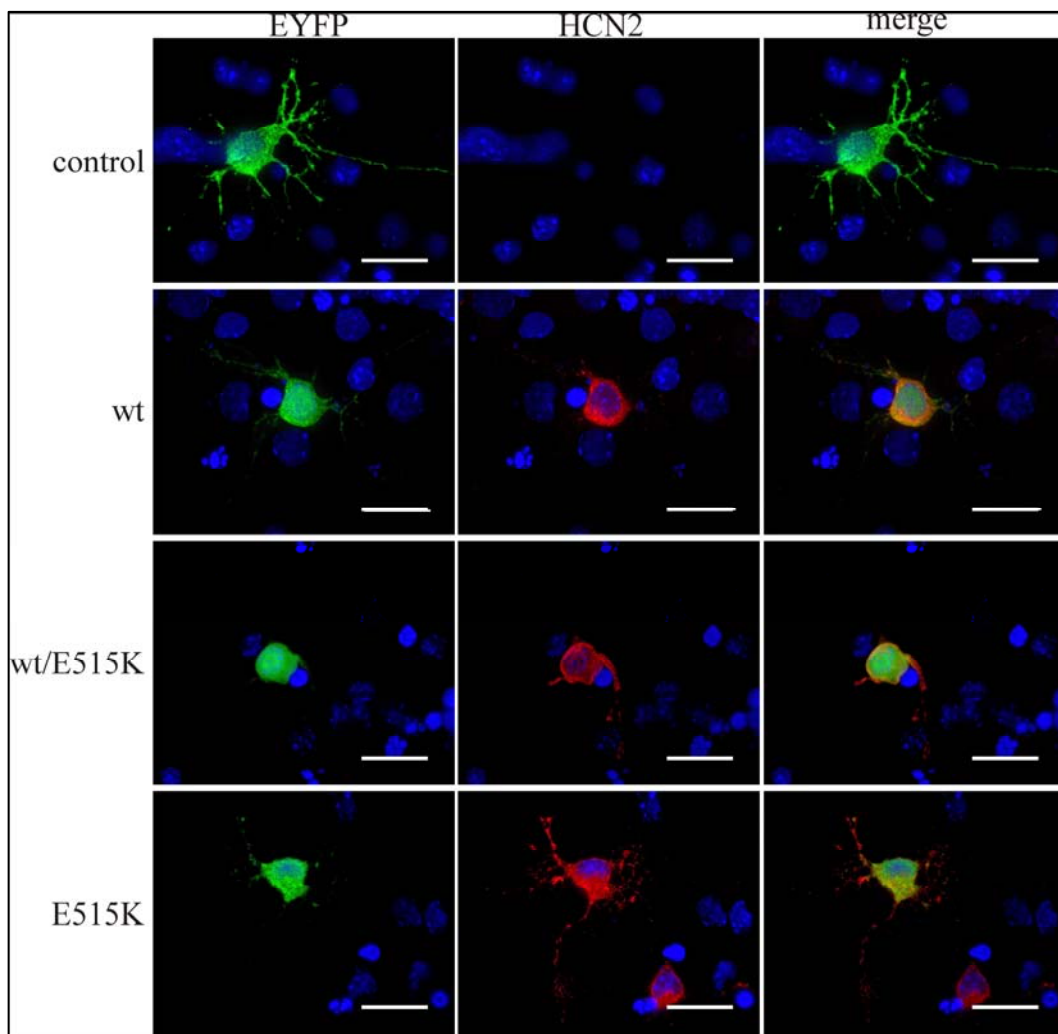


**Figura 25.** Proprietà cinetiche dei canali HCN2 *wt* e mutati E515K espressi nelle cellule CHO. **A.** Il protocollo *double-step* mostra, per i canali *wt*, grandi variazioni della corrente  $I_h$  a -85/-135 mV (partendo da un potenziale di riposo di -35 mV), mentre i canali E515K omomerici, mostrano poca o nessuna corrente a -85 mV e la piena attivazione si verifica solo a voltaggi molto negativi (-165 mV) **B.** L'interpolazione delle curve di attivazione medie della corrente  $I_h$  misurate per i canali *wt*, *wt*/E515K eteromerici e E515K omomerici mostrano un largo *shift* iperpolarizzante per i canali E515K omomerici, ma non per i canali *wt*/E515K eteromerici. **C.** Le curve delle costanti di tempo mostrano un netto spostamento verso potenziali negativi sia dell'attivazione sia della deattivazione dei canali E515K omomerici rispetto a quelle dei canali *wt* e *wt*/E515.

(2) Abbiamo poi proceduto a verificare se la mutazione E515K alteri il contributo funzionale dei canali HCN2 sull'attività e sull'eccitabilità neuronale. A questo scopo, colture primarie di neuroni corticali isolati da ratti neonati al giorno postnatale 3 (P3) sono state transfettate con il cDNA del gene *hHcn2*: una parte con il cDNA *wild-type* (*wt*), una parte con il cDNA recante la mutazione E515K omomerica e una parte con cDNA *wt* e cDNA mutato (co-trasfezione).



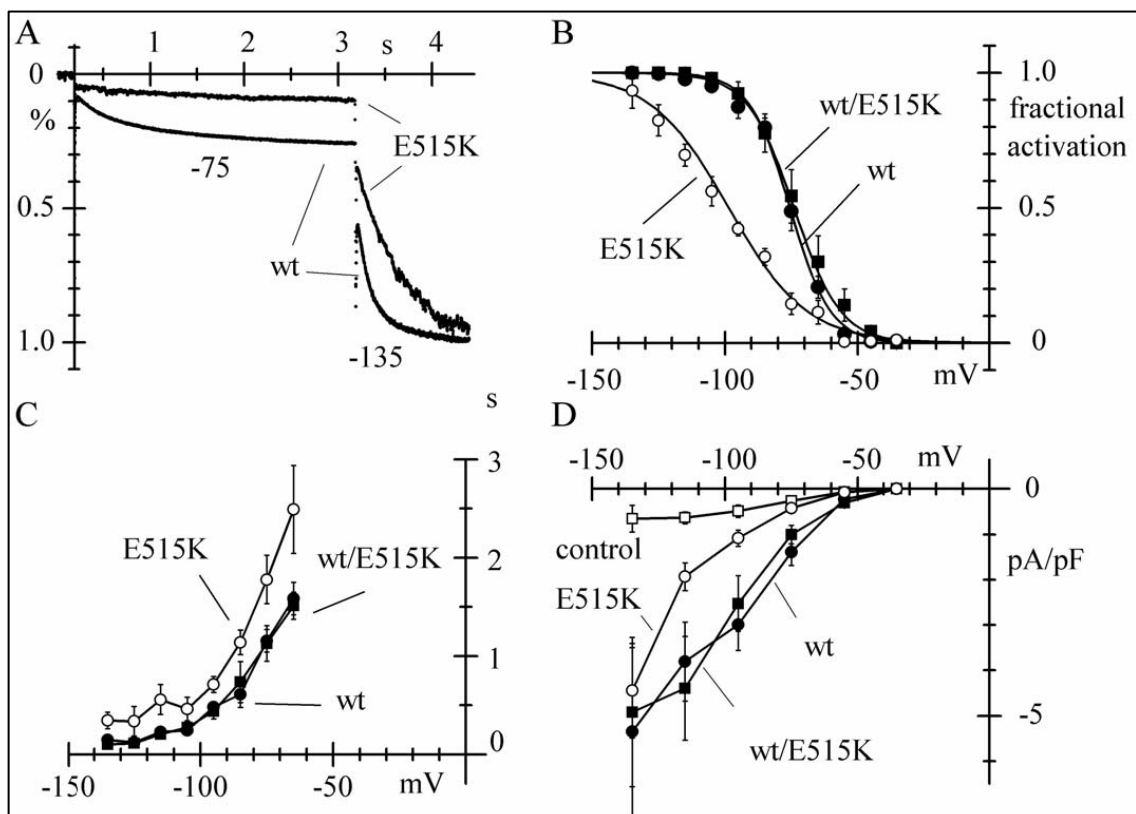
Abbiamo scelto questa tipologia cellulare perché è noto che nei primi giorni dello sviluppo (<P10) i neuroni corticali neonatali di ratto esprimono bassi livelli di corrente  $I_h$  che però aumenta drasticamente (di circa 10 volte) durante lo sviluppo da P10 a >P40, tale aumento si riscontra soprattutto nelle terminazioni dendritiche apicali a livello distale (Atkinson e Williams, 2009). I neuroni corticali neonatali possono quindi essere considerati come substrato vitale idoneo per valutare le variazioni funzionali associate con l'espressione eterologa di canali HCN.



