

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO DI MEDICINA E DI SCIENZE DELLA SALUTE

“VINCENZO TIBERIO”

Dottorato di Ricerca in

“Medicina Traslazionale e Clinica”

Ciclo XXXVIII

TESI DI DOTTORATO

Approcci di medicina personalizzata tramite strategie di drug repurposing per il trattamento delle Encefalopatie Epilettiche e dello Sviluppo causate da mutazioni nei canali KCNT1 o KCNB1

Tutor
Chiar.ma
Prof.ssa Maria Virginia Soldovieri

Maria Virginia Soldovieri

Dottoranda
Dott.ssa Deborah Puzo

Deborah Puzo

Coordinatore
Chiar.mo Prof. Giovanni Scapagnini

SSD: BIOS-11/A
ANNO ACCADEMICO 2024-2025

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Canali ionici	3
1.2 Il potenziale di azione	10
1.3 Caratteristiche strutturali dei canali del K ⁺	16
1.4 Canalopatie ed epilessia	18
1.5.1 Fisiopatologia dei canali KCNT	31
1.5.2 Farmacologia dei canali KCNT1	33
1.6 Caratteristiche strutturali e meccanismi di regolazione dei canali KCNB1	37
1.6.1 Fisiopatologia dei canali KCNB1	41
1.6.2 Farmacologia dei canali KCNB1	42
1.7 Farmaci antiepilettici (AED)	44
2. SCOPO DEL LAVORO	50
3. MATERIALI E METODI	55
3.1 Ingegnerizzazione dei plasmidi incorporanti le varianti in studio	55
3.2 Estrazione di DNA plasmidico su piccola scala (mini-prep)	58
3.3 Digestione diagnostica dei cloni e sequenziamento	59
3.4 Estrazione di DNA plasmidico su larga scala (maxi-prep)	61
3.5 Esperimenti di elettrofisiologia sui canali KCNT1 WT o mutanti	64
3.6 Esperimenti di elettrofisiologia sui canali KCNB1 WT o mutanti	66
3.7 Preparazione dei farmaci utilizzati	70
3.8 Analisi statistica	70
4. RISULTATI	71
4.1 Studio delle proprietà funzionali e della sensibilità farmacologica di canali KCNT1 wild-type o incorporanti le varianti in studio	71
4.1.1 Ingegnerizzazione dei plasmidi incorporanti ciascuna variante in studio	71
4.1.2 Quantificazione del DNA plasmidico ottenuto mediante ciascuna procedura di maxi-prep	79
4.1.3 Caratterizzazione funzionale e farmacologica dei canali KCNT1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio	80
4.1.4 Studio della modulazione delle correnti di KCNT1 in seguito ad attivazione del recettore muscarinico M1	84
4.2 Studio delle proprietà funzionali e della sensibilità farmacologica di canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio	86
4.2.1 Ingegnerizzazione dei plasmidi incorporanti ciascuna variante in studio	86
4.2.2 Quantificazione del DNA plasmidico ottenuto mediante ciascuna procedura di maxi-prep	107
4.2.3 Caratterizzazione funzionale dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione omomeric	110

4.2.4 Sensibilità farmacologica dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione omomerica	118
4.2.5 Identificazione del rapporto di trasfezione appropriato per gli studi funzionali in configurazione eteromerica delle varianti LoF identificate nei canali KCNB1	121
4.2.6 Caratterizzazione funzionale dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione eteromerica	125
4.2.7 Sensibilità farmacologica dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione eteromerica.....	138
5. DISCUSSIONE	141
5.1 KCNT1.....	142
5.2 KCNB1.....	150
5.3 Conclusioni.....	157
6. BIBLIOGRAFIA	159
6.1 Libri di testo.....	159
6.2 Referenze	159

1. INTRODUZIONE

1.1 Canali ionici

I canali ionici sono proteine integrali transmembrana in genere costituite da più subunità a formare le pareti di un poro idrofilo all'interno del doppio strato fosfolipidico attraverso il quale gli ioni possono fluire; queste proteine sono in grado di discriminare tra cationi ed anioni, ma anche tra ioni monovalenti e divalenti, per cui solo ioni con dimensioni e carica appropriata possono attraversare il canale. Questa caratteristica è detta **permeabilità selettiva** e in base ad essa si distinguono canali per il Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- . Un'altra caratteristica importante dei canali ionici è che sono in grado di attivarsi in risposta a segnali specifici, come cambiamenti nel potenziale di membrana o in presenza di specifici ligandi. Queste proprietà dei canali ionici dipendono dalla presenza di due domini:

1. un **filtro di selettività**, che determina quali ioni possono attraversare la membrana. Tale regione è presente nel poro, attraverso il quale passano gli ioni permeanti;
2. un **“cancello”** che determina le condizioni di apertura del canale.

I diversi meccanismi di *gating* (ovvero il tipo di segnale che determina l'apertura) permettono di distinguere i canali ionici in: mecano-sensibili, ligando-dipendenti o voltaggio-dipendenti.

I **canali mecano-sensibili** sono canali attivati da un aumento di tensione della membrana lipidica, in risposta al quale i canali attuano un immediato e non selettivo rilascio di soluti ed acqua per salvaguardare l'integrità cellulare. Tali canali sono localizzati principalmente a livello dei neuroni sensoriali e sono alla base di processi fisiologici, come la percezione della pressione sulla pelle, delle vibrazioni dell'aria e la propriocezione (*Guichard et al., 2022*). Il loro meccanismo di apertura e chiusura non è stato ancora del tutto compreso; tuttavia, vi sono due ipotesi principali: secondo la prima ipotesi, basterebbe la torsione o lo stiramento della membrana cellulare ad aprire meccanicamente tali canali e, quando questa ritorna alla sua conformazione naturale in seguito alla cessazione delle forze meccaniche, il canale torna allo stato chiuso. Secondo l'altra ipotesi, invece, esisterebbero delle strutture filamentose che ancorano la proteina da un lato al versante extracellulare e dall'altro al citoscheletro: tali strutture trasmettono gli stimoli meccanici al canale regolandone l'apertura o la chiusura (*Guichard et al., 2022*).

I **canali ligando-dipendenti** sono proteine oligomeriche in grado di convertire il segnale chimico in flusso ionico attraverso la membrana postsinaptica. La peculiarità principale di questi canali è che i ligandi si legano con diversa affinità alle conformazioni aperte o chiuse del canale: in particolare, se la molecola lega in maniera più forte la conformazione chiusa sarà detto inibitore, mentre se lega fortemente quella aperta sarà detto attivatore. Un esempio di canali ligando-dipendenti è

rappresentato dai **recettori nicotinici** espressi sulla placca motrice, dove il ligando è rappresentato dall'acetilcolina (ACh, Figura 1): quando questa si lega, i recettori si aprono generando un potenziale d'azione che si propaga all'interno della cellula muscolare attraverso i tubuli T innescando la liberazione di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico e quindi il suo legame alla troponina, consentendo la contrazione muscolare. Una volta che il potenziale d'azione cessa, il Ca^{2+} viene riassorbito a livello del reticolo sarcoplasmatico, in modo da essere disponibile per essere rilasciato al successivo stimolo.

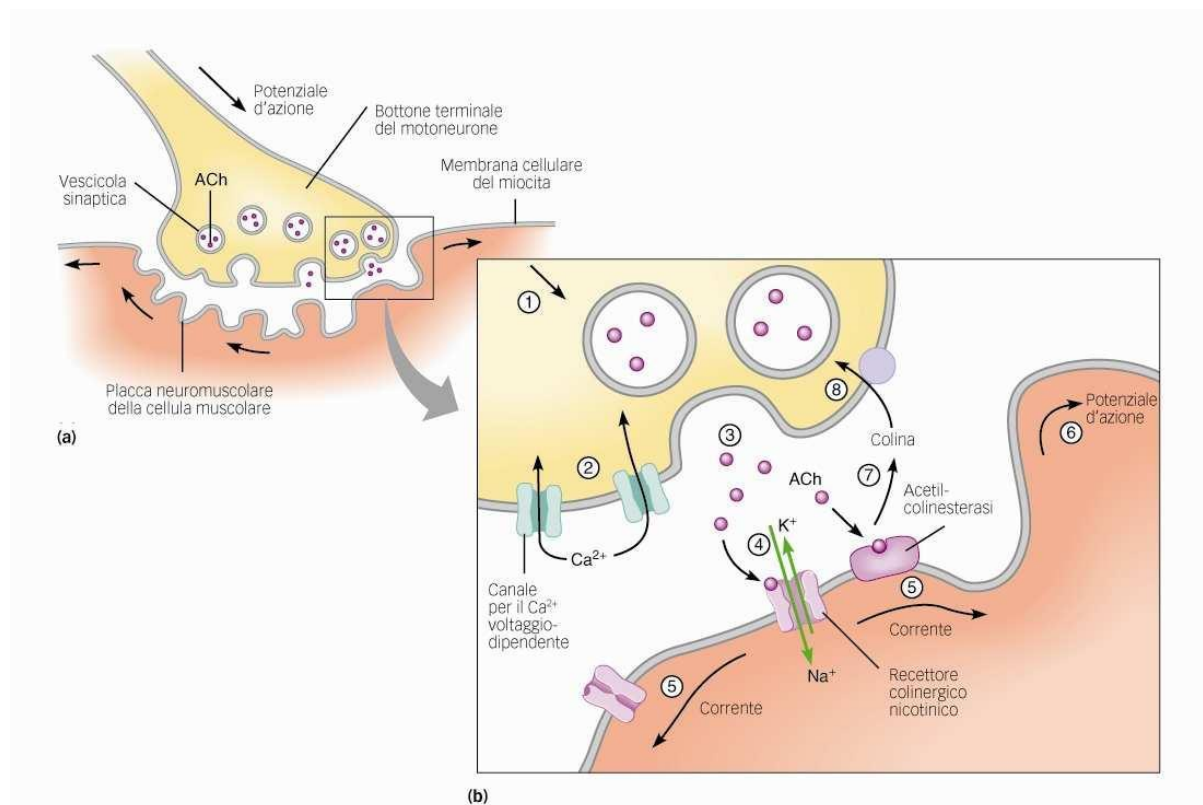


Figura 1. Meccanismo d'azione dell'acetilcolina a livello della placca motrice. A) Giunzione neuromuscolare, formata dal terminale assonico (in giallo) e dalla placca motrice (in rosa). B) Meccanismo d'azione dell'acetilcolina nella contrazione muscolare: 1. arrivo di un potenziale d'azione al terminale assonico di un motoneurone; 2. apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti; 3. ingresso di Ca^{2+} che stimola il rilascio di acetilcolina tramite esocitosi di vescicole; 4. legame dell'acetilcolina ai recettori nicotinici presenti sulla placca motrice con conseguente apertura; 5. ingresso di Na^{+} con formazione di correnti locali; 6. generazione di un potenziale d'azione che si diffonde lungo la membrana consentendo la contrazione muscolare; 7. scissione dell'acetilcolina in colina ed acetil-coenzima A ad opera dell'enzima acetil-colinesterasi; 8. riassorbimento della colina a livello del motoneurone per successiva riutilizzazione (Fonte: German, Stanfield; *Fisiologia*, II edizione, ediSES 2006).

I **canali voltaggio-dipendenti** sono strutture proteiche di peso molecolare compreso tra i 200 e i 250 kDa, la cui attivazione è innescata da variazioni del potenziale di membrana. Esistono canali voltaggio-dipendenti per K^+ , Na^+ e Ca^{2+} ; i primi sono costituiti da quattro distinti polipeptidi o subunità che si assemblano a formare un tetramero. Ogni subunità presenta sei segmenti transmembrana, denominati da S_1 a S_6 , di cui S_5 e S_6 si collocano al centro formando il poro, mentre gli altri segmenti, che costituiscono il sensore del voltaggio (o VSD) si dispongono radialmente. Ognuno dei segmenti, ma anche le congiunzioni tra di essi, svolge un ruolo ben preciso nell'attività del canale regolandone l'attivazione, l'inattivazione oppure la selettività ionica. Invece, i canali per Na^+ e Ca^{2+} sono costituiti da un'unica catena polipeptidica principale, chiamata subunità α , composta da 4 domini (denominati da I a IV) costituiti da 300/400 amminoacidi, simili tra di loro e con organizzazione strutturale molto simile a quella descritta per le singole subunità selettive per il K^+ . Pertanto, non sorprende che diversi studi dimostrano che le subunità dei canali del K^+ siano i precursori filogenetici dei canali per Na^+ o Ca^{2+} (Figura 2).

Sia nei canali voltaggio-dipendenti sia in quelli voltaggio-indipendenti sono presenti delle subunità dette **accessorie**. Queste sono variabili sia in tipologia che in numero e possono svolgere diverse funzioni: possono, ad esempio, intervenire durante le fasi di assemblaggio dei canali, possono regolare il loro trasporto e la localizzazione nella membrana plasmatica, oppure conferire caratteristiche peculiari sia funzionali che farmacologiche a ciascun canale.