**Figura 26.** Canali hHCN2 espressi in neuroni neonatali di ratto. Singole sezioni confocali di colture neuronali cotransfettate con il plasmide EYFP e con il plasmide pcDNA 3.1 vuoto (controllo) o con il plasmide pcDNA 3.1 contenente il cDNA del gene hHcn2 come indicato in figura. Tutte le cellule esprimono la proteina EYFP (in verde). Il segnale dovuto alla presenza del canale HCN2 (in rosso) è stato rilevato in tutte le cellule transfettate con il plasmide pcDNA 3.1 contenente hHcn2, ma non nelle cellule di controllo, suggerendo che il segnale proveniente dai canali HCN2 endogeni era sotto il livello di rilevamento. I nuclei di contrasto con DAPI (blu). Scala: 20  $\mu$ m.

Utilizzando tecniche di immunofluorescenza con anticorpi anti-HCN2 in esperimenti di microscopia confocale, abbiamo verificato che i canali *wt*, mutanti eteromerici e mutati omomerici venivano tutti ugualmente espressi ed erano rilevabili nei neuroni trasfettati, mentre il segnale di HCN2 in neuroni di controllo (trasfettati con plasmide vuoto) risultava sotto il livello di rilevamento (figura 26).

I cambiamenti nelle proprietà cinetiche dei canali HCN2, indotti dalla mutazione E515K, osservati nei neuroni neocorticali, sono risultati simili a quelli osservati nelle cellule CHO.



**Figura 27.** Proprietà della corrente  $I_h$  per i canali hHCN2 wt e mutati E515K espressi in neuroni neocorticali neonatali di ratto. **A.** Traccia di corrente normalizzata registrata con un protocollo *double-step* a -75/-135 mV da un potenziale di riposo di -35 mV; i canali mutati si attivano a voltaggi più negativi rispetto ai canali *wt*. **B.** Grafici delle curve di mezza attivazione della corrente  $I_h$  per i canali *wt*, *wt*/E515K e E515K: è evidente un netto spostamento verso potenziali negativi della curva E515K. **C.** Curve delle costanti di tempo di attivazione per i canali *wt* (n=12), *wt*/E515K (n=7) e E515K (n=11), che mostrano uno spostamento a potenziali più negativi di questi ultimi. **D.** Grafico della densità di corrente registrata in cellule trasfettate con il plasmide vuoto (control, n=11), con il canale HCN2 *wt* (n=14), con il canale HCN2 *wt*/E515K eteromerico (n = 9), e con il canale HCN2 E515K omomerico (n = 18).

In [figura 27A](#), sono rappresentate le tracce di corrente registrate durante protocolli double-step (-75/-135 mV): mentre il primo gradino attiva una frazione sostanziale di corrente nei canali HCN2 *wt* ed eteromerici *wt*/E515K, per attivare i canali omomerici E515K sono necessari potenziali più negativi.

Ciò si evince anche dallo spostamento verso potenziali più negativi della curva di attivazione per il canale mutato omomeroico: rispetto alla curva di attivazione dei canali *wt* ( $V_{1/2} = -74,0 \pm 3.1$  mV,  $s = 8.7 \pm 0.7$  mV,  $n=6$ ), quella dei canali omomerici E515K ( $V_{1/2} = -98,6 \pm 2.6$  mV,  $s = 14.7 \pm 1.1$  mV,  $n=4$ ) è risultata spostata di -24,6 mV, mentre quella dei canali eteromerici *wt*/E515K è rimasta sostanzialmente immutata ( $V_{1/2} = -75.5 \pm 1.1$  mV,  $s = 7.6 \pm 1.1$  mV,  $n=4$ ) ([figura 27B](#)).

Uno spostamento verso potenziali negativi di circa 10-15 mV, con tempi di attivazione conseguentemente più lenti, è stato osservato anche nella curva delle costanti di tempo di attivazione dei canali E515K rispetto a quelle osservate per i canali *wt* e *wt*/E515K ([figura 27C](#)).

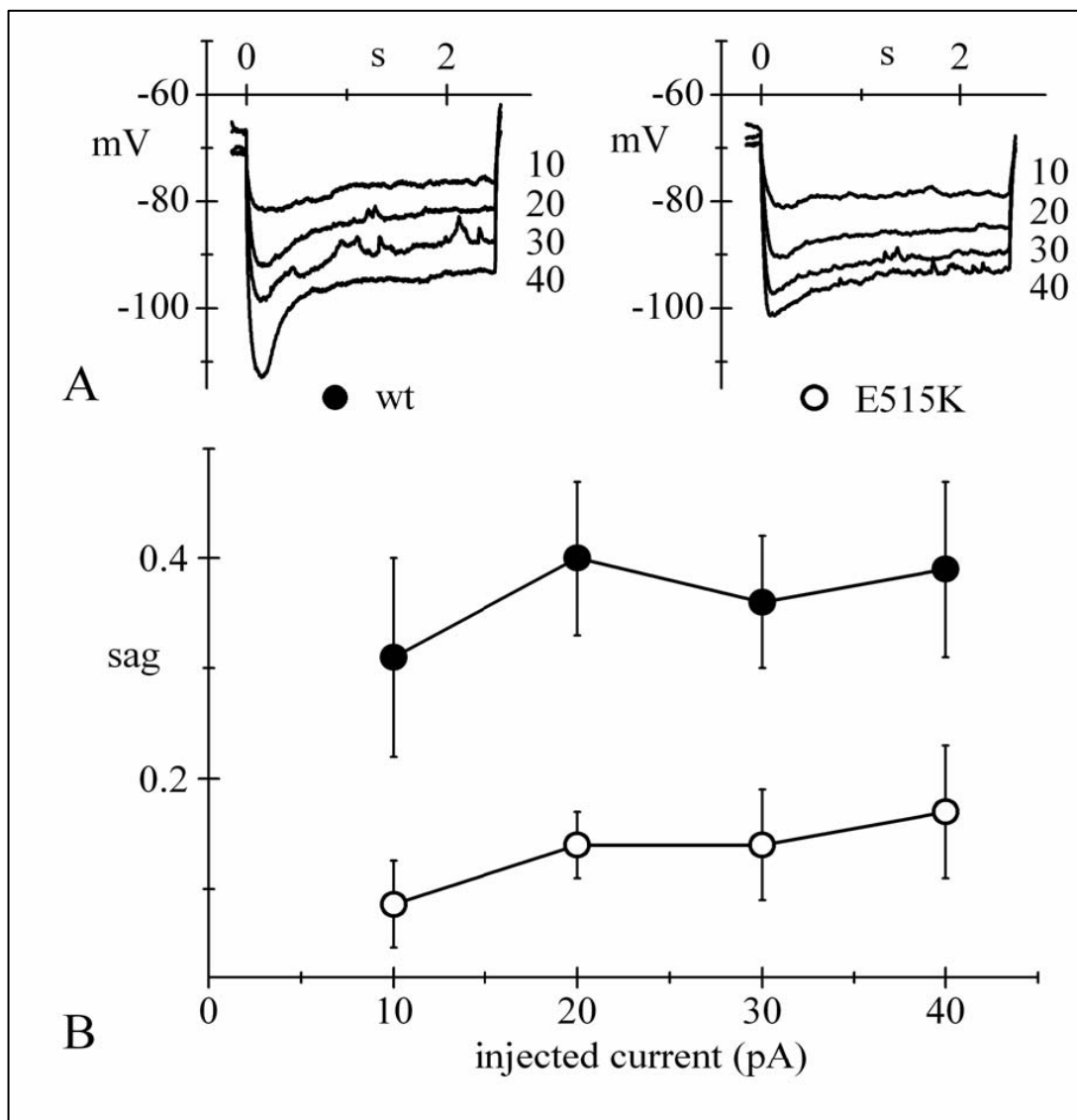
Il netto spostamento della curva di attivazione del canale mutato omomeroico E515K si riflette anche nel grafico della densità di corrente (ottenuto dalla media delle registrazioni effettuate durante *steps* di *voltage-clamp* di durata fissa (3 s) e dopo normalizzazione sulla capacità della cellula). Come mostrato in [figura 27D](#), partendo da un potenziale di riposo di -35 mV, a potenziali fisiologici (-55/-75 mV) la densità media di corrente per i canali E515K è risultata paragonabile a quella registrata nei neuroni transfettati con il plasmide vuoto (corrispondente quindi alla corrente  $I_h$  endogena presente nei neuroni), per contro, a potenziali molto negativi (-135 mV) la densità converge verso le tracce dei canali *wt* e *wt*/E515K, in linea con la piena attivazione a tale voltaggio. Si noti che la densità di corrente dei canali *wt* e dei canali eteromerici sono risultate sovrapponibili lungo tutto l'intervallo. A -135 mV, le densità di corrente calcolate sono state  $-0,6 \pm 0,3$  pA (per i neuroni di controllo,  $n=6$ ),  $-5,4 \pm 1,9$  pA (per i neuroni HCN2 *wt*,  $n=6$ ), -

4,9 ±1,6 pA (per i neuroni HCN2 *wt*/E515K, n=6) e -4,5 ±1,0 pA (per i neuroni HCN2 E515K, n=10); gli ultimi tre valori medi non sono significativamente differenti tra loro, ma sono significativamente differenti dalla densità di corrente espressa dai neuroni di controllo (ANOVA a una via e test di Fisher). Ciò indica che, in colture neuronali, l'efficienza di trasfezione è simile per tutti i tipi di canali e che la minore densità di corrente nelle cellule che esprimono i canali HCN2 E515K omomerici, osservata a potenziali fisiologici, è interamente attribuibile allo spostamento della curva di attivazione verso potenziali più negativi. I potenziali di riposo erano significativamente più depolarizzati nei neuroni con HCN2 *wt* (-47,5 ± 1,4 mV, n=24) e HCN2 *wt*/E515K (-50,8 ± 1,5 mV, n=13) rispetto ai neuroni con HCN2 E515K (-55,3 ± 1,0 mV, n=27) o ai neuroni di controllo (-55,8 ± 1,9 mV, n=12) (ANOVA a una via e test di Fisher); questi risultati sono in accordo con contributo fornito dai canali HCN2 *wt* e HCN2 *wt*/E515K eteromerici, ma non dai canali E515K omomerici, al potenziale di riposo di queste cellule.

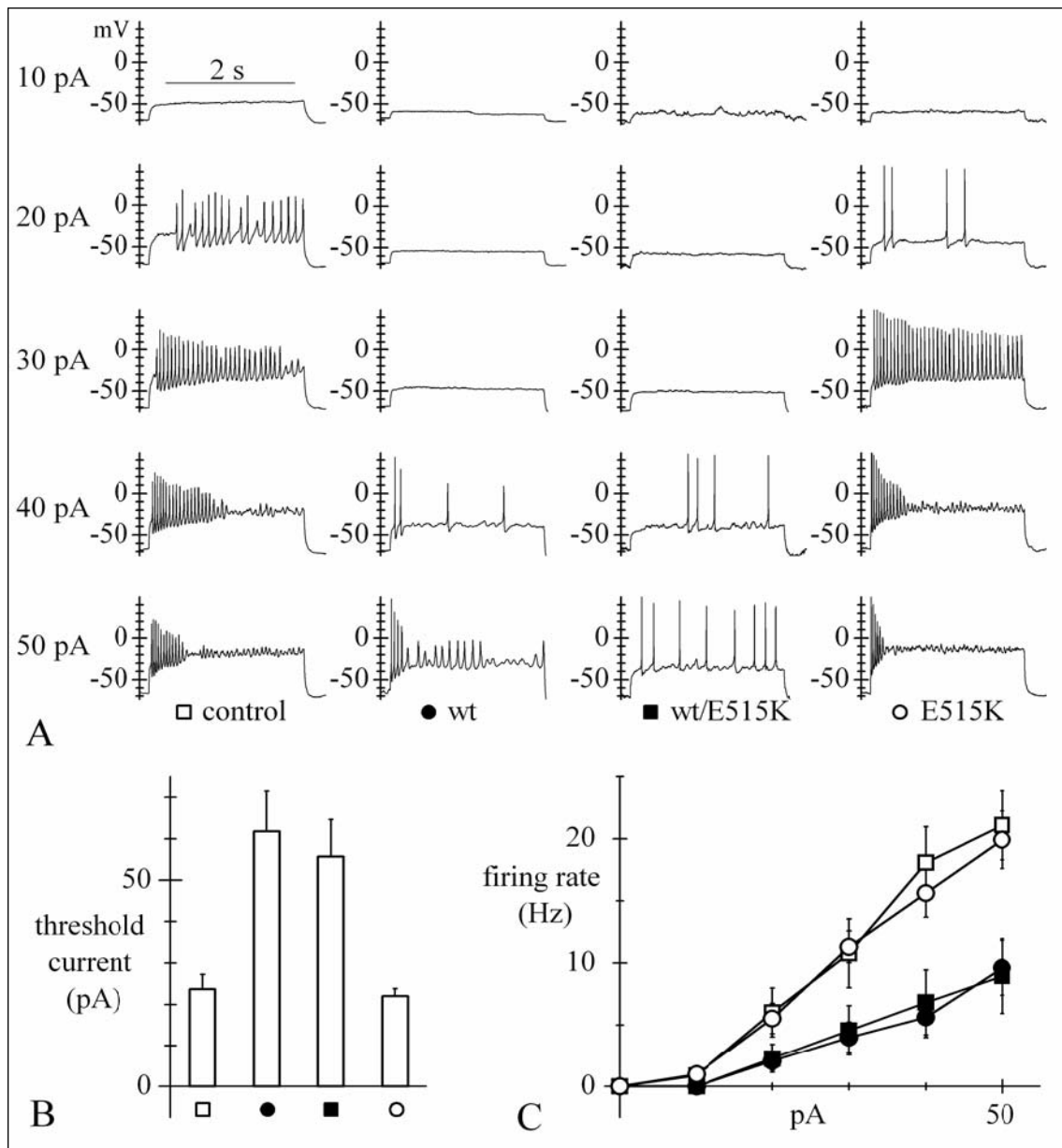
Ulteriori effetti dell'espressione dei canali *wt* o E515K sulle proprietà dei neuroni sono mostrati in [figura 28](#) e [29](#). In [figura 28A](#), l'iniezione di pulsii di corrente iperpolarizzante (da 10 a 40 pA) della durata di 2 s inducono lo sviluppo di una depolarizzazione del potenziale di membrana (*sag*) nei neuroni esprimenti il canale hHCN2 *wt* ma non in quelli esprimenti il canale E515K ([figura 28A](#)). Questo effetto può essere attribuibile all'azione rettificante alla corrente  $I_h$  come precedentemente dimostrato (Maccaferri et al., 1993). L'ampiezza media del *sag* (normalizzata per il valore del picco in iperpolarizzazione) è risultata significativamente maggiore nei neuroni *wt* rispetto ai neuroni E515K per tutte i pulsii di corrente applicata ([figura 28B](#)). Questi dati forniscono ulteriore sostegno alla tesi che la mutazione E515K riduce il contributo delle correnti  $I_h$  sull'attività neuronale.