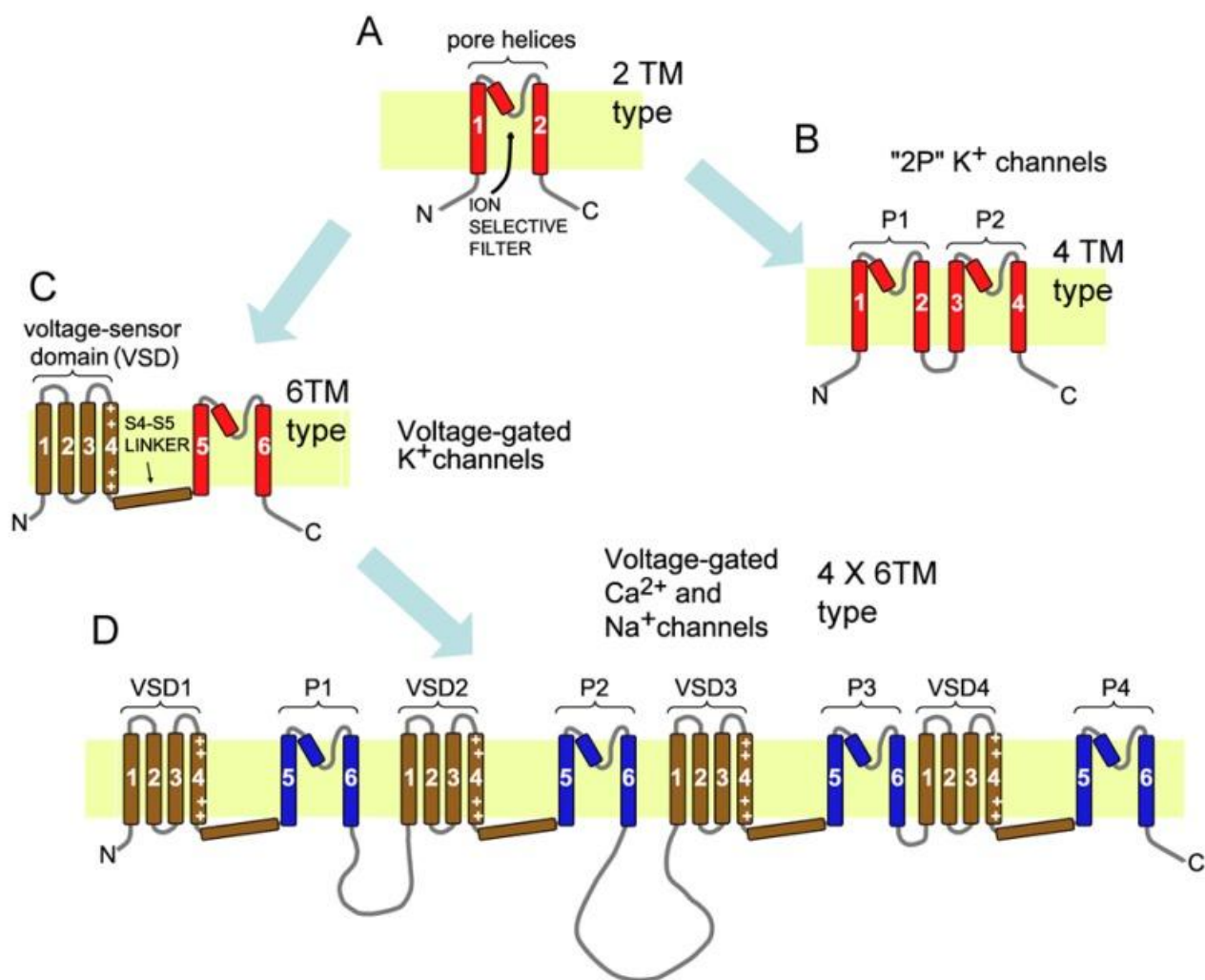


Figura 2. Classificazione dei canali ionici voltaggio-dipendenti. A) canale del K⁺ ancestrale a due segmenti transmembrana, B) struttura del canale del K⁺ a quattro segmenti transmembrana originatosi dalla duplicazione del gene codificante per i canali del K⁺ a due segmenti transmembrana, C) canale del K⁺ a sei segmenti transmembrana originatosi dalla fusione di un sensore del voltaggio (in marrone) e un canale a due domini transmembrana che formano la porzione del poro (in rosso), D) rappresentazione strutturale di tipici canali del Na⁺ e del Ca²⁺ voltaggio-dipendenti, prodotti da duplicazioni dei geni codificanti per i canali del K⁺ a sei segmenti transmembrana, dove P indica il poro (in blu) e VSD indica il sensore del voltaggio (in marrone; *Cooper et al., 2012*).

I canali voltaggio-dipendenti rispondono a variazioni del potenziale di membrana in quanto possiedono strutture in grado di captare il campo elettrico ed i suoi cambiamenti; tale dominio prende il nome di **sensore del voltaggio (VSD)**, che include i segmenti da S₁ ad S₄, con quest'ultimo che contiene diversi residui amminoacidici carichi positivamente stabilizzati da legami elettrostatici con residui carichi negativamente presenti nei segmenti S₁, S₂ ed S₃, o con le teste polari dei fosfolipidi di membrana. Il meccanismo attraverso il quale il VSD sia in grado di attivare il canale è ancora oggi oggetto di studio, sebbene i risultati ottenuti mediante tecniche di spettroscopia in fluorescenza, elettrofisiologia e soprattutto di cristallografia hanno permesso di proporre tre modelli principali per tale meccanismo:

1. **modello del trasportatore:** secondo questo modello il segmento S₄ andrebbe incontro ad una rotazione intorno al proprio asse durante la depolarizzazione, in seguito alla quale le cariche positive si muoverebbero all'interno di cavità che si trovano in continuità tra l'ambiente extra- ed intra-cellulare (Figura 3);
2. **modello a vite elicoidale:** in questo modello si ipotizza che in posizione di riposo l'S₄ che è carico positivamente è attratto dalle cariche negative presenti sui segmenti S₁, S₂ e S₃; in conseguenza ad un cambio del potenziale di membrana, l'S₄ subisce una rotazione ed una dislocazione lungo il proprio asse (Figura 3);
3. **modello a paletta:** questo modello è basato sulla struttura del canale del K⁺ batterico KvAP, in cui i segmenti S₃ e S₄ si uniscono a formare una forcina ad elica che possiede una grande libertà di movimento; inoltre, sembrerebbe che con questo tipo di conformazione le cariche dell'S₄ siano esposte ai lipidi sia nello stato attivo sia in quello di riposo (Figura 3).

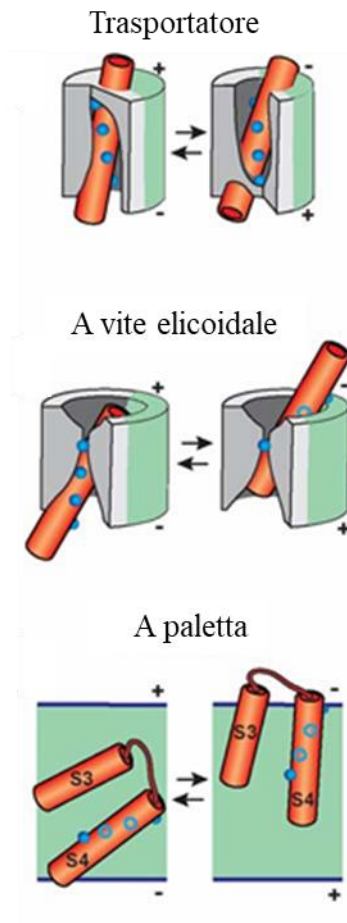


Figura 3. Modelli di movimento del VSD. Rappresentazione dei tre modelli proposti per il movimento dei segmenti S₃ e S₄ (cilindri arancioni, *Tombola et al.*, 2006).

In tutti i canali voltaggio-dipendenti, si parla di **attivazione** quando il canale passa da uno stato chiuso ad uno aperto, viceversa quando si passa da uno stato aperto ad uno chiuso si parla di **deattivazione**; in alcuni canali è presente una terza configurazione, detta stato **inattivato**, in cui, nonostante il poro risulti aperto, gli ioni non possono attraversare il canale; in più, quest'ultimo non può essere attivato fino a quando il potenziale di membrana non ritornerà al potenziale di riposo, permettendo la deaktivazione del canale. Tale processo prende il nome di **recupero dall'inattivazione**. L'inattivazione di un canale voltaggio-dipendente è solitamente dovuta a riarrangiamenti di porzioni idrofobiche della proteina che vanno ad ostruire la porzione del poro fungendo da “cancello” per il passaggio degli ioni. L'inattivazione di un canale può essere dovuta anche all'azione di specifici ligandi, come l'interazione con proteine Ca²⁺-dipendenti quali la calmodulina (*Zühlke et al.*, 1999), processi di fosforilazione o defosforilazione (*Dai et al.*, 2009) o ancora interazioni con subunità accessorie (*Goldin*, 1993).

Il tratto che congiunge S₅ ed S₆ contiene una sequenza chiamata H5 di circa venti amminoacidi, che si insinua all'interno dell'anello formato dagli altri segmenti e che delinea la regione centrale del **poro**. A livello di tale regione, nei canali del K⁺ si trova la sequenza TVGYG (treonina-valina-glicina-

tirosina-glicina), che costituisce il **filtro di selettività**, ossia il dominio in cui avviene la selezione degli ioni. Durante la depolarizzazione il riarrangiamento di S₄ viene trasmesso a S₆, determinando l'apertura del poro. Da immagini cristallografiche di canali del potassio si è visto che le regioni che governano l'apertura e la chiusura del poro sono localizzate a livello del C-terminale dei segmenti S₆, in cui una sequenza PVP (prolina-valina-prolina) di ciascuna subunità, forma un fascio di quattro eliche flessibili che si spostano perifericamente durante l'apertura, mentre si ricompattano durante la chiusura. Quindi, il contatto tra il segmento di connessione S₄/S₅ ed il C-terminale dell'S₆ garantisce l'accoppiamento elettromeccanico tra la dislocazione del sensore del voltaggio e l'apertura del poro (Figura 4).

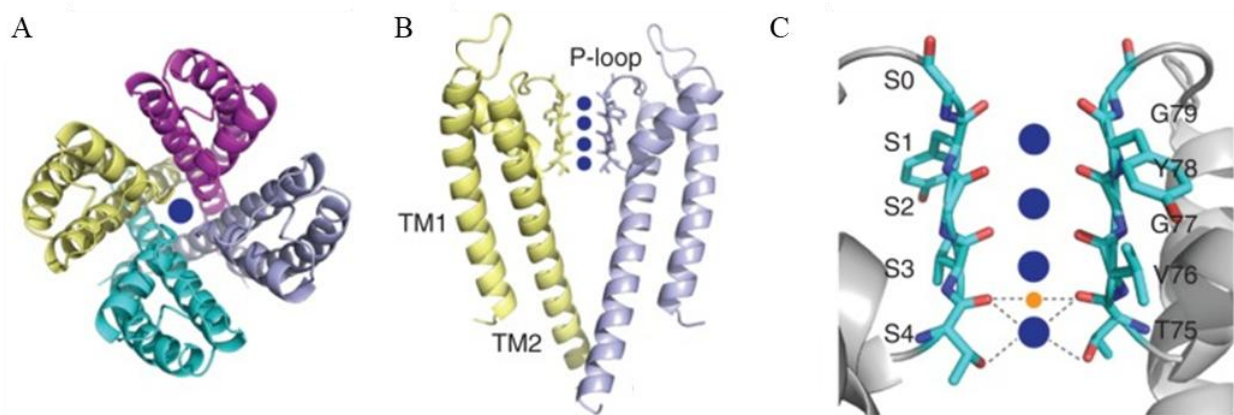


Figura 4. Esempio di struttura di un canale del potassio voltaggio-dipendente. A) Struttura tridimensionale di un canale del K⁺ (visto dall'alto), in cui sono indicate le 4 subunità con colori diversi attorno a un poro centrale. Il punto blu al centro indica la posizione degli ioni K⁺ lungo l'asse del poro. B) Vista laterale di due subunità adiacenti, con uno zoom sulla regione del poro in cui sono chiaramente distinguibili le eliche transmembrana (TM1 e TM2), che corrispondono ai segmenti S₅ ed S₆, il tratto che connette S₅ e S₆ denominato P-loop (corrispondente a H5) che si insinua nel poro, formando il filtro di selettività. C) Ingrandimento del filtro di selettività e della porzione superiore del poro in cui sono mostrati i residui amminioacidici del motivo conservato TVGYG (indicati come G77, Y78, ecc.), che costituisce il filtro di selettività per il K⁺; le palline blu rappresentano ioni K⁺ coordinati lungo il filtro, mentre i punti arancioni indicano molecole d'acqua interposte tra gli ioni (Fonte: Kim e Nimigean, 2016).

1.2 Il potenziale di azione

Tutte le cellule mostrano un potenziale di membrana a riposo (V_m) caratterizzato da un accumulo di cariche negative sul versante intracellulare. I fattori che principalmente influiscono sul V_m sono due:

1. **distribuzione degli ioni:** in condizioni normali, gli ioni Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- sono più abbondanti nel liquido extracellulare, mentre lo ione K^+ è più abbondante nel citoplasma;
2. **differenze nella permeabilità di membrana:** la membrana plasmatica mostra una elevata permeabilità per lo ione K^+ e una minore per lo ione Na^+ .

Ogni ione tende a muoversi secondo il proprio gradiente elettrochimico, cioè la somma delle forze prodotte dalla differenza di concentrazione e dalla differenza di carica tra i due lati della membrana. Il potenziale di equilibrio per un singolo ione, cioè il valore del potenziale di membrana al quale non vi è movimento netto dello ione stesso, può essere calcolato tramite l'equazione di Nerst:

$$E_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{\text{extracellulare}}}{[X]_{\text{intracellulare}}}$$

dove:

- E_X è il potenziale di equilibrio dello ione X;
- R è la costante dei gas (pari a $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$);
- T è la temperatura assoluta (K);
- z è la valenza dello ione;
- F è la costante di Faraday ($96.485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$);
- $[X]_{\text{extracellulare}}$ e $[X]_{\text{intracellulare}}$ sono le concentrazioni dello ione all'esterno e all'interno della cellula, rispettivamente.

Tramite l'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz (GHK), si può prevedere il valore di V_m sulla base delle concentrazioni dei principali ioni e della permeabilità della membrana nei confronti di ciascuno. Infatti, supponendo che le specie ioniche che maggiormente contribuiscono al mantenimento del V_m nei mammiferi siano Na^+ , K^+ e Cl^- , possiamo scrivere l'equazione di GHK come segue:

$$V_m = 61 \log \frac{P_K [\text{K}^+]_{\text{est}} + P_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_{\text{est}} + P_{\text{Cl}} [\text{Cl}^-]_{\text{int}}}{P_K [\text{K}^+]_{\text{int}} + P_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_{\text{int}} + P_{\text{Cl}} [\text{Cl}^-]_{\text{est}}}$$

dove:

- V_m : potenziale di membrana a riposo a 37°C espresso in mV;
- $61 = 2.303 \text{ RT/F}$ a 37°C (R: costante dei gas reali, T: temperatura assoluta e F: costante di Faraday);
- P_K , P_{Na} e P_{Cl} : permeabilità della membrana per gli ioni K^+ , Na^+ e Cl^- rispettivamente;
- $[\text{ione}]_{\text{est}}$: concentrazione all'esterno della membrana dello ione in parentesi;
- $[\text{ione}]_{\text{int}}$: concentrazione all'interno della membrana dello ione in parentesi.

Tenendo conto del contributo che tutti gli ioni danno al V_m , questo equivale a circa -70 mV . Il movimento degli ioni attraverso la membrana può portare ad un discostamento da questo valore in due direzioni: si può andare incontro ad un aumento o **depolarizzazione**, quando un eccesso di cariche positive, in genere dovute all'ingresso di Na^+ , entra nella cellula; oppure si può andare incontro ad una diminuzione o **iperpolarizzazione**, quando si ha un eccesso di cariche negative dovuto ad esempio ad un aumento della permeabilità della membrana al K^+ in uscita dalla cellula. Le correnti ioniche attraverso la membrana non sono fisse: le cellule possono modificarle aprendo o chiudendo specifici canali ionici, cambiando in questo modo la permeabilità della membrana agli ioni. Questo spostamento avviene tramite il meccanismo di diffusione facilitata attraverso i canali ionici. Il flusso di corrente (i) generato dallo spostamento delle cariche degli ioni possono modificare il V_m . Tale flusso obbedisce alla legge di Ohm secondo la quale i è direttamente proporzionale alla differenza di potenziale elettrico (V) espressa in Volt tra due punti, ed è inversamente proporzionale alla resistenza (R) del sistema. Per cui:

$$i = V/R$$

dove R rappresenta la forza che si oppone al flusso di corrente ed è dovuta a due principali fattori:

1. la resistenza della membrana plasmatica (R_m): poiché il doppio strato fosfolipidico è un ottimo isolante, quando i canali ionici sono chiusi si ha un'elevata resistenza ed una bassa conduttanza, mentre l'apertura dei canali determina una diminuzione della R_m ;
2. la resistenza del citoplasma (R_i) dovuta alla sua composizione ricca di altre strutture e molecole.

La R_m e la R_i determinano quanta corrente passa attraverso una cellula prima che tale forza venga dissipata.

Le variazioni del potenziale elettrico che si verificano a livello neuronale possono essere classificate in due tipi: **potenziali graduati** e **potenziali d'azione**. I **potenziali graduati** hanno un'intensità variabile direttamente proporzionale alla forza dello stimolo che lo innesca, determinata dalla quantità di carica che entra nella cellula. Tali potenziali, man mano che si propagano lungo i neuroni perdono di intensità, sia a causa della presenza di canali aperti lungo i neuroni, che causano una dispersione di carica nel liquido cellulare, sia a causa della resistenza che il citoplasma oppone al flusso di carica elettrica. Tuttavia, se un potenziale graduato è abbastanza intenso può raggiungere una regione specifica del neurone chiamata **zona trigger** (o di innesco), ricca di canali per il Na^+ , riuscendo ad innescare un potenziale d'azione innalzando il potenziale di membrana da $\sim -70 \text{ mV}$ a $\sim -55 \text{ mV}$, detto valore soglia. Al contrario, i **potenziali d'azione** rappresentano delle depolarizzazioni rapide e ampie in grado di propagarsi per lunghe distanze senza mai diminuire d'intensità. I potenziali d'azione hanno luogo quando i canali per Na^+ e K^+ si aprono alterando la permeabilità della membrana a tali ioni, e possono essere suddivisi in tre fasi: una fase ascendente (**depolarizzazione**), una discendente (**ripolarizzazione**) e una fase di **iperpolarizzazione postuma** (Figura 5). Durante la prima fase si ha un improvviso e transitorio aumento della permeabilità al Na^+ dovuto all'apertura dei canali del Na^+ nella zona trigger: di conseguenza, il Na^+ entra all'interno della cellula attirato dalle cariche negative presenti sul versante citoplasmatico della membrana e dal gradiente di concentrazione tra l'ambiente intra- ed extracellulare. L'ingresso di cariche positive porta ad una depolarizzazione della membrana ed il valore del potenziale continua a salire fino a raggiungere valori positivi. Tali canali, si inattivano dopo pochi millisecondi dall'apertura, bloccando il flusso di ioni anche se la membrana rimane depolarizzata. Il canale resta inattivo fino a quando la membrana non si ripolarizza, momento in cui torna nello stato chiuso, da cui può tornare nuovamente nello stato aperto nel corso di un nuovo potenziale d'azione. Lo stimolo che ha indotto l'apertura dei canali del Na^+ induce un'azione anche sui canali del K^+ , i quali però mostrano cinetiche di apertura generalmente più lente rispetto ai primi, per cui gli effetti della loro apertura risultano misurabili più tardi, intorno al raggiungimento del

potenziale di circa +30 mV con conseguente fuoriuscita degli ioni K^+ che determina la ripolarizzazione del potenziale di membrana. Quando si raggiungono valori intorno a ~ -70 mV i canali del K^+ non sono ancora chiusi, per cui il K^+ continua ad uscire dalla cellula causando un'iperpolarizzazione che raggiunge il picco a ~ -90 mV: questa rappresenta la fase di iperpolarizzazione postuma. Infine, la ritenzione degli ioni K^+ e l'espulsione degli ioni Na^+ , mediata dall'azione della proteina Na, K-ATPasi, riporta i valori del potenziale di membrana a ~ -70 mV equivalente al V_m .

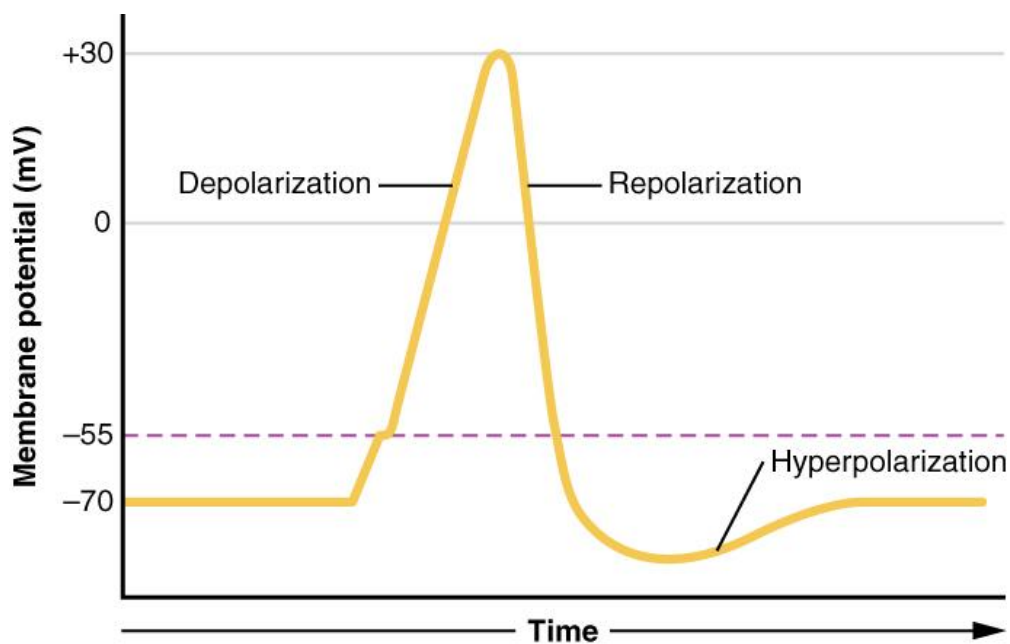
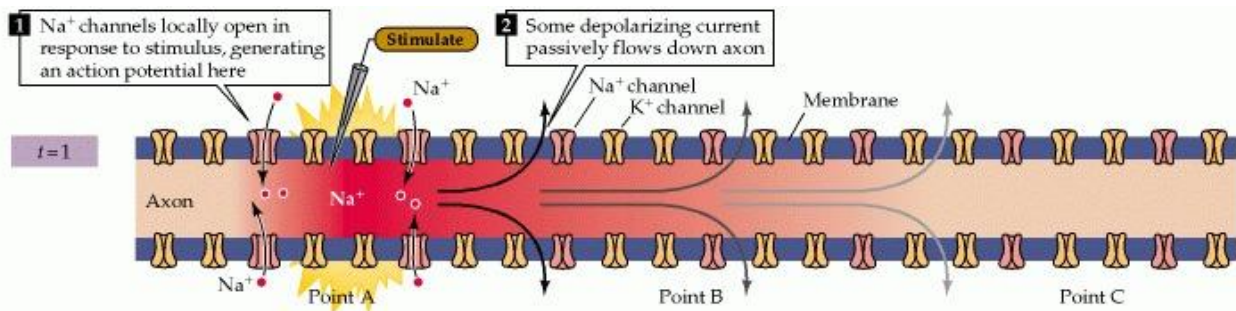


Figura 5. Il potenziale d'azione. Variazione del potenziale di membrana rispetto al tempo, nelle tre fasi (depolarizzazione, ripolarizzazione e iperpolarizzazione) che costituiscono un potenziale d'azione (Grider *et al.*, 2023).

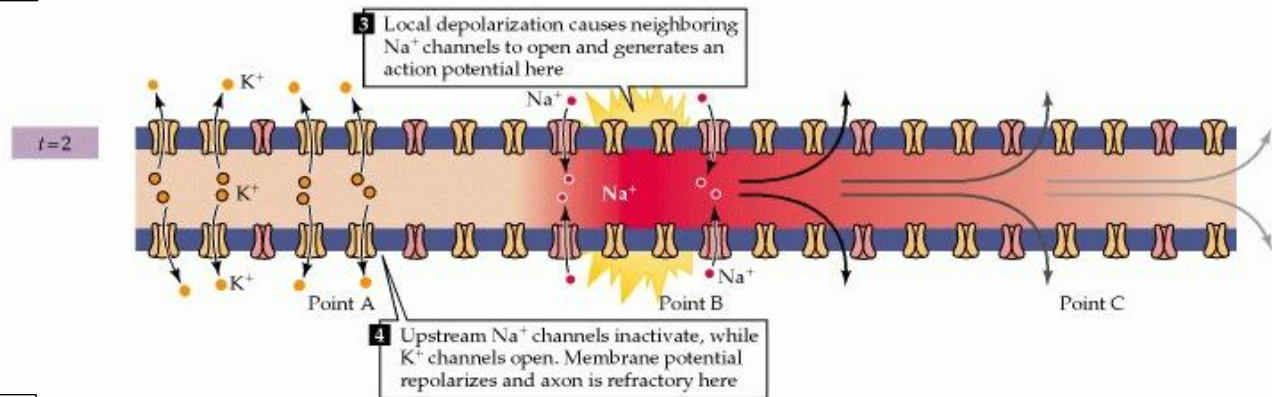
Normalmente, quando si innesca un potenziale d'azione, il neurone va incontro ad un **periodo refrattario assoluto**, ovvero un lasso di tempo ($\sim 1-2$ ms) in cui non può essere innescato un secondo potenziale d'azione a prescindere dall'intensità dello stimolo. Questa refrattarietà è dovuta al fatto che i canali del Na^+ si trovano nello stato inattivo, per cui non sono in grado di attivarsi, e quindi di produrre una nuova depolarizzazione, in risposta ad un nuovo stimolo. Al periodo refrattario assoluto segue un **periodo refrattario relativo**, in cui una parte dei canali del Na^+ sono tornati nella posizione di riposo mentre i canali del K^+ sono ancora aperti, per cui per innescare un potenziale d'azione occorrerà uno stimolo di elevata intensità. I periodi refrattari hanno la funzione di limitare la frequenza degli impulsi elettrici e garantire la propagazione dell'impulso in senso unidirezionale (dal corpo cellulare al terminale assonico).

Una peculiarità fondamentale dei potenziali d'azione è quella di propagarsi lungo l'assone neuronale grazie a correnti locali di Na^+ che fungono da stimolo per l'apertura di altri canali del Na^+ in altre sezioni della membrana lungo l'assone, garantendo il mantenimento della potenza per lunghe distanze (Figura 6).

A



B



C

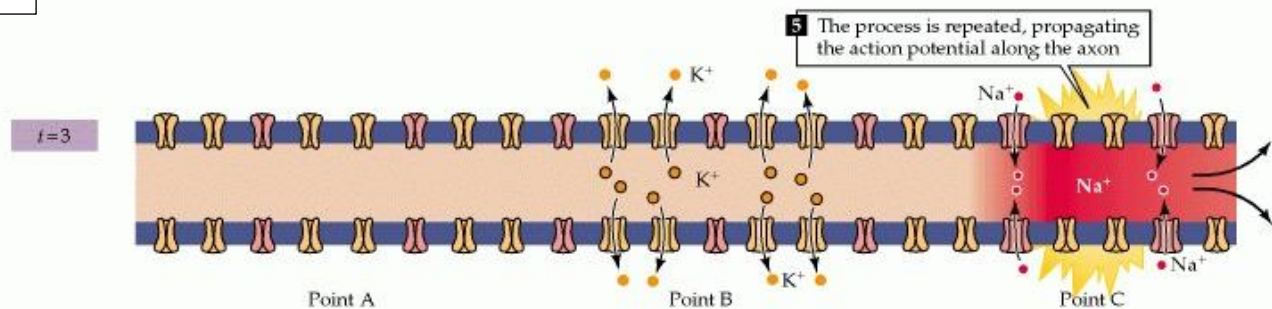


Figura 6. Conduzione del potenziale d'azione lungo l'assone. La depolarizzazione in un punto dell'assone apre localmente i canali del Na^+ (1) e produce un potenziale d'azione in questo punto (A, $t=1$). La corrente risultante viaggia lungo l'assone (2), depolarizzando la regione adiacente (punto B). Successivamente ($t=2$), la depolarizzazione della membrana adiacente apre i canali del Na^+ nel punto B, determinando l'inizio del potenziale d'azione in questo sito e un'ulteriore corrente che si diffonde in un punto adiacente (punto C) lungo l'assone (3). Al $t=3$, il potenziale d'azione si è propagato ancora più lontano. Questo ciclo continua per tutta la lunghezza dell'assone (5). Mentre il potenziale d'azione si propaga, il potenziale di membrana si ripolarizza a causa dell'apertura dei canali del K^+ e dell'inattivazione dei canali del Na^+ , portando al periodo di refrattarietà che impedisce la propagazione all'indietro (4; Purves et al., 2001).

1.3 Caratteristiche strutturali dei canali del K⁺

I canali del K⁺ rappresentano una vasta ed eterogenea classe di canali ionici che, come detto, hanno la funzione di stabilizzare il potenziale di membrana portandolo verso il potenziale di equilibrio del K⁺ (circa -90 mV in condizioni fisiologiche) e allontanandolo quindi dal valore soglia per l'innesco dei potenziali d'azione. Tali canali partecipano anche al trasporto di soluti attraverso gli epiteli come nei reni, oppure nelle cellule gliali favoriscono la rimozione degli ioni K⁺ in eccesso, o ancora sono essenziali per la proliferazione delle cellule T e B nella risposta immunitaria. Inoltre, nei recettori sensoriali dell'orecchio interno, i canali del K⁺ voltaggio-dipendenti o meccano-sensibili regolano il flusso di ioni in risposta a stimoli meccanici. In questo contesto, il *gating* (cioè l'apertura e la chiusura dei canali in risposta a variazioni di tensione o forze meccaniche) permette di sincronizzare la depolarizzazione delle cellule sensoriali e la conseguente trasmissione del segnale uditivo. La diversificazione funzionale di questi canali è dovuta ad una grande varietà genica: infatti, nell'uomo sono stati identificati più di settanta geni che codificano per proteine che fungono da subunità dei canali del K⁺.