Per studiare se la mutazione E515K influenzi l'eccitabilità neuronale, abbiamo fornito pulsii di corrente depolarizzante di ampiezza variabile (da 10 a 50 pA) ai neuroni di controllo, ai neuroni *wt*, ai neuroni

*wt*/E515K e ai neuroni E515K (figura 29). Come risulta dalle tracce in figura 29A, nei neuroni esprimenti canali HCN2 *wt* e HCN2 *wt*/E515K eteromerici, è possibile notare una forte riduzione dell'attività rispetto ai neuroni di controllo. Questo è dovuto sia ad un ridotto *firing* sia ad un aumento dell'ampiezza di corrente necessaria per indurre il firing stesso. I neuroni esprimenti canali HCN2 E515K omomerici mostrano invece un comportamento simile ai neuroni di controllo.



**Figura 28.** Effetto della mutazione E515K sul *sag* depolarizzante. **A.** Tracce di potenziale registrate durante l'iniezione di pulsii di corrente iperpolarizzante, da 10 a 40 pA (ciascuno della durata di 2,5 s), in cellule trasfettate con canali HCN2 *wt* (a sinistra) o HCN2 E515K omomerici (a destra). **B.** L'ampiezza media del *sag*, normalizzata per il valore del picco in iperpolarizzazione per neuroni *wt*- (n=4) e E515K (n=4). I valori sono risultati significativamente differenti a tutti i livelli di corrente fornita ( $P < 0,05$ ). Tutte le misurazioni sono state fatte mantenendo il potenziale di riposo a -70 mV.



**Figura 29.** Effetto della mutazione E515K sull'eccitabilità neuronale. **A.** Tracce di potenziale registrate durante l'iniezione di pulsii di corrente depolarizzante, da 10 a 50 pA (ciascuno della durata di 2,5 s), in cellule di controllo (senza canali HCN2 esogeni) e in cellule trasfettate con canali HCN2 *wt* o HCN2 *wt*/E515K eteromerici o HCN2 E515K omomerici. Tutte le misurazioni sono state effettuate mantenendo i potenziali di riposo a -70 mV. **B.** Soglia media di corrente necessaria per innescare il *firing*: 23,6 ± 3,6 pA (n=11), 61,8 ± 9,7 pA (n=22), 55,7 ± 9,0 pA (n=14), e 22,0 ± 1,9 pA (n=20) rispettivamente per i neuroni di controllo, HCN2 *wt*, HCN2 *wt*/E515K eteromerici, e HCN2 E515K omomerici. Secondo il test statistico ANOVA a una via, i neuroni HCN2 *wt* vs *wt*/E515K, come anche i neuroni di controllo vs HCN2 E515K, non erano significativamente diversi tra loro, mentre entrambi i primi due erano significativamente diversi da entrambi gli ultimi. **C.** Frequenza media di *firing* nei diversi tipi cellulari registrata ai 4 steps di corrente: neuroni esprimenti HCN2 *wt* (n=19) e *wt*/E515K (n=14) risultano chiaramente meno eccitabili rispetto ai neuroni di controllo (n=11) e a quelli esprimenti HCN2 E515K (n=20).

La quantità media di corrente necessaria per innescare il firing è da 2 a 3 volte più elevata nei neuroni *wt* e *wt/E515K* rispetto ai neuroni di controllo, mentre nei neuroni E515K è risultata simile a quella dei neuroni di controllo ([figura 29B](#)). Il grafico della frequenza media di *firing* rispetto alla corrente fornita ([figura 29C](#)) ha mostrato che, mentre i neuroni E515K erano sensibili alle iniezioni di corrente come i neuroni di controllo, i neuroni *wt* e *wt/E515K* erano sostanzialmente meno eccitabili su tutto il range di correnti fornito (una diversità significativa è risultata nel range da 20 a 50 pA,  $P < 0,05$ ).

Questi risultati dimostrano come la ridotta funzionalità dei canali HCN2, come quella conseguente alla mutazione E515K, sia associata ad una maggiore eccitabilità.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

L'epilessia è una patologia neurologica caratterizzata dalla comparsa più o meno ricorrente di alterazioni delle funzioni cerebrali definite come crisi epilettiche. Nei paesi industrializzati l'incidenza dell'epilessia è compresa tra 24 e 53 casi su 100'000 persone. Si calcola che in Europa l'epilessia interessi circa 6 milioni di persone e in Italia 400-500'000 individui. Nel nostro paese l'epilessia è stata riconosciuta "malattia sociale" nel 1965 (D.M. del 05/11/1965 n°249 ai sensi del D.P.R. 11/02/1961).

Studi condotti negli ultimi anni mostrano un coinvolgimento dei canali ionici, espressi a livello della membrana neuronale, nella patogenesi di alcune forme di epilessia idiopatica. A livello del SNC, oltre ai canali ionici del Na<sup>+</sup>, del Ca<sup>++</sup>, del K<sup>+</sup> per i quali è già documentata un'associazione con alcuni casi di epilessia (Mulley et al., 2005; Chen et al., 2003; Bassi et al., 2005), vengono espressi altri canali designati con l'acronimo HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel*), canali ionici attivati in iperpolarizzazione e regolati da nucleotidi ciclici. È logico supporre che anche alterazioni a livello dei canali HCN possano influire sulla capacità delle cellule neuronali di integrare correttamente stimoli inibitori ed eccitatori, condizione fondamentale per un normale funzionamento dei circuiti neuronali.