È possibile classificare i canali del K⁺ in base al numero di segmenti transmembrana presenti in ciascuna subunità:

1. la prima famiglia include subunità a sei segmenti transmembrana (6 TM), che comprende almeno dodici sottofamiglie. I canali di questa classe, denominati da Kv1 a Kv12, sono caratterizzati dalla presenza di un VSD (S₁-S₄) e di un poro (S₅-S₆);
2. la seconda è una famiglia costituita da due segmenti transmembrana (2 TM) che sono omologhi ai segmenti S₅-S₆ dei canali K_V. Mancando però del VSD, queste subunità formano dei canali detti voltaggio-indipendenti; questo gruppo è codificato da almeno sette geni (K_{IR}1-K_{IR}7) codificanti per canali definiti "rettificatori in ingresso", che sono attivati e regolati da proteine G. Un esempio è costituito dai canali K_{ATP} che hanno la funzione di accoppiare l'attività elettrica a quella metabolica in diversi organi e tessuti: ad esempio, nelle cellule β del pancreas endocrino regolano la secrezione di insulina; nei cardiomiociti modulano l'eccitabilità e la risposta metabolica; nelle cellule neuronali e gliali, contribuiscono al mantenimento del potenziale di membrana e alla protezione metabolica durante condizioni di stress;
3. la terza famiglia è quella dei canali formati da quattro domini transmembrana (4 TM), che include almeno quindici subunità (K_{2P}1-K_{2P}15). La funzione dei canali appartenenti a questa famiglia è quella di generare correnti voltaggio-indipendenti attive in condizioni di riposo.

Tuttavia, questa classificazione non include tutte le tipologie di canali del K^+ noti; infatti, alcuni con attività Ca^{+} -dipendente sono formati dall'unione di subunità a sette segmenti transmembrana, come i canali BK che presentando un segmento transmembrana in più all'N-terminale detto S_0 (*Sancho et al., 2021*); altri sono attivati da un aumento della concentrazione di Na^+ (*Zhang et al., 2010*).

1.4 Canalopatie ed epilessia

Con il termine **canalopatie** si intende un gruppo di patologie causate da difetti nella struttura o nel funzionamento dei canali ionici, dovuti a mutazioni nei geni che codificano per le subunità di tali canali (*Kass, 2005; Bernard et al., 2008*). Poiché questi hanno un'estesa distribuzione nell'organismo, le patologie che ne derivano sono diverse e possono coinvolgere vari sistemi o organi. Infatti, patologie classificate come canalopatie sono state riscontrate nel sistema cardiovascolare, nel sistema respiratorio, nel sistema immunitario, nell'apparato urinario, nel sistema endocrino e nel sistema nervoso centrale (SNC; *Bernard et al., 2008*). Il campo di studio delle canalopatie si sta espandendo rapidamente e va di pari passo all'avanzamento della ricerca nell'ambito dei canali ionici e del loro ruolo nella patogenesi (*June-Bum Kim et al., 2014*).

La più grave e diffusa tra le canalopatie è l'**epilessia**, che rappresenta il disturbo neurologico più comune dopo l'ictus, affliggendo circa 50 milioni di persone in tutto il mondo (International League Against Epilepsy, ILAE). Con il termine epilessia si intende un insieme di sindromi che hanno come caratteristica comune la predisposizione a crisi spontanee e ricorrenti (*Chang et al., 2003*). A causa della grande eterogeneità dei sintomi con cui essa si può manifestare, per molto tempo la diagnosi dell'epilessia ha rappresentato un problema serio; secondo le prime linee guida dell'ILAE per una diagnosi di epilessia occorre che il paziente avesse presentato almeno due crisi epilettiche spontanee con una distanza temporale maggiore di 24 ore l'una dall'altra. Tuttavia, molti clinici hanno espresso perplessità verso tale metodologia di diagnosi poiché bisogna tenere conto che la probabilità di avere crisi epilettiche è maggiore in soggetti che hanno sperimentato questa condizione almeno una volta, oppure soggetti che hanno particolari condizioni cliniche (come ictus, traumi o infezioni del SNC), presentano un alto rischio di recidive in futuro. Per questo motivo, l'ILAE ha stilato un rapporto in cui afferma che per diagnosticare l'epilessia, oltre al presentarsi di almeno una crisi spontanea, si deve considerare il rischio di recidiva e che esso deve corrispondere almeno al 60% (rapporto ufficiale ILAE, 2014). Inoltre, in tale rapporto si mette in dubbio anche l'utilizzo del termine "spontanee" riferito alle crisi epilettiche per la diagnosi di epilessia, poiché con questo termine ci si riferisce a crisi non provocate da uno stimolo esterno, come può essere uno stimolo luminoso; tuttavia, nei soggetti in cui gli stimoli luminosi provocano crisi epilettiche si osserva un abbassamento della soglia di eccitabilità dei neuroni che non si osserva nei soggetti non predisposti ad epilessia. Pertanto, l'abbassamento di tale soglia è da considerarsi ugualmente uno stato patologico che rientra nella definizione di epilessia.

La distinzione tra epilessie focali ed epilessie generalizzate rappresenta un cardine concettuale nella classificazione moderna delle sindromi epilettiche ed è fondamentale sia dal punto di vista

fisiopatologico sia clinico-terapeutico. Secondo la classificazione proposta dalla ILAE, tale distinzione si basa principalmente sull'origine e sulla propagazione iniziale della crisi epilettica (Scheffer *et al.*, 2017): Infatti, le **epilessie focali** sono caratterizzate dall'insorgenza della crisi in una zona circoscritta del cervello e le manifestazioni cliniche dipendono strettamente dall'area coinvolta, includendo sintomi motori, sensitivi, autonomici o psichici. La coscienza può essere preservata o compromessa, riflettendo il grado di coinvolgimento delle reti corticali e sottocorticali responsabili dello stato di vigilanza. In alcuni casi, la scarica epilettica può propagarsi secondariamente a strutture bilaterali, dando luogo a una crisi tonico-clonica bilaterale (Fisher *et al.*, 2017).

Le **epilessie generalizzate**, al contrario, sono definite da un esordio che coinvolge simultaneamente entrambi gli emisferi cerebrali: questo spiega la perdita di coscienza immediata che caratterizza tali crisi. Le manifestazioni cliniche sono tipicamente bilaterali e simmetriche e comprendono crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi di assenza, crisi miocloniche e crisi atoniche. A differenza delle epilessie focali, nelle forme generalizzate non è identificabile un singolo focus epilettogeno, ma piuttosto una disfunzione di reti neuronali distribuite (Berg *et al.*, 2010).

Tenendo conto di quanto detto finora, si può capire che l'epilessia è una patologia ancora non del tutto compresa e soprattutto difficile da diagnosticare, anche a causa della sua complessa eziologia che include: infezioni, neoplasie, traumi cranici o difetti genetici. Tuttavia, una diagnosi accurata dello specifico tipo di epilessia in ciascun paziente è di fondamentale importanza per stabilire una terapia adeguata a tale scopo l'ILAE ha stilato una classificazione dei tipi epilettici che sono riassunti nella Tabella 1:

Tabella 1. **Classificazione e definizione ILAE (2014) delle sindromi epilettiche.**

	Focali	Focali e/o Generalizzate	Generalizzate	Sindromi con Encefalopatia Epilettica e di Sviluppo (DEE) o con deterioramento neurologico progressivo
Sindromi epilettiche a esordio in età neonatale e nella prima infanzia	Epilessia neonatale familiare autolimitante Epilessia infantile familiare autolimitante Epilessia Neonatale-Infantile (familiare) autolimitante	Epilessia genetica con convulsioni febbrili plus	Epilessia mioclonica dell'infanzia	DEE infantile precoce Epilessia dell'infanzia con crisi focali migranti Sindrome degli spasmi epilettici infantili Sindrome di Dravet DEE con eziologie specifiche DEE-KCNQ2 DEE-Piridossina/P5P dipendente DEE-CDKL5 Epilessia con crisi in cluster - PCDH19 DEE-GLUT1 Sindrome di Sturge-Weber Crisi Gelastiche associate ad Amartoma Ipotalamico

Sindromi epilettiche a esordio nell'infanzia	Epilessie focali autolimitanti Epilessia autolimitante con Punta Centro-Temporali Epilessia autolimitante con Crisi Autonomiche Epilessia occipitale dell'Infanzia con sintomi visivi Epilessia fotosensibile del lobo occipitale	Epilessia Fotosensibile del Lobo Occipitale	Epilessia con assenze miocloniche Epilessia con mioclonie palpebrali (Eyelid Myoclonia)	Epilessia con crisi mioclono- atoniche Sindrome di Lennox-Gastaut DEE con Punta-Onda attivate nel sonno Sindrome Epilettica Correlata ad Infezione Febbrile (FIRES) Emiconvulsione-Emiplegia-Epilessia (HHE)
Sindromi epilettiche a esordio negli adolescenti, negli adulti, e in età variabile	Epilessia temporale mesiale associata a sclerosi dell'ippocampo Epilessia temporale mesiale familiare Epilessia ipermotoria sonno-corelata Epilessia familiare focale a foci variabili Epilessia con sintomi uditivi	Epilessia con Crisi indotte dalla Lettura	/	Sindrome di Rasmussen Epilessie miocloniche progressive

Epilessie Generalizzate Idiopatiche	/	/	Epilessia con assenze dell'Infanzia Epilessia con assenze dell'eta' giovanile Epilessia mioclonica giovanile Epilessia con sole crisi generalizzate tonico-cloniche	/
---	----------	----------	--	----------

Come anzidetto, tra le cause che portano a sindromi epilettiche ci sono quelle genetiche, ovvero mutazioni in geni che codificano ad esempio per canali ionici oppure per altri trasportatori o proteine strutturali neuronali (*Wei et al., 2017*), che rappresentano ~ 30% delle sindromi epilettiche; è importante sottolineare che tale percentuale è probabilmente sottostimata poiché molte forme epilettiche considerate in passato idiopatiche mostrano oggi una chiara componente genetica (*Gobbi et al., 2014*): infatti, l'uso di nuove tecniche di sequenziamento del DNA ha ampliato in modo significativo l'elenco dei geni implicati nell'insorgenza di diverse sindromi epilettiche e ha mostrato come molte forme diverse di epilessia abbiano una base genetica complessa e talvolta poligenica (*Gobbi et al., 2014*). La presenza di tali mutazioni è stata associata alle Encefalopatie Epilettiche e dello Sviluppo (*Developmental and Epileptic Encephalopathies*, DEE), forme severe e farmacoresistenti di epilessia ad esordio precoce. I bambini affetti da DEE mostrano un'abbondante attività epilettica, spesso con il concomitante rallentamento o regressione dello sviluppo cognitivo; talvolta, si associano anche disturbi psichiatrici e comportamentali come quelli appartenenti allo spettro dell'autismo (*Weiss et al., 2003*). Cause genetiche per le DEE sono state riconosciute per la prima volta nel 2001 quando *Claes e coll.* pubblicarono uno studio in cui sette bambini affetti da sindrome di Dravet mostravano mutazioni *de novo* in eterozigosi nel gene SCN1A, codificante per canali del Na⁺. La maggior parte delle mutazioni a carico di geni associati alle DEE risultano essere *de novo*, verificandosi pertanto direttamente nei gameti o durante l'embriogenesi (*Vadlamudi et al., 2010*). Una spiegazione molecolare che chiarirebbe la presenza di fenotipi epilettici in famiglie in cui i genitori non presentano sindromi epilettiche è quella del mosaicismo parentale, ovvero la presenza

di due linee cellulari nei genitori: una portatrice dell'allele mutato ed una dell'allele sano, per cui uno dei genitori potrebbe presentare mosaicismo gonadico, in cui la mutazione è confinata all'interno degli ovuli o degli spermatozoi. Il mosaicismo somatico si verifica invece durante l'embriogenesi, dando vita a cellule mutate che possono essere confinate all'interno di un organo, un tessuto o una linea cellulare specifica. La presenza del mosaicismo potrebbe non essere rilevata dalle analisi di routine del paziente quando i livelli di allele mutato sono troppo bassi (Poduri et al., 2013).

Negli anni, una quota sempre più significativa di geni associati alle DEE, sono stati ricondotti a quelli codificanti per canali del K^+ , sottolineando il ruolo cruciale di questi canali nel controllo dell'eccitabilità neuronale (Jan & Jan, 2012; Niday & Tzingounis, 2018). I canali del K^+ coinvolti nelle epilessie appartengono prevalentemente alle famiglie dei canali voltaggio-dipendenti (Kv), dei canali attivati dal sodio (K_{Na}) e dei canali attivati dal calcio (BK). Alterazioni della loro funzione possono determinare uno squilibrio tra eccitazione e inibizione neuronale, favorendo l'insorgenza di crisi epilettiche e il deterioramento del neurosviluppo (Oyler et al., 2017). All'interno delle DEE si osserva una vasta eterogeneità fenotipica anche in pazienti portatori di mutazioni sullo stesso gene; questo può dipendere da diversi fattori, quali: localizzazione e tempistica della mutazione durante lo sviluppo, tempistica e localizzazione dell'espressione genica e fattori epigenetici. Ad esempio, mutazioni nel gene KCNQ2, codificante per il canale del K^+ voltaggio-dipendente Kv7.2, sono associate nell'80% dei casi (Singh et al., 1998) a Convulsioni Benigne Familiari Neonatali (note come BFNE), in cui i bambini presentano una serie di crisi epilettiche nei primi giorni dopo la nascita, andando poi incontro ad una risoluzione spontanea delle crisi senza esiti neurocognitivi. Al contrario, altre mutazioni in KCNQ2 sono associate a fenotipi ben più gravi come le Encefalopatie Epilettiche Neonatali, caratterizzate da crisi toniche, grave ritardo dello sviluppo e spesso sindrome di Ohtahara (SO, Nappi et al., 2020). Un altro esempio simile è rappresentato dalle mutazioni *de novo* riscontrate nel canale KCNT1, che portano, nel 50% dei casi, ad una forma severa e generalmente farmacoresistente di DEE denominata “*Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures*” (EIMFS), oppure ad “*Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy*” (ADNFLE), una forma di epilessia familiare più benigna, con trasmissione autosomico-dominante, caratterizzata da brevi e ricorrenti crisi epilettiche nel lobo frontale che si presentano durante il sonno. Più raramente, mutazioni in KCNT1 possono portare alla SO o alla sindrome di West (SW, Møller et al., 2015). Oltre a KCNQ2 e KCNT1, numerosi altri canali del potassio sono stati associati a epilessie genetiche e DEE, come ad esempio mutazioni nel gene KCNA2, che codifica per il canale Kv1.2, sono responsabili di Encefalopatie Epilettiche caratterizzate da esordio infantile, crisi multiple, atassia e disabilità intellettiva (Syrbe et al., 2015).

Anche il gene KCNB1, codificante per il canale Kv2.1, è stato associato a DEE con crisi farmacoresistenti, ritardo cognitivo e disturbi comportamentali, inclusi tratti dello spettro autistico (Bar *et al.*, 2020). Inoltre, mutazioni nel gene KCNC1, che codifica per il canale Kv3.1, espresso principalmente nei neuroni a scarica rapida, sono state identificate in pazienti con epilessie rare e disordini del movimento, in particolare nelle progressive myoclonus epilepsies (PME), un gruppo di encefalopatie caratterizzate da mioclonie, crisi tonico-cloniche e atassia (Muona *et al.*, 2015). Invece, mutazioni *de novo* in KCNH1, che codifica per il canale del potassio Kv10.1 noto anche come *ether-à-go-go-related gene 1* (EAG1), sono state inizialmente identificate in pazienti con Temple-Baraitser syndrome (TBS) e Zimmermann-Laband syndrome (ZLS), due sindromi multisistemiche caratterizzate da ritardo cognitivo, anomalie scheletriche e oniciche, ipertricosi e, frequentemente, epilessia (Simons *et al.*, 2015; Kortum *et al.*, 2015); altre mutazioni in tale canale sono state riscontrate anche in pazienti che presentavano epilessia e ritardo dello sviluppo ma non erano affetti da TBS o ZLS (Fukai *et al.*, 2016). Più raramente, mutazioni in KCNJ10, che codifica per il canale Kir4.1 espresso principalmente nelle cellule gliali, sono state associate a epilessia nell'ambito della sindrome EAST/SeSAME, caratterizzata da epilessia, atassia, sordità neurosensoriale e tubulopatia renale (Reichold *et al.*, 2010). Infine, mutazioni nel gene KCNMA1, che codifica per il canale BK attivato dal calcio e dal voltaggio, sono state descritte in associazione a epilessia con encefalopatia e a disturbi del movimento parossistici (Bailey *et al.*, 2019).

Inoltre, in alcuni casi, si può osservare l'evoluzione da una specifica sindrome epilettica ad un'altra: ad esempio, questo fenomeno è stato osservato in alcuni pazienti affetti dalla Sindrome di Lennox-Gastaut (LGS), che non è ancora stata associata univocamente ad uno specifico gene; tali pazienti, prima di manifestare i sintomi della LGS, mostravano i tipici sintomi della SW, caratterizzata da un esordio tra i 4 e gli 8 mesi di vita, spasmi tonici e regressione psicomotoria e associata a mutazioni in diversi geni (CDKL5, FOXG1, SPTAN1, PNKP, ST3GAL3, MAGI1, STXBP1 e PLC β 1). Questa sindrome a sua volta può rappresentare l'evoluzione della SO per la quale sono stati identificati diversi geni, alcuni dei quali comuni alla SW (ad esempio CDKL5 e STXBP1) e caratterizzata da brevi crisi che possono presentarsi sia durante il sonno che in veglia, deterioramento psicomotorio e farmacoresistenza (Gobbi *et al.*, 2014). Per contro, mutazioni in differenti geni possono portare allo stesso fenotipo epilettico: questo potrebbe essere spiegato dal fatto che i prodotti di diversi geni possono intervenire nelle stesse vie fisiologiche in un'età comune, per cui convergono nello stesso fenotipo (Paciorkowski *et al.*, 2011).

Si può quindi affermare che ad oggi il meccanismo con cui mutazioni in alcuni geni possono portare a disturbi epilettici è ancora sconosciuto. Dal punto di vista clinico è molto importante caratterizzare

il tipo di mutazione in un soggetto con DEE, al fine di migliorare potenzialmente l'approccio terapeutico.

1.5 Caratteristiche strutturali e meccanismi di regolazione dei canali KCNT1

Tra i diversi canali del K^+ associati a patologie epilettiche rientrano i canali KCNT1 o Slack (“*Sequence Like A Calcium-activated K^+ channel*”) codificati da un gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 9 (9q34.3; *Barcia et al., 2012*). Tali canali hanno la tipica organizzazione strutturale dei canali del K^+ voltaggio-dipendenti, con quattro subunità α , ciascuna delle quali è composta da sei segmenti transmembrana, in cui i segmenti da S_1 a S_4 formano il VSD, mentre i segmenti S_5 e S_6 formano il poro. Nella conformazione tetramericata le sezioni del poro di ciascuna subunità α si posizionano verso il centro, mentre i restanti segmenti si posizionano verso l'esterno. Tuttavia, data l'assenza di residui di arginina a livello del segmento S_4 , i canali KCNT1 risultano essere solo debolmente voltaggio-dipendenti (*Zhang et al., 2023*). I domini N- e C-terminali sono entrambi citosolici ed a livello del C-terminale sono situati due domini, detti **RCK1** e **RCK2** (*Regulators of K^+ Conductance domains*) che rendono il canale sensibile a variazioni intracellulari delle concentrazioni di Na^+ (*Zhang et al., 2010*; Figura 7).

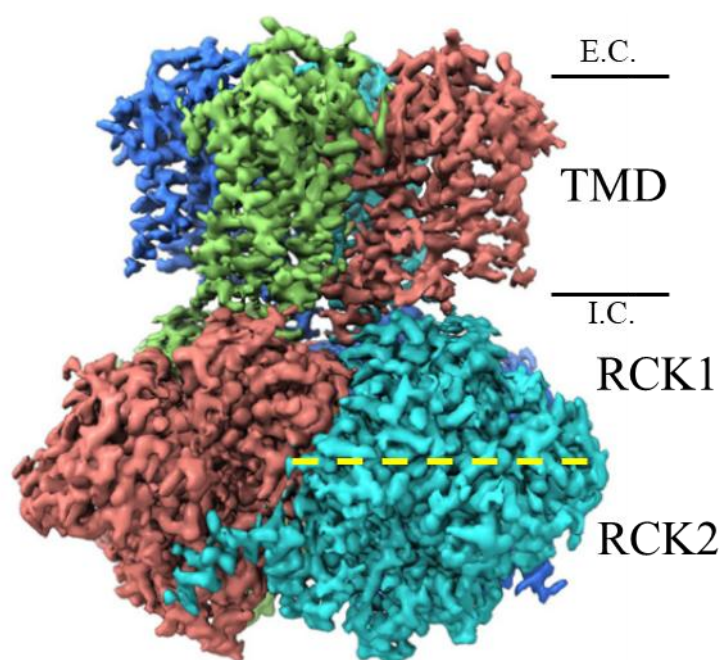


Figura 7. Struttura cristallografica della subunità KCNT1. Le quattro subunità sono rappresentate in diversi colori, E.C. indica il versante extracellulare, I.C. indica il versante intracellulare, TMD indica il dominio transmembrana del canale, mentre i domini RCK1 e RCK2 sono separati dalla linea gialla tratteggiata.

È da sottolineare che i livelli intracellulari di Na^+ nei neuroni a riposo variano da ~ 4 mM fino a 15 mM; in seguito a stimolazioni ad alta frequenza, questa concentrazione può aumentare fisiologicamente fino a ~ 100 mM (*Bhattacharjee et al., 2005*); inoltre, durante eventi di ischemia o ipossia, la concentrazione di Na^+ aumenta enormemente portando ad una maggiore attivazione di tali canali, che sembrerebbero avere quindi anche un ruolo protettivo in condizioni ischemiche o ipossiche, limitando l'attività elettrica (*Yuan et al., 2003*). Da uno studio di *Tamsett e coll. (2009)* è emerso che i canali KCNT1 posseggono un sito di legame per il NAD^+ al C-terminale: tale cofattore è in grado di attivare questi canali in presenza di Na^+ , in particolare aumentando l'affinità per tale ione e riducendo quindi la concentrazione intracellulare di Na^+ necessaria per l'attivazione. La famiglia di geni SLO codifica anche per un altro canale voltaggio-dipendente, denominato KCNT2 o Slick ("*Sequence Like An Intermediate Conductance K^+ channel*") che condivide un'alta omologia di sequenza con le subunità KCNT1; il gene che codifica per tale canale è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q32.1; *Bhattacharjee et al., 2003*). KCNT2 si differenzia dall'omologo per la presenza di un sito di legame per l'ATP al C-terminale e per una maggiore sensibilità agli ioni Cl^- . È stato dimostrato che alcune isoforme di questi due membri della famiglia di geni SLO si assemblano a formare dei canali eterotetramERICI (*Chen et al., 2009*): infatti, KCNT1 risulta essere molto abbondante nel bulbo olfattivo, nel mesencefalo e nel tronco encefalico (*Bhattacharjee et al., 2002*), mentre KCNT2 sembra principalmente distribuito a livello delle isole di Calleja, dell'amigdala, nell'ippocampo e nell'ipotalamo. Tuttavia, tali canali mostrano un'ampia sovrapposizione nel bulbo olfattivo, nell'organo subfornicale, nella substantia nigra, nei nuclei oculomotori, nei nuclei interpeduncolari e rabdoidi, nel nucleo del corpo trapezoide, nel nucleo reticolo-tegmentale e nel nucleo inferiore del corpo trapezoide (*Rizzi et al., 2016*). Entrambi i canali KCNT contribuiscono a complesse funzioni neuronali, come la regolazione del rilascio di neurotrasmettitori o il controllo dell'eccitabilità neuronale. In conseguenza all'uso di promotori diversi, sono note diverse isoforme del canale KCNT1 (denominate A, Ax2, B, Bx2 e M), inizialmente identificate nel ratto, tutte altamente espresse nel SNC, che differiscono principalmente a livello della porzione N-terminale; tra tutte l'isoforma A è quella in cui l'N-terminale è più corta e che mostra un maggiore grado di identità con il canale KCNT2 in questa regione ($\sim 78\%$). Tali differenze incidono sulla distribuzione dei canali nel SNC del ratto: le isoforme Slack-Ax2, Slack-B e Slack-Bx2 sono più abbondanti nel tronco encefalico e nel bulbo olfattivo rispetto alla corteccia e all'ippocampo. Inoltre, le isoforme A e B mostrano cinetiche di attivazione differenti: l'isoforma A è quella che mostra una cinetica più simile a KCNT2, con un'attivazione rapida ed una componente lenta minima o quasi assente, mentre l'isoforma B mostra una componente rapida seguita da una componente più lenta tempo-dipendente; le due isoforme non mostrano differenze nella voltaggio-dipendenza dell'attivazione. Da registrazioni

su singolo canale è emerso che l'isoforma A mostra degli stati di subconduttanza più frequenti rispetto alla B e che quest'ultima, invece, mostra una probabilità di apertura circa 6 volte maggiore rispetto alla A, dovuta ad una propensione maggiore a rimanere più a lungo nello stato completamente aperto. Le differenze osservate per queste due isoforme si rispecchiano anche sulla loro funzione durante il *firing* neuronale: infatti, l'isoforma A sembrerebbe limitare l'attività prolungata dei neuroni favorendo risposte brevi e transitorie, mentre l'isoforma B mantiene il *firing* ritmico e regolare modulando la frequenza di scarica (*Brown et al., 2008*). Inoltre, le differenze strutturali associate al dominio N-terminale di KCNT1 hanno un impatto rilevante sull'assemblaggio e sul traffico di tali canali, infatti, è stato dimostrato che il dominio N-terminale di KCNT1, nello specifico una sequenza di ~50 amminoacidi, è essenziale per la formazione di canali KCNT1/KCNT2 e per il loro corretto targeting alla membrana plasmatica; tale dato è confermato dalle registrazioni elettrofisiologiche in cui emerge che mutanti KCNT1 con N-terminale troncato elicitano correnti significativamente minori rispetto ai canali wild-type (*Chen et al., 2009*). Per quanto riguarda la variante umana di KCNT1, attualmente sono predette o identificate diverse isoforme (*Zhang et al., 2021*; GenBank), generate dall'uso di esoni iniziali alternativi, che differiscono anch'esse nella lunghezza della regione N-terminale; tuttavia, una caratterizzazione funzionale di tali isoforme non è ancora disponibile. La maggior parte degli studi funzionali sulle mutazioni patogenetiche di KCNT1 umano utilizza una singola isoforma di riferimento, generalmente corrispondente alla forma lunga canonica, senza distinguere tra isoforme N-terminali alternative. Di conseguenza, rimane attualmente non chiarito se le differenze isoforma-specifiche osservate nel ratto siano pienamente conservate anche nell'uomo, rappresentando un aspetto ancora aperto e rilevante per la comprensione fisiopatologica delle epilessie KCNT1-correlate. Nel presente studio, è stata utilizzata l'isoforma A umana di tale canale che mostra un'alta corrispondenza di sequenza con l'isoforma A di ratto, tuttavia le nostre registrazioni di elettrofisiologia hanno mostrato delle cinetiche più simili alla isoforma B di ratto.

Tra le molecole che possono influenzare l'attività dei canali KCNT1 c'è la proteina FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) la cui assenza determina la sindrome dell'X fragile, la più nota causa di disabilità intellettiva (*McLennan et al., 2011*). La sua funzione è quella di regolare la traduzione di numerosi mRNA neuronali, inibendo la sintesi proteica grazie all'attivazione del fattore di iniziazione eIF4E, mediata dal complesso FMRP/CYFIP: questa interazione sopprime l'inizio della sintesi proteica. *Brown e coll. (2010)* hanno dimostrato che FMRP lega il dominio C-terminale dei canali KCNT1, promuovendone l'attivazione: in accordo, mutazioni al C-terminale che aumentano la funzionalità del canale come la variante R474H o la stimolazione farmacologica dei canali wild-type, sia in linee cellulari che in neuroni, innesca la traslocazione del complesso FMRP/CYFIP dal fattore eIF4E al canale, causando un aumento della sintesi proteica (*Malone et al., 2024*).