Le isoforme maggiormente espresse a livello del sistema nervoso sono HCN1 e HCN2.

Alla luce di quanto riportato, si è ritenuto interessante effettuare uno *screening* dei geni hHcn1 e hHcn2 in un *pool* di 113 pazienti affetti da epilessia idiopatica generalizzata o parziale, sia sporadica che familiare. Lo scopo ultimo è stato quello di individuare alterazioni nella sequenza genica e di studiarne un possibile coinvolgimento con la patologia.

In un paziente affetto da epilessia idiopatica generalizzata sporadica, l'analisi ha individuato una sostituzione a singola base in omozigosi



nell'esone 5 del gene hHcn2 (1543G>A), polimorfismo non presente in letteratura. A livello proteico, questa sostituzione porta alla mutazione missenso non conservativa E515K. La stessa mutazione, ma in eterozigosi, è stata ritrovata in 5 famigliari del probando (non epilettici) e in un individuo di controllo.

La mutazione E515K è localizzata nel C-linker, una regione compresa tra il segmento S6 transmembrana ed il sito di legame del AMPc (CNBD) e nota per contribuire al controllo delle proprietà cinetiche del canale (Decher *et al.*, 2004). E515 appartiene ad un gruppo di residui carichi negativamente (D514, E515, D516 in hHCN2) in grado di interagire attraverso ponti salini con aminoacidi appartenenti al tratto CNBD ed implicati nella modulazione del *gating* (Johnson & Zagotta, 2005). La sostituzione di un residuo carico negativo con uno positivo, come nel caso di E515K, potrebbe portare ad una ridotta interazione del C-linker con il sito di legame del AMPc andando di conseguenza ad alterare l'attivazione del canale stesso.

In accordo con queste premesse, i nostri dati dimostrano che la mutazione E515K del canale hHCN2, in omozigosi, provoca un ampio spostamento della curva di attivazione della corrente  $I_h$  verso potenziali negativi (*shift* ~30 mV, raggiungendo valori non fisiologici per le cellule neuronali), con tempi di attivazione più lunghi e con una conseguente forte riduzione della disponibilità di corrente  $I_h$  a potenziali di riposo.

È possibile quindi affermare che la mutazione E515K, in omozigosi, induce cambiamenti fisiologici rilevanti, che si traducono in una perdita della funzionalità del canale hHCN2. Inoltre, questi cambiamenti causano un notevole aumento dell'eccitabilità neuronale, condizione predisponente a epilettogenesi.

I canali HCN2 sono espressi ubiquitariamente in molte aree del cervello tra cui l'ippocampo, il talamo, il cervelletto e la corteccia cerebrale (Notomi e Shigemoto, 2004; Biel *et al.*, 2009). In particolare, HCN2 è l'isoforma maggiormente espressa nel talamo e, in questa sede,

la densità dei canali HCN è particolarmente elevata (Santoro et al., 2000; Bienne et al., 2009).

La corrente  $I_h$ , codificata dai canali HCN, è normalmente attiva a potenziali di riposo (Maccaferri et al., 1993) e può quindi contribuire efficacemente al controllo dei fenomeni di eccitabilità e plasticità neuronale (Robinson e Siegelbaum, 2003; Lewis e Chetkovich, 2011). I canali HCN influenzano l'attività elettrica ritmica dei neuroni (*firing*): la loro espressione nei dendriti rappresenta un importante fattore modulatore nell'integrazione dei segnali (Magee, 1999). Queste proprietà naturalmente implicano un loro potenziale coinvolgimento nel *network* di alterazioni patologiche tipiche dell'epilessia.

In diversi modelli in vivo e in vitro, in cui sono state indotte crisi epilettogene o crisi convulsive, si sono osservate alterazioni patologiche della corrente  $I_h$  (Shah et al., 2004; Zhang et al., 2006; Dugladze et al., 2007). Recenti studi inoltre suggeriscono che la *down*-regolazione di  $I_h$  può essere pro-epilettogena (Peng et al., 2010). In un modello di ratto con epilessia convulsiva (indotta chimicamente da trattamento con pilocarpina), si è potuta osservare una *down*-regolazione dei canali HCN presenti sulle terminazioni dendritiche dei neuroni CA1 dell'ippocampo (Jung et al., 2007): è interessante notare che la curva di attivazione della corrente  $I_h$ , registrata sui dendriti dei neuroni CA1 dell'ippocampo, dopo trattamento con pilocarpina, è risultata spostata verso potenziali più negativi rispetto a quella misurata negli animali di controllo, con un effetto simile a quello da noi osservato con i canali mutati E515K omomerici ([figura 25](#) e [27](#)). Nei neuroni piramidali CA1 dell'ippocampo, il farmaco antiepilettico Lamotrigina (LTG) provoca uno spostamento in senso depolarizzante (verso potenziali positivi) della curva di attivazione di  $I_h$ , aumentando la conduttanza (Peng et al., 2010) e la corrente  $I_h$  stessa (Poolos et al., 2002) (*up*-regolazione di  $I_h$ ). L'azione del farmaco porta alla diminuzione dell'eccitabilità sinaptica a livello dendritico (Poolos et al., 2002), a sostegno della tesi che l'azione

opposta, cioè la *down*-regolazione di  $I_h$ , sottende all'amplificazione della sommativa EPSP\* e all'ipereccitabilità.

L'ipereccitabilità neuronale conseguente alla *down*-regolazione della corrente  $I_h$  è attribuibile ad una maggiore resistenza in ingresso a livello della membrana negli alberi dendritici neuronali, dove i canali HCN sono più densamente espressi rispetto al corpo cellulare (Magee, 1999). L'azione sulla resistenza in ingresso compensa l'iperpolarizzazione della membrana associata all'inibizione della corrente  $I_h$ , un effetto che dovrebbe di per sé ridurre l'eccitabilità. È importante notare che in altri lavori sono stati osservati effetti opposti: in pazienti con convulsioni febbrili è stata rilevata una *up*-regolazione di  $I_h$  nei neuroni piramidali CA1 concomitante all'aumento dell'eccitabilità neuronale (Chen et al., 2001; Dyhrfeld-Johnsen et al., 2009).

$I_h$  sembrerebbe quindi essere proepilettogena sia se *up*-regolata, sia se *down*-regolata (Peng et al., 2010). Questa dicotomia deriverebbe dal saldo degli effetti contrastanti tra la resistenza in ingresso e il valore del potenziale di membrana a riposo, che può variare in funzione al tipo di neurone e suo stadio di sviluppo, livello di espressione dei canali ionici e loro distribuzione, modulazione dei canali stessi, e altri fattori (Dyhrfeld-Johnsen et al., 2009; Noam e Baram, 2010).