Anche cambiamenti dello stato di fosforilazione possono modificare l'attività dei canali KCNT1, che sembrano essere regolati principalmente dall'attività della Proteina Chinasi C (PKC) attraverso la fosforilazione del residuo S407 localizzato nel dominio C-terminale del canale. È stato dimostrato, infatti, che trattando oociti di *Xenopus laevis* esprimenti i canali KCNT1 o KCNT2 con PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), noto attivatore della PKC, si osserva un sostanziale aumento delle correnti espresse dai canali KCNT1, mentre si osserva un blocco di quelle KCNT2-mediate, indicando che entrambi i canali possono essere co-espressi con recettori accoppiati a proteine G negli stessi tessuti a livello nel SNC e che la loro attività è modulata dagli stessi segnali intracellulari. Per confermare l'accoppiamento funzionale tra i canali KCNT e i recettori accoppiati a proteine G, entrambi i canali sono stati co-espressi con il recettore muscarinico M1 in oociti ed in seguito ad applicazione di Oxotremorina-M (noto agonista dei recettori M1) è stato osservato il blocco delle correnti espresse da KCNT2 ed un aumento di quelle espresse da KCNT1; questo avviene poiché l'attivazione del recettore muscarinico M1, essendo accoppiato a proteina Gq, induce una deplezione di PIP₂ in seguito alla stimolazione dell'enzima fosfolipasi C (PLC), che lo idrolizza in diacilglicerolo (DAG) e inositol trifosfato (IP₃; *Santi et al., 2006*). Analogamente, *De los Angeles Tejada e coll. (2012)* hanno dimostrato che i canali KCNT1 e KCNT2 sono regolati positivamente dal PIP₂: infatti, quando tale lipide veniva aggiunto in pipetta nelle soluzioni usate per registrare le correnti espresse dai canali KCNT1 o KCNT2 in oociti di *Xenopus laevis*, queste risultavano potenziate, in conseguenza, come confermato dalle registrazioni su singolo canale, ad un aumento della probabilità di apertura dei canali in presenza di PIP₂, con una maggiore sensibilità di KCNT1 rispetto a KCNT2. Sembrerebbe inoltre, che il PIP₂ diminuisca la concentrazione di Na⁺ necessaria ad attivare KCNT1. In questo lavoro è stato comprovato che la sensibilità di entrambi i canali è dovuta all'interazione del PIP₂ con il dominio C-terminale: infatti, in presenza delle varianti KCNT1-R337A o K339A si osservava una riduzione della sensibilità al PIP₂.

Il dominio C-terminale di KCNT1 sembra essere coinvolto anche nel legame con la fosfatasi Phactr1 (*Phosphatase and Actin Regulator 1*; *Fleming et al., 2016*), una proteina chiave nella regolazione dell'attività e della morfologia sinaptica che agisce regolando la *protein phosphatase 1* (PP1) e l'actina attraverso un meccanismo a doppio interruttore, ovvero: quando la G-actina è legata attraverso specifici domini a Phactr1, PP1 non è in grado di legarsi per cui non si ha azione fosfatase; quando la G-actina si assembla ad F-actina, i siti di legame vengono liberati permettendo il legame di PP1 ed il complesso Phactr1/PP1 è quindi in grado di defosforilare specifici substrati (*Allen et al., 2004*; *Wiezlak et al., 2012*). La proteina Phactr1 lega PP1 e l'actina al canale KCNT1, riducendo le correnti espresse dal canale; inoltre, è stato visto che, mutando il residuo S407 in un'alanina, il canale

diventa insensibile all'azione di Phactr1, confermando che questo rappresenta un residuo chiave per la regolazione dell'attività di KCNT1 (*Ali et al., 2020*).

1.5.1 Fisiopatologia dei canali KCNT

Mutazioni nei geni codificanti per i canali KCNT1 e KCNT2, sono state associate a diversi disordini epilettici: in particolare, numerose mutazioni sono state riscontrate nel canale KCNT1 in pazienti affetti da ADNFLE (*Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy*; Heron et al., 2012), una forma di epilessia focale in cui i pazienti sperimentano violente crisi motorie nel sonno. Questa forma di epilessia era stata dapprima associata a mutazioni nei geni che codificano per subunità del recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChR, De Fusco et al., 2000) e successivamente Heron e coll. (2012) hanno riscontrato ADNFLE in pazienti portatori di mutazioni in KCNT1, osservando fenotipi più gravi in tali pazienti, che includevano una precoce insorgenza, una maggiore frequenza di crisi ed una marcata frequenza di disabilità intellettiva accompagnata da comorbidità psichiatriche. Mutazioni in KCNT1 sono state anche associate a MMPSI (*Malignant Migrating Partial Seizures of Infancy*; Barcia et al., 2013) oggi definita EIMFS (*Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures*), una forma precoce di encefalopatia epilettica caratterizzata da crisi multifocali migranti con esordio intorno ai 6 mesi di vita, questi pazienti presentano anche un ritardo dello sviluppo psicomotorio e risultano spesso farmacoresistenti ai farmaci antiepilettici (Coppola et al., 1995). Mutazioni in KCNT1 sono state anche riscontrate in pazienti con altre forme di epilessie come: sindrome di Ohtahara, leucoencefalopatia (Martin et al., 2014), sindrome di West (Ohba et al., 2015) ed epilessia multifocale (Mikati et al., 2015), indicando che lo spettro fenotipico di pazienti con epilessie KCNT1-correlate è ampio e diversificato e non è possibile ad oggi delineare chiare correlazioni genotipo-fenotipo. Le varianti sino ad oggi caratterizzate nei canali KCNT1 hanno mostrato tutti effetti di guadagno di funzione (*Gain of Function*, GoF; Duan et al., 2025), ossia un aumento della funzionalità del canale in termini di aumento della densità massima di corrente, spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più negativi, cinetiche di attivazione più rapide e/o cinetiche di deattivazione più lente. Analogamente, varianti patologiche del canale omologo KCNT2, sono state identificate come causa di DEE. Studi recenti hanno dimostrato che pazienti con mutazioni *de novo* in KCNT2 presentano DEE, identificando un ampio spettro fenotipico caratterizzato da disabilità intellettiva di grado variabile, ritardo dello sviluppo psicomotorio, epilessia infantile e alterazioni neurologiche associate, fenotipi compatibili con EIMFS e sindrome di West. Inoltre, alcuni pazienti presentavano dismorfismi facciali e altre anomalie sistemiche (Ambrosino et al., 2018; Gong et al., 2021; Cioclu et al., 2023). Contrariamente a quanto osservato per le varianti identificate nei canali KCNT1, le varianti sinora caratterizzate riscontrate nei canali KCNT2 inducono nel 50% dei casi effetti GoF e nell'altro 50% effetti di perdita di funzione (*Loss of Function*, LoF; Cioclu et al., 2023), ossia una riduzione della funzionalità del canale in termini di ridotta densità massima di

corrente, spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più positivi, rallentamento della cinetica di attivazione e/o accelerazione della deattivazione.

Queste evidenze ampliano il quadro dei disordini correlati ad entrambi i canali , indicando che sia KCNT1 sia KCNT2 rappresentano geni chiave nella patogenesi di encefalopatie epilettiche infantili, con fenotipi che comprendono crisi epilettiche precoci, ritardo dello sviluppo e disabilità intellettiva, e sottolineano l'importanza di valutare sia le caratteristiche molecolari delle varianti sia il loro effetto funzionale per prevedere la gravità clinica e le potenziali strategie terapeutiche.

1.5.2 Farmacologia dei canali KCNT1

L'elevata farmacoresistenza ai comuni antiepilettici manifestata dai pazienti portatori di varianti dei geni KCNT1 o KCNT2 rende l'individuazione di modulatori specifici per questi canali un'importante urgenza clinica. Come detto, mentre la quasi totalità delle varianti identificate in KCNT1 mostrano effetti GoF, quelle ad oggi identificate nei canali KCNT2 sono equamente distribuite tra varianti che inducono effetti GoF e varianti che inducono effetti LoF; rendendo pertanto necessario identificare sia farmaci attivatori di correnti KCNT-mediate (potenzialmente utili nel trattamento di pazienti portatori di varianti LoF), che di bloccanti (potenzialmente utili per pazienti portatori di varianti GoF). Tra gli attivatori ad oggi noti di tali canali (Figura 8A), ricordiamo:

- il farmaco antipsicotico **loxapina** e i suoi derivati, verso i quali, la loxapina mostra una potenza superiore. In un lavoro recente a cui ha collaborato anche il laboratorio in cui ho svolto il mio Progetto di Ricerca, la loxapina si è dimostrata efficace nel revertire gli effetti LoF di varianti riscontrate nel canale KCNT2 in pazienti con DEE, mentre, inaspettatamente, ha inibito le correnti espresse dai canali incorporanti altre varianti LoF (*Cioclu et al., 2023*), suggerendo la necessità di testare gli effetti in vitro di tale farmaco su ogni variante prima di valutarne l'uso clinico nei pazienti portatori di varianti LoF in KCNT2;
- il farmaco antelmintico **niclosamide**, in grado di attivare i canali KCNT2 in maniera dose-dipendente ($EC_{50} \sim 2.9 \mu M$; *Biton et al., 2012*);
- il farmaco **riluzolo**, utilizzato nel trattamento della SLA (*Biton et al., 2012*), che quando testato su varianti LoF in KCNT2, ha dimostrato, come la loxapina, attività mutazione-specifica, attivando le correnti espresse da canali esprimenti alcune varianti LoF e bloccandone altre (*Cioclu et al., 2023*). Pertanto, anche il possibile uso clinico di questo farmaco deve essere valutato caso per caso;
- il farmaco **acido niflumico**, un fenamato che è in grado di attivare le correnti dei canali KCNT2 anche in assenza di Na^+ , anche se sono necessarie concentrazioni relativamente alte ($EC_{50} \approx 1.4 mM$; *Dai et al., 2010*);
- il farmaco antiparassitario **biotinolo**, che ha mostrato effetti attivatori sulle correnti espresse dai canali KCNT1 a concentrazioni comprese tra 10 e 100 μM (*Yang et al., 2006*).

Tra i bloccanti noti sulle correnti mediate dai canali KCNT (Figura 8B) ricordiamo:

- il farmaco antiaritmico **chinidina**, ampiamente riportato in letteratura come inibitore dei canali KCNT1, anche in presenza di varianti con effetti GoF (*Nicholson et al., 2018*; *Yang et al., 2020*). Sulla base di tali evidenze *in vitro*, la chinidina è stata proposta come prima strategia di medicina di precisione per le epilessie correlate a KCNT1 (*Bearden et al., 2014*);

- il farmaco antiaritmico **bepridil**, emerso come un'alternativa promettente alla chinidina, avendo dimostrato una maggiore potenza inibitoria (Yang *et al.*, 2006). Studi *in vitro* condotti da Rizzo *e coll.* (2016) sulle varianti GoF KCNT1-G288S e M516V, riscontrate in pazienti epilettici, hanno confermato la capacità del bepridil di bloccare le correnti dei canali wild-type e mutanti, con un effetto maggiore sui canali mutanti rispetto ai wild-type;
- il farmaco **clofilium**, un ulteriore antiaritmico che è stato identificato come un efficace inibitore dei canali KCNT1 e dell'omologo KCNT2, sebbene con una potenza sovrapponibile a quella della chinidina (de los Angeles Tejada *et al.*, 2012);
- il farmaco β -bloccante **carvedilolo**, ampiamente utilizzato per patologie del sistema cardiovascolare per le sue azioni antagoniste sia sui recettori β -adrenergici (β_1 e β_2) che α_1 -adrenergici, determinando riduzione della frequenza cardiaca e della contrattilità miocardica e vasodilatazione periferica. Uno studio pubblicato nel 2024 ha identificato il carvedilolo come modulatore farmacologico del canale KCNT1: in questo studio tale farmaco si è dimostrato in grado di revertire gli effetti di guadagno di funzione indotti dalla variante M267T, sia in modelli di espressione eterologa (in oociti di *Xenopus laevis* o cellule HEK293T), sia in neuroni ippocampali murini, mostrando una maggiore potenza rispetto alla chinidina. Inoltre, nel modello di epilessia indotta da kainato, il carvedilolo ha dimostrato effetti anticonvulsivanti, suggerendo un potenziale beneficio funzionale *in vivo* (Di *et al.*, 2024);
- il farmaco antidepressivo **fluoxetina** (FLX), appartenente alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) e in grado di inibire in maniera significativa correnti di canali del K^+ neuronali, quali quelle espresse dai canali KCNT1 (Mosca *et al.*, 2024; Trivisano *et al.*, 2025), KCNT2 (Cioclu *et al.*, 2023), ma anche Kv1.3 (Soldovieri *et al.*, 2023) e Kv3.1 (Ambrosino *et al.*, 2023);
- il farmaco **cannabidiolo** (CBD), un fitocannabinoide non psicoattivo derivato dalla pianta *Cannabis sativa* (Devinsky *et al.*, 2014; Devinsky *et al.*, 2017), ha dimostrato efficacia nell'inibire direttamente le correnti dei canali KCNT1 *in vitro*, con un IC_{50} di 5.6 μM nei canali wild-type e mostrando un'efficacia ancora maggiore sulle varianti GoF associate a epilessia R398Q e R928C ($IC_{50} \approx 0.4\text{--}0.5 \mu M$). L'effetto anticonvulsivante del CBD è stato confermato in un modello animale di *Drosophila* in cui l'espressione neuronale di varianti patogenetiche di KCNT1 induce un marcato fenotipo convulsivo: la somministrazione di CBD riduce significativamente la suscettibilità alle crisi, mentre farmaci antiepilettici tradizionali risultano inefficaci, suggerendo che l'inibizione delle correnti KCNT1-mediate da parte di tale farmaco costituisca un meccanismo anticonvulsivante rilevante *in vivo*. Questi

dati preclinici trovano riscontro anche in ambito clinico: nei pazienti con EIMFS portatori di varianti in KCNT1, il CBD ha determinato una risposta eterogenea, con alcuni soggetti che manifestavano una riduzione della frequenza o gravità delle crisi, mentre altri riportavano benefici limitati o assenti. Complessivamente, queste evidenze supportano il ruolo del CBD come modulatore specifico dei canali KCNT1 (*Hussain et al., 2024*).

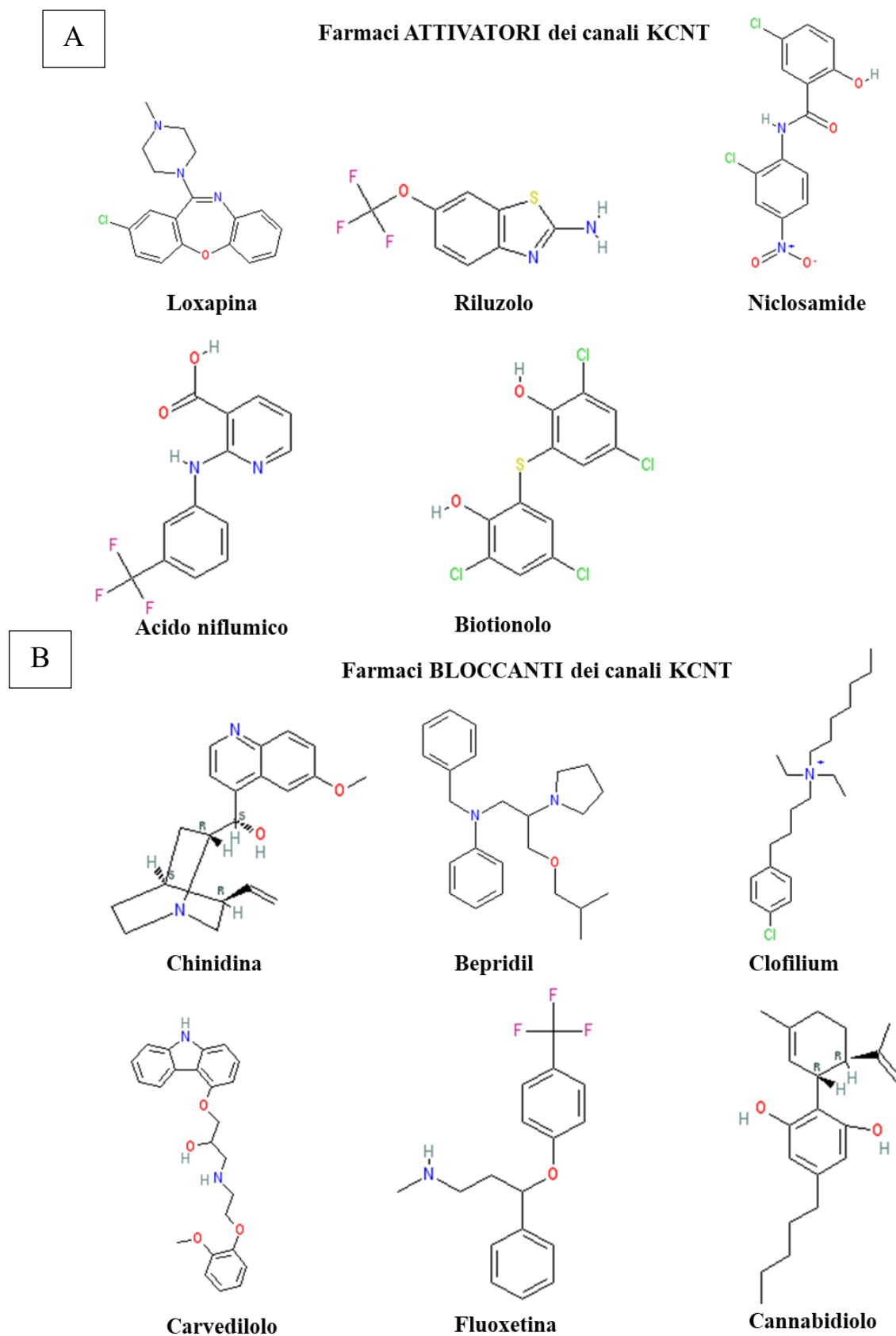


Figura 8. Strutture chimiche dei principali modulatori dei canali KCNT. La figura mostra i principali modulatori dell'attività dei canali KCNT1 suddivisi in: attivatori (A) e bloccanti (B) delle correnti espresse dai canali KCNT (<https://www.guidetopharmacology.org/>).

1.6 Caratteristiche strutturali e meccanismi di regolazione dei canali KCNB1

Un'altra classe di canali del K^+ voltaggio-dipendenti rilevante per patologie epilettiche (DEE) è rappresentata dai canali codificati dal gene KCNB1 (o Kv2.1; Figura 9), localizzato sul braccio lungo del cromosoma umano 20 (20q13.2; *Melis et al., 1994*). Questi canali presentano la classica struttura dei canali del K^+ a 6TM, con il VSD formato dai segmenti da S_1 a S_4 ed il poro formato dai segmenti S_5 ed S_6 . I domini N- e C- terminali sono entrambi citosolici (*Trimmer et al., 1991*). A livello dell'N-terminale è presente il *Tetramerization domain* (T1) che ha il ruolo di mediare le interazioni tra subunità della stessa sottofamiglia, nonché con enzimi cellulari che possono modificare la funzionalità e la localizzazione di tali canali. Inoltre, la presenza del dominio T1 consente ai canali KCNB1 di assemblarsi con subunità non elettricamente attive dette silenti (KvS: Kv5, Kv6, Kv8 e Kv9), ampiamente distribuite in tutto l'organismo compreso il SNC, con effetti sulla voltaggio-dipendenza di attivazione e inattivazione, sulle cinetiche di attivazione e inattivazione e ampiezza delle correnti espresse: questi meccanismi contribuiscono a modulare l'eccitabilità cellulare in modo specifico per tessuto o tipo cellulare. Tale modulazione può influenzare la finestra di attivazione dei canali, la durata del potenziale d'azione e la capacità delle cellule eccitabili di rispondere a stimoli ripetuti, implicazioni che sono rilevanti sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Ad esempio, Il complesso Kv2.1/Kv9.3 sposta la curva di attivazione verso valori più iperpolarizzati e aumenta la corrente in risposta a depolarizzazioni lievi, modulando l'eccitabilità dei neuroni corticali e talvolta la frequenza dei potenziali d'azione. Al contrario, il complesso Kv2.1/Kv6.4 riduce l'ampiezza massima della corrente e rallenta l'inattivazione, fornendo una sorta di “freno” alla scarica ripetitiva dei neuroni (*Bocksteins, 2016*).

A livello del C-terminale si trovano due domini: il *C-terminal activation domain* (CTA) che interagisce con T1 e partecipa alla formazione dei tetrameri (*Ju et al., 2003*), ed un motivo di circa 25 amminoacidi tipico della famiglia di canali Kv2 implicato nel *trafficking* proteico e nelle interazioni con il dominio T1 (*Lim et al., 2000; Jędrychowska et al., 2019*).

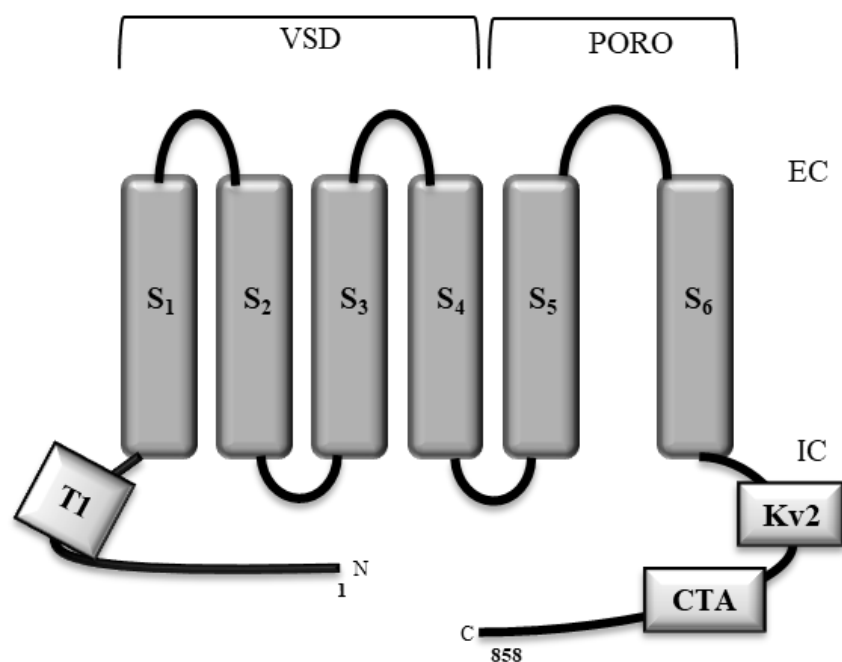


Figura 9. Rappresentazione topologica dei canali KCNB1. I box in grigio scuro rappresentano i sei domini transmembrana (S_1 - S_6), mentre quelli grigio chiaro rappresentano i domini N- e C-terminali ($T1$ = *Tetramerization domain*, $Kv2$ = motivo di 25 amminoacidi implicato nel *trafficking* proteico e CTA = *C-terminal activation domain*). EC ed IC rappresentano rispettivamente i versanti extracellulare ed intracellulare.

I canali KCNB1 conducono delle correnti rettificanti uscenti di K^+ e presentano tre stati: uno **stato chiuso**, in cui il poro è chiuso e gli ioni non attraversano la membrana; uno **stato aperto**, in cui il poro è aperto e permette l'efflusso di K^+ ; e uno **stato inattivo**, che rappresenta una condizione in cui il poro del canale è aperto ma non permette il passaggio di ioni. Questo stato inattivo è distinto dallo stato chiuso e rappresenta un riarrangiamento strutturale di specifiche regioni deputate al passaggio di ioni e al filtro di selettività. Nel caso di KCNB1, l'inattivazione è lenta ed appare come una progressiva diminuzione della corrente durante depolarizzazioni prolungate, con un recupero dello stato di inattivazione di tipo voltaggio-dipendente. L'inattivazione non avviene tramite un blocco sterico, ma è un riarrangiamento strutturale all'interno della regione poro che compromette la permeazione degli ioni K^+ pur non chiudendo completamente la via di conduzione (*Klemic et al., 1998*). Dal punto di vista molecolare, le transizioni tra questi stati sono dovute a cambiamenti conformazionali del **VSD** (segmento S_4) e del **poro** (segmenti S_5 - S_6). In KCNB1, la depolarizzazione di membrana induce lo spostamento dei segmenti S_4 verso l'esterno, favorendo l'allineamento dei segmenti S_5 - S_6 e l'apertura del poro; tuttavia, durante depolarizzazioni prolungate, si osserva un progressivo riarrangiamento del loop che collega il VSD al poro, portando a una condizione in cui il VSD resta attivo, ma il poro non è conduttivo. Studi funzionali e strutturali indicano che questo fenomeno deriva da un accoppiamento elettromeccanico tra il VSD ed il poro, che comporta un

riposizionamento delle eliche S₆, impedendo il mantenimento della permeabilità agli ioni (*Fernández-Mariño et al., 2023*). Nel sistema nervoso centrale, i cambiamenti conformazionali che regolano l'attivazione, la chiusura e soprattutto l'inattivazione lenta di KCNB1 svolgono una funzione fisiologica cruciale di controllo dell'eccitabilità neuronale (*Klemic et al., 1998*).

Tali canali, sono regolati da diversi meccanismi molecolari che modulano il loro *gating*, tra cui la disponibilità del fosfolipide PIP₂ e lo stato di fosforilazione/defosforilazione: *Delgado-Ramírez e coll.* (2018) hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di PIP₂, ottenuta sia tramite attivazione del recettore muscarinico M1 sia mediante un sistema indotto dalla rapamicina per reclutare una fosfatasi alla membrana, altera il *gating* di KCNB1: la deplezione del fosfolipide accelera l'inattivazione e rallenta il recupero, stabilizzando il canale in conformazioni inattive; l'effetto complessivo osservato è quindi una riduzione della corrente a potenziali fisiologici (*Delgado-Ramírez et al., 2018*).

I canali KCNB1 sono ampiamente espressi nel SNC, in particolare nei neuroni glutammatergici della corteccia e dell'ippocampo (Figura 10), dove giocano un ruolo critico nel controllo dell'eccitabilità neuronale e nella propagazione dei potenziali d'azione (*Trimmer, 2015*). Essi si organizzano in grandi cluster somato-dendritici dinamici (*Misonou et al., 2005*) che costituiscono veri microdomini funzionali, la cui formazione e stabilità dipendono dallo stato di fosforilazione del canale: in condizioni basali, KCNB1 è fortemente fosforilato su residui serina e treonina nella porzione C-terminale, condizione che favorisce la clusterizzazione e mantiene il canale chiuso a potenziali di riposo (*Misonou et al., 2004; O'Connell et al., 2006; Ikematsu et al., 2011*). In risposta a stimoli o in condizioni di stress, come depolarizzazioni prolungate o aumento del Ca²⁺ intracellulare, viene attivata la calcineurina, una fosfatasi Ca²⁺/calmodulina-dipendente, che induce la defosforilazione dei canali; tale processo provoca la declusterizzazione dei canali KCNB1 o spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più negativi. L'effetto funzionale complessivo è una maggiore corrente a voltaggi fisiologici, che contribuisce a stabilizzare il potenziale di membrana e a ridurre l'eccitabilità neuronale (*Park et al., 2006; Siddoway et al., 2014*). D'altro canto, meccanismi di fosforilazione, mediati da chinasi come l'AMPK, producono l'effetto opposto, favorendo il ritorno all'organizzazione in cluster ed il ripristino delle proprietà di *gating* tipiche delle condizioni di riposo (*Ikematsu et al., 2011*). In sintesi, l'attività di tali canali risulta essere regolata da un complesso equilibrio tra fosforilazione/defosforilazione, clusterizzazione/declusterizzazione e modulazione da PIP₂: mentre la defosforilazione e la declusterizzazione aumentano l'attività del canale, la deplezione di PIP₂ favorisce l'ingresso del canale in stati inattivi e riduce la corrente sostenuta, modulando finemente l'eccitabilità neuronale (*Delgado-Ramírez et al., 2018; Misonou et al., 2004; Park et al., 2006; Siddoway et al., 2014*).

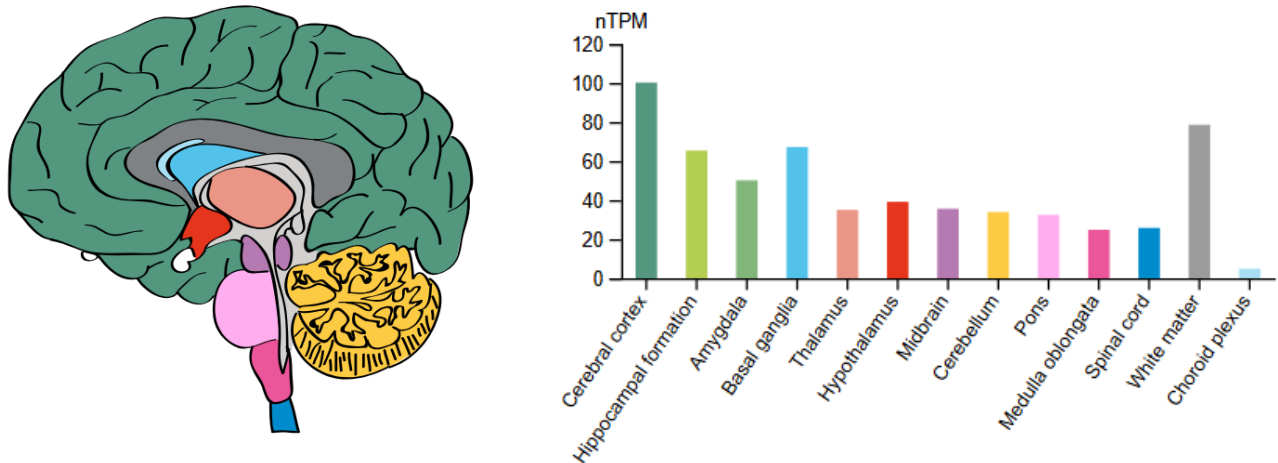


Figura 10. Livelli di espressione dei canali KCNB1 nel SNC. Il grafico a destra mostra i livelli di espressione dei canali KCNB1 nei vari compartimenti del SNC, espressi come *normalized tag per million* (nTPM), a sinistra una rappresentazione colorimetrica dei principali compartimenti riportati nel grafico (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000158445-KCNB1/brain>).