In accordo con quanto detto sopra, un recente lavoro ha dimostrato che i pazienti con *febrile seizure syndromes* (FE syndromes, sindromi da convulsioni febbrili) hanno una maggiore probabilità (2,4%) di essere portatori di una particolare delezione (delPPP 719-721, a valle del CNBD) nel gene HCN2 rispetto agli individui *wild-type* (0,2%), e che la corrente  $I_h$  dei canali recanti questa mutazione è di circa il 35% più grande rispetto a quella del canale non mutato (Dibbens et al., 2010).

È interessante inoltre notare che lo stimolo o l'inibizione del *firing* dovuti all'*up*-regolazione della corrente  $I_h$ , dipendono dall'interazione di

---

\* EPSP (Excitatory Post Synaptic Potential, cioè potenziale postsinaptico eccitatorio) e IPSP (Inhibitory Post Synaptic Potential, cioè potenziale postsinaptico inibitorio) sono i potenziali sinaptici misurati durante l'EEG.

Ih con la corrente rettificante di tipo M dei canali del K<sup>+</sup> (George et al., 2009).

Tutti questi dati forniscono chiare indicazioni dell'esistenza di un collegamento tra anomalie nella funzionalità dei canali HCN e ipereccitabilità neuronale. Manca ancora però una prova causale diretta tra alterazioni nei canali HCN e epilettogenesi nell'uomo.

In una precedente ricerca volta a determinare un collegamento tra epilessia idiopatica e disfunzioni dei canali HCN, sono stati analizzati 84 pazienti con *febrile seizure* (FS, convulsioni febbrili) familiari o sporadiche; questo studio ha rivelato l'esistenza di diverse varianti dei canali HCN1 e HCN2, tra cui la mutazione R527Q nel canale HCN2 (mappata nel tratto C-linker a monte del CNBD) (Tang et al., 2008). Tuttavia, anche in questo caso, non è stato identificato il meccanismo con il quale questa mutazione alteri la funzionalità del canale e quindi il suo contributo all'attività neuronale: in contrasto con i nostri risultati sulla mutazione E515K, la mutazione R527Q non modifica la posizione della curva di attivazione del canale. La mancanza di effetti funzionali della mutazione R527Q sulla funzionalità del canale HCN2 è sorprendente, considerato che sia R527Q sia E515K mappano nella stessa regione C-linker ed entrambe portano a una alterazione nella carica nel residuo mutato: per R527Q non si ha però un'inversione di carica come per E515K, ma una perdita di carica, passando dall'aminoacido arginina (R) avente carica positiva, all'aminoacido neutro glutammina (Q). Questo suggerisce che l'inversione di carica elettrica nella mutazione E515K potrebbe avere effettivamente un ruolo sulla cinetica del canale HCN2 (Craven e Zagotta, 2004; Decher et al., 2004; Tang et al., 2008).

Per i canali HCN2 mutati omomerici E515K, i nostri risultati hanno mostrato il netto spostamento verso potenziali negativi della curva di attivazione del canale, accompagnato da una più lenta attivazione; questi cambiamenti nella funzionalità del canale in sostanza ne annullano il contributo all'attività cellulare. A questo proposito è interessante confrontare i nostri dati con quelli ottenuti da modelli

murini *knock-out* per il gene *Hcn2*. Topi deficitari di HCN2 presentano spontanee crisi epilettiche di assenza (*absence epilepsy seizure*) (Ludwig et al., 2003). L'analisi in vitro ha dimostrato che i neuroni talamo-corticali dei topi, quando stimolati con pulsali di corrente, mostrano frequenze di *firing* maggiori rispetto a quelle tipiche dei neuroni *wild-type*, compatibile con la maggiore suscettibilità alle oscillazioni sincronizzate della regione talamo-corticale e la generazione di scariche punta-onda tipiche delle crisi di assenza (Ludwig et al., 2003). È anche interessante il confronto con alcuni nostri risultati ottenuti da topi recanti una mutazione spontanea nel gene *Hcn2* (topi apatetici): la mutazione porta alla formazione di una proteina canale tronca a livello della regione CNBD (mutazione *ap*) con conseguente mancata espressione in membrana del canale HCN2 (Chung et al., 2009). Topi omozigoti per la mutazione mostrano atassia, crisi di assenza e rare crisi tonico-cloniche, mentre topi eterozigoti non mostrano sintomatologie evidenti, anche se l'analisi EEG ha rilevato occasionali crisi di assenza nel 20% dei topi osservati.

Per concludere, in questo lavoro si descrive per la prima volta la sostituzione a singola base 1543G>A nel gene *hHcn2* (corrispondente alla mutazione missenso non conservativa E515K nel canale *hHCN2*). La mutazione E515K in omozigosi è stata riscontrata in un paziente con epilessia generalizzata idiopatica sporadica. I nostri risultati hanno dimostrato che la mutazione omomera E515K sia di tipo *loss-of-function* e porti quindi alla perdita di funzione del canale HCN2; questo può essere funzionalmente correlato con la patologia ed è compatibile con l'ereditarietà di tipo recessivo riscontrata nella famiglia del probando: l'osservazione che la mutazione in eterozigosi non alteri le proprietà del canale HCN2 è in accordo con l'assenza di un fenotipo epilettico in tutti gli individui eterozigoti per tale mutazione.

Dal momento che la mutazione E515K è stata identificata in un solo paziente, non è stato possibile verificare la co-segregazione con la malattia; tuttavia, l'ampliamento dello screening anche ai 17 membri della famiglia ha dimostrato che il probando era l'unico individuo

epilettico e omozigote per la mutazione. È noto che nelle epilessie con esordio precoce e degenerazione progressiva, sia comune una trasmissione di tipo autosomico recessivo, come nel caso del probando, mentre le epilessie idiopatiche monogeniche con ereditarietà autosomica dominante hanno solitamente un decorso più benigno (Steinlein, 2004). In accordo con l'ereditarietà autosomica recessiva, l'analisi funzionale della variante 1543G>A, espressa sia in cellule CHO sia in neuroni neocorticali di ratto P3, ha dimostrato l'assenza del contributo della corrente  $I_h$  all'attività neuronale nei mutanti omomerici E515K, ma non nei mutanti eteromerici o nei neuroni *wild-type*. Allo stesso tempo, nei mutanti omomerici, ma non nei mutanti eteromerici o nelle cellule *wild-type*, è stato osservato un forte aumento dell'eccitabilità neuronale.

E515K può quindi rappresentare un caso specifico di un più ampio meccanismo che pone in correlazione modificazioni *loss-of-function* dei canali HCN ed epilessia, e suggerisce prospettive di intervento terapeutico aventi come *target* i canali HCN.

---

## BIBLIOGRAFIA

Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D (2002) *From funny current to HCN channels: 20 years of excitation*. *News Physiol Sci*. 17:32-37.

Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2008) *Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition*. *Br J Pharmacol*. 153(Suppl 2):S1-209.

Alkondon M, Albuquerque EX (2004) *The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex*. *Prog Brain Res* 145:109-120.

Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001) *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I<sub>f</sub>*. *J Biol Chem*. 276(31):29233-29241.

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2003) *Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node*. *J Physiol*. 549(Pt 2):347-359.

Atkinson SE, Williams SR (2009) *Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons*. *J Neurophysiol* 102:735-751.

Avanzini G, Franceschetti S, Mantegazza M (2007) *Epileptogenic channelopathies: experimental models of human pathologies*. *Epilepsia* 48 Suppl 2:51-64.

Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D (2005) *Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current*. *Pharmacology and Therapeutics*. 107:59-79.

Bassi MT, Balottin U, Panzeri C, Piccinelli P, Castaldo P, Barrese V, Soldovieri MV, Miceli F, Colombo M, Bresolin N, Borgatti R, Tagliatela M (2005) *Functional analysis of novel KCNQ2 and KCNQ3 gene variants found in a large pedigree with benign familial neonatal convulsions (BFNC)*. *Neurogenetics*. 6(4):185-193.

Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E (2001) *First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene*. *Nat Genet*. 28(1):46-48.

Bender RA, Baram TZ (2008) *Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks*. *Prog Neurobiol* 86:129-140.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde BW, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE (2010) *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009*. *Epilepsia* 51:676-685.

Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L, Hodgson BL, Yamamoto T, Mulley JC, Zara F, Scheffer IE (2004) *Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy*, *Ann Neurol*. 55(4):550-557.



Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L, Hodgson BL, Yamamoto T, Mulley JC, Zara F, Scheffer IE (2004) *Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy*. *Ann Neurol*. 55(4):550-557.

Bertrand D (2002) *Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors and Epilepsy*. *Epilepsy Curr*. 2(6):191-193.

Bianchi MT, Song L, Zhang H, Macdonald RL (2002) *Two different mechanisms of disinhibition produced by GABAA receptor mutations linked to epilepsy in humans*. *J Neurosci*. 22(13):5321-5327.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X (2009) *Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function*. *Physiol Rev* 89:847-885.

Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) *A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy*. *Science* 279(5349):403-406.

Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, Soldovieri MV, Baschiroto C, Bresolin N, Dalla Bernardina B, Tagliatela M, Bassi MT (2004) *A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation*. *Neurology*. 63(1):57-65.

Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) *How does adrenaline accelerate the heart?* *Nature* 280:235-236.

Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M (1994) *Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with*

---

*point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. Nat Genet. 8(2):136-140.*

Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL (1997) *Mutation of the Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. Cell. 88(3):385-392.*

Catterall WA (2000) *Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. Annu Rev Cell Dev Biol. 16:521-555.*

Catterall WA, Dib-Hajj S, Meisler MH, Pietrobon D (2008) *Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. J Neurosci 28:11768-11777.*

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (International Union of Pharmacology XLVIII) (2005) *Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev. 57(4):411-425.*

Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I (2001) *Persistently modified h channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. Nat Med 7:331-337.*

Chen Y, Lu J, Pan H, Zhang Y, Wu H, Xu K, Liu X, Jiang Y, Bao X, Yao Z, Ding K, Lo WH, Qiang B, Chan P, Shen Y, Wu X (2003) *Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. Ann Neurol. 54(2):239-243.*

Chung WK, Shin M, Jaramillo TC, Leibel RL, LeDuc CA, Fischer SG, Tzilianos E, Gheith AA, Lewis AS, Chetkovich DM (2009) *Absence*

*epilepsy in apathetic, a spontaneous mutant mouse lacking the h channel subunit, HCN2. Neurobiol Dis 33:499-508.*

Craven KB, Zagotta WN (2004) *Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels. J Gen Physiol 124:663-677.*

Craven KB, Zagotta WN (2006) *CNG and HCN channels: two peas, one pod. Annu Rev Physiol. 68:375-401.*

De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, Annesi G, Gambardella A, Quattrone A, Ballabio A, Wanke E, Casari G (2000) *The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. Nat Genet. 26(3):275-276.*

Decher N, Chen J, Sanguinetti MC (2004) *Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and Clinkers. J Biol Chem 279:13859-13865.*

Dibbens LM, Reid CA, Hodgson B, Thomas EA, Phillips AM, Gazina E, Cromer BA, Clarke AL, Baram TZ, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S (2010) *Augmented currents of an HCN2 variant in patients with febrile seizure syndromes. Ann Neurol 67:542-546.*

DiFrancesco D (1993) *Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annu Rev Physiol 55:455-472.*

DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) *Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. J Physiol. 377:61-88.*

---

DiFrancesco D, Mangoni M (1994) *Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I<sub>f</sub>) by cAMP in the rabbit sino-atrial node*. J Physiol. 474(3):473-482.

DiFrancesco D, Tortora P (1991) *Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP*. Nature 351:145-147.

Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Lüders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, Wang QK (2005) *Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder*. Nat Genet. 37(7):733-738.

Dube CM, Brewster AL, Baram TZ (2009) *Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy*. Brain Dev 31:366-371.

Dugladze T, Vida I, Tort AB, Gross A, Otahal J, Heinemann U, Kopell NJ, Gloveli T (2007) *Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy*. Proc Natl Acad Sci U S A 104:17530-17535.

Dyhrfeld-Johnsen J, Morgan RJ, Soltesz I (2009) *Double Trouble? Potential for Hyperexcitability Following Both Channelopathic up- and Downregulation of I<sub>h</sub> in Epilepsy*. Front Neurosci 3:25-33.

Edman A, Theander S, Grampp W (1992) *Functional effects of a hyperpolarization-activated membrane current in the lobster stretch receptor neurone*. Acta Physiol Scand. 146(2):221-32.

George MS, Abbott LF, Siegelbaum SA (2009) *HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K<sup>(+)</sup> channels*. Nat Neurosci 12:577-584.

---

Helbig I, Matigian NA, Vadlamudi L, Lawrence KM, Bayly MA, Bain SM, Diyagama D, Scheffer IE, Mulley JC, Holloway AJ, Dibbens LM, Berkovic SF, Hayward NK (2008) *Gene expression analysis in absence epilepsy using a monozygotic twin design*. *Epilepsia* 49(9):1546-1554.

Herlenius E, Heron SE, Grinton BE, Keay D, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF (2007) *SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum*. *Epilepsia* 48(6):1138-1142.

Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, Bleasel A, Shevell M, Mercho S, Seni MH, Guiot MC, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE (2002) *Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures*. *Lancet*. 360(9336):851-852.

Heron SE, Khosravani H, Varela D, Bladen C, Williams TC, Newman MR, Scheffer IE, Berkovic SF, Mulley JC, Zamponi GW (2007) *Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants*. *Ann Neurol*. 62(6):560-568.

Hirose S, Mitsudome A, Okada M, Kaneko S (2005) *Genetics of idiopathic epilepsies*. *Epilepsia* 46 Suppl 1:38-43.

Hoda JC, Gu W, Friedli M, Phillips HA, Bertrand S, Antonarakis SE, Goudie D, Roberts R, Scheffer IE, Marini C, Patel J, Berkovic SF, Mulley JC, Steinlein OK, Bertrand D (2008) *Human nocturnal frontal lobe epilepsy: pharmacogenomic profiles of pathogenic nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit mutations outside the ion channel pore*. *Mol Pharmacol*. 74(2):379-391.

Huang Z, Walker MC, Shah MM (2009) *Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis*. *J Neurosci* 29:10979-10988.

Ishii TM, Takano M, Ohmori H (2001) *Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels*. J Physiol. 537(Pt 1):93-100.

Isom LL (2002) *Beta subunits: players in neuronal hyperexcitability?* Novartis Found Symp. 241:124-138.

Johnson JP, Zagotta WN (2005) *The carboxyl-terminal region of cyclic nucleotide-modulated channels is a gating ring, not a permeation path*. Proc Natl Acad Sci U S A 102:2742-2747.

Jung S, Jones TD, Lugo JN, Jr., Sheerin AH, Miller JW, D'Ambrosio R, Anderson AE, Poolos NP (2007) *Progressive dendritic HCN channelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy*. J Neurosci 27:13012-13021.

Kaupf UB, Seifert R (2001) *Molecular diversity of pacemaker ion channels*. Annu Rev Physiol. 63:235-257.

Kole MH, Brauer AU, Stuart GJ (2007) *Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model*. J Physiol 578:507-525.

Krampfl K, Maljevic S, Cossette P, Ziegler E, Rouleau GA, Lerche H, Bufler J (2005) *Molecular analysis of the A322D mutation in the GABA receptor alpha-subunit causing juvenile myoclonic epilepsy*. Eur J Neurosci. 22(1):10-20.

Lerche H, Weber YG, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2005) *Ion channel defects in idiopathic epilepsies*. Curr Pharm Des 11:2737-2752.

Lewis AS, Chetkovich DM (2011) *HCN channels in behavior and neurological disease: too hyper or not active enough?* Mol Cell Neurosci 46:357-367.

Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F (2003) *Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2.* EMBO Journal 22:216-224.

Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D (1993) *Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells.* J Neurophysiol 69:2129-2136.

Magee JC (1999) *Dendritic  $I_h$  normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons.* Nat Neurosci 2:848.

McCormick DA, Bal T (1997) *Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms.* Annu Rev Neurosci. 20:185-215.

McCormick DA, Huguenard JR (1992) *A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons.* J Neurophysiol. 68(4):1384-1400.

McCormick DA, Pape HC (1990) *Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones.* J Physiol. 431:291-318.

Milanesi R, Baruscotti M, Gnecci-Ruscone T, DiFrancesco D (2006) *Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel.* N Engl J Med 354:151-157.

---

Moosmang S, Biel M, Hofmann F Ludwig (1999) *A Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain*. Biol Chem. 380(7-8):975-980.

Mori Y, Wakamori M, Oda S, Fletcher CF, Sekiguchi N, Mori E, Copeland NG, Jenkins NA, Matsushita K, Matsuyama Z, Imoto K (2000) *Reduced voltage sensitivity of activation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels is associated with the ataxic mouse mutation rolling Nagoya (tg(rol))*. J Neurosci. 20(15):5654-5662.

Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001) *Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I<sub>f</sub>*. J Biol Chem. 276(31):29233-29241.

Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Berkovic SF (2003) *Channelopathies as a genetic cause of epilepsy*. Curr Opin Neurol 16:171-176.

Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Dibbens LM, Berkovic SF, Harkin LA (2005) *SCN1A mutations and epilepsy*. Hum Mutat. 25(6):535-542.

Noam Y, Baram TZ (2010) *Hyperpolarized views on the roles of the hyperpolarization-activated channels in neuronal excitability*. Epilepsy Curr 10:28-30.

Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsaki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2004) *A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons*. Cell 119:719-732.



Notomi T, Shigemoto R (2004) *Immunohistochemical localization of  $I_h$  channel subunits, HCN1-4, in the rat brain.* J Comp Neurol 471:241-276.

Pape HC (1994) *Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons.* Neuroscience. 59(2):363-73.

Pape H-C (1996) *Queer current and the pacemaker: Hyperpolarization-activated cation current in neurones.* pp 299-327.

Peng BW, Justice JA, Zhang K, He XH, Sanchez RM (2010) *Increased basal synaptic inhibition of hippocampal area CA1 pyramidal neurons by an antiepileptic drug that enhances  $I(H)$ .* Neuropsychopharmacology 35:464-472.

Poolos NP, Migliore M, Johnston D (2002) *Pharmacological upregulation of  $h$ -channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites.* Nat Neurosci 5:767-774.

Proks P, Antcliff JF, Lippiat J, Gloyn AL, Hattersley AT, Ashcroft FM (2004) *Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features.* Proc Natl Acad Sci U S A. 101(50):17539-17544.

Reid CA, Berkovic SF, Petrou S (2009) *Mechanisms of human inherited epilepsies.* Prog Neurobiol 87:41-57.

Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) *Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function.* Annu Rev Physiol 65:453-480.

Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) *Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS*. J Neurosci 20:5264-5275.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) *Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain*. Cell. 93(5):717-729.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) *Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain*. Cell. 93(5):717-729 .

Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D (2003) *Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease*. J Clin Invest 111:1537-1545.

Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D (2004) *Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons*. Neuron 44:495-508.

Steinlein OK (2004) *Genetic mechanisms that underlie epilepsy*. Nat Rev Neurosci 5:400-408.

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995) *A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Nat Genet. 11(2):201-203.

---

Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F (2005) *Functional expression of the human HCN3 channel*. J Biol Chem. 280(41):34635-34643.

Striano P, Bordo L, Lispi ML, Specchio N, Minetti C, Vigevano F, Zara F (2006) *A novel SCN2A mutation in family with benign familial infantile seizures*. Epilepsia 47(1):218-220.

Tang B, Sander T, Craven KB, Hempelmann A, Escayg A (2008) *Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy*. Neurobiol Dis 29:59-70.

Tran N, Proenza C, Macri V, Petigara F, Sloan E, Samler S, Accili EA (2002) *A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels*. J Biol Chem. 277(46):43588-43592.

Tsay D, Dudman JT, Siegelbaum SA (2007) *HCN1 channels constrain synaptically evoked Ca<sup>2+</sup> spikes in distal dendrites of CA1 pyramidal neurons*. Neuron 56:1076-1089.

Turnbull J, Lohi H, Kearney JA, Rouleau GA, Delgado-Escueta AV, Meisler MH, Cossette P, Minassian BA (2005) *Sacred disease secrets revealed: the genetics of human epilepsy*. Hum Mol Genet 14 Spec No. 2:2491-2500.

Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A (2004) *Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation*,

---

*D553N, associated with cardiac arrhythmia. J Biol Chem 279:27194-27198.*

Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M, DiFrancesco D (1999) *The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. Biochimica et Biophysica Acta 1446:419-425.*

Vitko I, Chen Y, Arias JM, Shen Y, Wu XR, Perez-Reyes E (2005) *Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel. J Neurosci. 25(19):4844-4855.*

Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) *Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. Nat Genet. 19(4):366-370.*

Xue T, Marbán E, Li RA (2002) *Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. Circ Res. 90(12):1267-1273.*

Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) *Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature 425:200-205.*

Zhang K, Peng BW, Sanchez RM (2006) *Decreased  $I_h$  in hippocampal area CA1 pyramidal neurons after perinatal seizure-inducing hypoxia. Epilepsia 47:1023-1028.*

Zwingman TA, Neumann PE, Noebels JL, Herrup K (2001) *Rocker is a new variant of the voltage-dependent calcium channel gene Cacna1a*. J Neurosci. 21(4):1169-1178.

Ringraziamenti:

Grazie di cuore a tutti gli amici che mi hanno accompagnato in questa splendida avventura. Grazie per il sostegno, l'aiuto, la simpatia, il cameratismo, i consigli e i preziosi insegnamenti.