Inoltre, questo canale sembrerebbe avere un ruolo chiave nei processi di morte cellulare, rappresentando il principale canale del K^+ responsabile dell'efflusso di tale ione nelle cellule apoptotiche neuronali (Pal et al., 2003). Infine, KCNB1 è ampiamente espresso anche a livello delle cellule β del pancreas, in cui regola la secrezione di insulina (Roe et al., 1996): infatti, quando aumenta la concentrazione di glucosio in circolo, la quota di ATP intracellulare si innalza, il cambiamento della quota ATP/ADP causa la chiusura dei canali del K^+ ATP-dipendenti portando alla depolarizzazione della membrana e all'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , il quale innesca il rilascio di insulina. In seguito alla depolarizzazione, i canali KCNB1 si aprono determinando la ripolarizzazione di membrana e limitando così il rilascio di insulina (MacDonald et al., 2003). Da un lavoro di Zhang e coll. (2013) condotto sulla popolazione cinese, è emerso che alcuni polimorfismi riscontrati nel gene KCNB1 sono associati ad una ridotta sensibilità all'insulina, un aumento della concentrazione plasmatica di trigliceridi ed un aumento del rapporto tra circonferenza della vita e del bacino, indicando un aumento del rischio di manifestare il diabete di tipo II nei soggetti che presentano tali polimorfismi.

1.6.1 Fisiopatologia dei canali KCNB1

Anche mutazioni a carico di KCNB1 sono state associate ad Encefalopatie Epiletiche e dello Sviluppo (DEE; *Scheffer et al., 2017*). La maggior parte dei soggetti portatori di varianti in questo canale del K^+ presentano epilessia grave, spesso farmacoresistente (con un'età media d' insorgenza di 10 mesi), ritardo dello sviluppo che precede le crisi epiletiche per lo più legato alla branca del linguaggio, difficoltà motorie, problemi comportamentali (quali disordini dello spettro dell'autismo, iperattività o aggressività). Inoltre, da quanto riportato in letteratura, emerge che varianti missenso associate a fenotipi severi risultano localizzate nel VSD e nel poro del canale, mentre fenotipi più lievi sono associati a varianti tronche localizzate al C-terminale. Ad ogni modo, ad oggi non è stato possibile trarre un'esatta correlazione genotipo-fenotipo poiché questi pazienti mostrano fenotipi variabili: ad esempio, in pazienti portatori di una stessa variante si osservano sindromi epiletiche differenti e spesso lo stesso paziente presenta diversi tipi di epilessie combinate (*Marini et al., 2017; Bar et al., 2019; Kang et al., 2019; Bar et al., 2020*). Quasi la totalità delle varianti funzionalmente caratterizzate finora è stata associata ad effetti di LoF in termini di spostamento della voltaggio-dipendenza di attivazione verso potenziali positivi, riduzione della corrente massima (*de Kovel et al., 2017; Torkamani et al., 2014; Calhoun et al., 2017; Xiong ET AL., 2022*), diminuzione dell'espressione e/o del *trafficking* verso la membrana (*Kang et al., 2019*) e inibizione del *firing* neuronale (*Saito et al., 2015*). Al contrario, solo per un'unica variante all'N-terminale (P17T) riportata da *Veale e coll. (2022)* sono stati riportati effetti GoF in termini di aumento della densità di corrente e un rallentamento dell'inattivazione; tuttavia, il paziente portatore di questa variante presenta un ritardo dello sviluppo, ma non crisi epiletiche.

Più recentemente, KCNB1 è stata associata ad alterazioni indotte da stress ossidativo nel SNC; in particolare, l'ossidazione dei residui di cisteina nei canali KCNB1 favorisce la formazione di oligomeri che si accumulano a livello della membrana e non sono più in grado di condurre corrente, ma questo fenomeno attiva vie pro-apoptotiche e neuroinfiammatorie, contribuendo alla degenerazione neuronale, come osservato nei cervelli di pazienti affetti da malattia di Alzheimer e in modelli murini, suggerendo che l'ossidazione dei canali KCNB1 potrebbe contribuire a meccanismi patogenici di tale sindrome (*Wei et al., 2018*).

1.6.2 Farmacologia dei canali KCNB1

Ad oggi, solo pochi modulatori di KCNB1 sono descritti in letteratura. Tra questi risultano:

- **acido linoleico** (AL, Figura 11A), un acido grasso polinsaturo omega-6, in grado di accelerare le cinetiche delle correnti KCNB1-mediate e di bloccarle al contempo, agendo su due siti distinti del canale (*McKay et al., 2001*);
- altri acidi grassi polinsaturi (PUFA; Figura 11A) quali l'**acido arachidonico** (AA), l'**acido docosaesaenoico** (DHA) e l'**acido eicosapentaenoico** (EPA, *Elinder & Liin, 2017*), che agiscono prevalentemente sullo spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più negativi, effetto attribuito all'interazione elettrostatica tra il gruppo carbossilico carico negativamente del PUFA e i VSD dei canali Kv. Questo fenomeno è stato descritto per DHA ed EPA su diversi sottotipi Kv, inclusi Kv1, Kv7 e Kv2, ed è coerente con l'effetto di accelerazione dell'attivazione osservato per l'AL su KCNB1 (*Börjesson & Elinder, 2011; Moreno et al., 2012*);
- **carvedilolo** (Figura 11B), antagonista non selettivo dei recettori adrenergici, che inibisce le correnti di KCNB1 aumentandone l'inattivazione (*Kim et al., 2019*);
- **FLX** (Figura 11B), SSRI in grado di accelerare le cinetiche di inattivazione dei canali KCNB1 e di ritardarne il recupero dallo stato inattivo (*Wang et al., 2020*);
- **CBD** (Figura 11B), fitocannabinoide non psicoattivo, in grado di bloccare direttamente le correnti espresse dai canali KCNB1, senza modificarne le cinetiche di attivazione, in maniera indipendente dai recettori cannabinoidi (*Sayehmiri et al., 2025*).

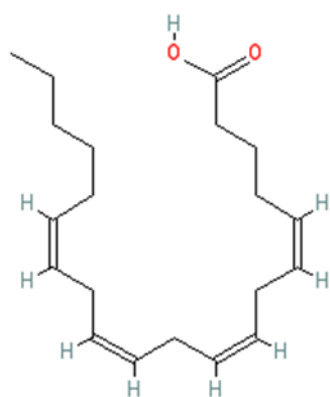
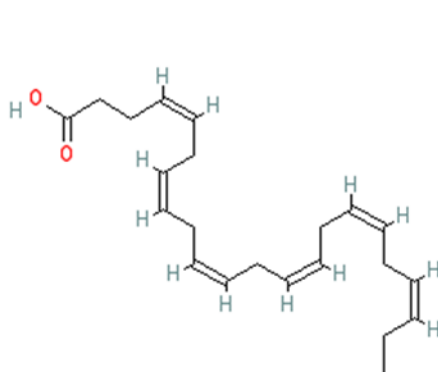
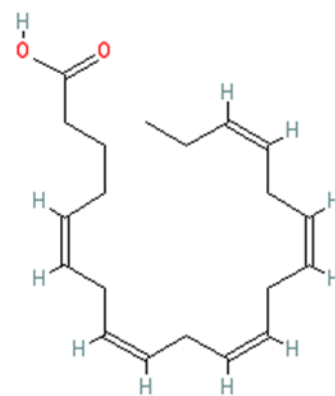
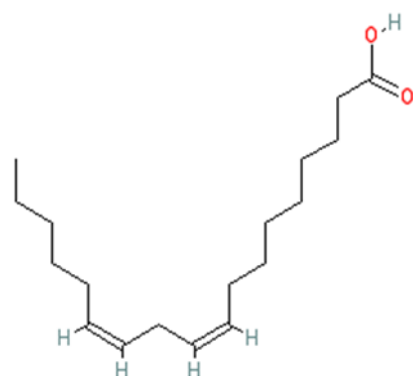
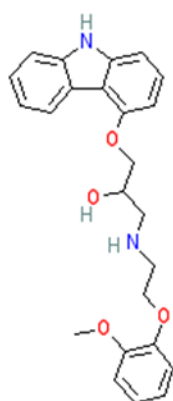
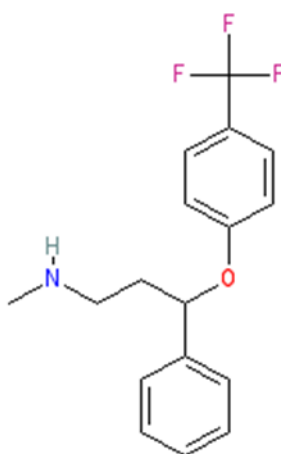
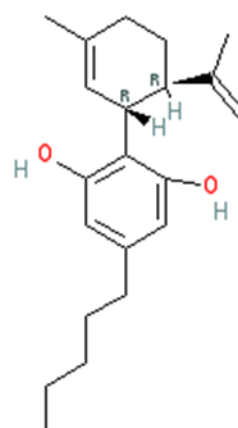
A**Farmaci ATTIVATORI dei canali KCNB1****Acido arachidonico****Acido docosaesaenoico****Acido eicosapentaenoico****Acido linoleico****B****Farmaci BLOCCANTI dei canali KCNB1****Carvedilolo****Fluoxetina****Cannabidiolo**

Figura 11. Strutture chimiche dei principali modulatori dei canali KCNB1. La figura mostra i principali modulatori dell'attività dei canali KCNB1 suddivisi in: attivatori (A) e bloccanti (B) delle correnti espresse dai canali KCNB1 (<https://www.guidetopharmacology.org/>).

1.7 Farmaci antiepilettici (AED)

Nonostante i significativi progressi compiuti negli ultimi decenni nella comprensione dei meccanismi biologici dell'epilessia, lo sviluppo di terapie farmacologiche efficaci rimane una sfida rilevante. Ciò è principalmente attribuibile all'elevata eterogeneità eziologica della patologia (alterazioni genetiche, neoplasie cerebrali, traumi cranici, infezioni del sistema nervoso centrale o eventi ischemici), spesso coesistenti nello stesso paziente (*Fisher et al., 2014; Löscher et al., 2020*); tale complessità si riflette nella variabilità delle sindromi epilettiche e nella risposta ai trattamenti farmacologici.

In linea generale, i farmaci antiepilettici (*antiepileptic drugs*, AEDs) esercitano un'azione depressiva sull'eccitabilità del Sistema Nervoso Centrale, attraverso tre principali meccanismi: potenziamento della trasmissione GABAergica inibitoria, riduzione della trasmissione glutammatergica eccitatoria e modulazione diretta della conduttanza ionica, in particolare dei canali del sodio, del calcio e del potassio voltaggio-dipendenti (*Rogawski & Löscher, 2004; Löscher & Schmidt, 2011*).

Fino agli anni '90, gli AEDs disponibili appartenevano prevalentemente a cinque principali classi chimiche, caratterizzate da strutture relativamente simili, spesso costituite da anelli eterociclici con differenti sostituenti, responsabili delle loro proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche (ad esempio fenitoina, carbamazepina, fenobarbital e valproato). A partire dagli anni '90, l'introduzione dei cosiddetti "nuovi AEDs" ha ampliato significativamente il panorama terapeutico, includendo molecole con strutture chimiche più eterogenee e meccanismi d'azione più selettivi, come lamotrigina, levetiracetam, topiramato e lacosamide (*Bialer & White, 2010*).

Nonostante tale diversificazione strutturale e molecolare, la maggior parte degli AEDs condivide caratteristiche farmacocinetiche comuni: vengono somministrati prevalentemente per via orale, attraversano efficacemente la barriera emato-encefalica, presentano un assorbimento elevato (80–100%), molti di essi mostrano un legame relativamente basso con le proteine plasmatiche e vengono metabolizzati a livello epatico, con una distribuzione prevalente nell'acqua corporea totale. La *clearance* generalmente bassa conferisce a questi farmaci un'azione di durata medio-lunga (emivita media ~12 ore), ciononostante, formulazioni a rilascio prolungato sono spesso preferite al fine di migliorare l'aderenza terapeutica dei pazienti e ridurre le fluttuazioni plasmatiche (*Patsalos et al., 2002*).

Tuttavia, circa il 30–40% dei pazienti epilettici sviluppa una forma di epilessia farmacoresistente (o refrattaria), definita come l'incapacità di ottenere un adeguato controllo delle crisi dopo il trattamento con almeno due AEDs appropriati e ben tollerati (*Kwan et al., 2010*). I meccanismi alla base della farmacoresistenza includono una ridotta accessibilità del farmaco al sito bersaglio, oppure una modificazione strutturale o funzionale del target molecolare, che determina l'insensibilità al farmaco

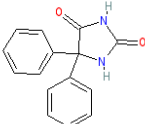
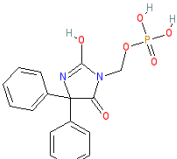
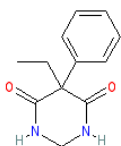
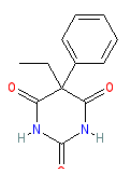
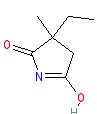
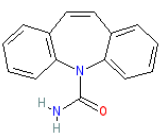
(Löschner *et al.*, 2020). In questo contesto, in particolare nelle epilessie di origine genetica, sta emergendo l'importanza di strategie di **medicina personalizzata**, basate sull'identificazione della mutazione patogenetica specifica e sulla selezione di trattamenti mirati.

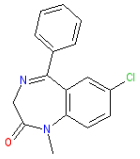
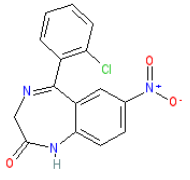
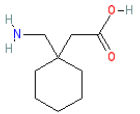
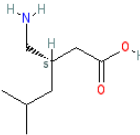
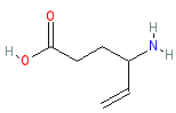
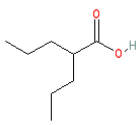
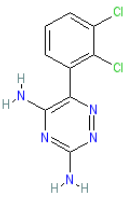
L'impiego cronico degli AEDs è inoltre associato a numerosi effetti avversi, tra cui uno dei più rilevanti è il rischio teratogeno. È stato ampiamente documentato che le donne in trattamento con alcuni AEDs presentano un aumentato rischio di malformazioni congenite nel feto: ad esempio, l'assunzione di fenitoina è associata alla sindrome fetale da idantoina, mentre il valproato è fortemente correlato all'insorgenza di difetti del tubo neurale, come la spina bifida (Tomson *et al.*, 2015). Altri effetti collaterali includono sedazione, disturbi cognitivi, alterazioni dell'umore e tossicità epatica.

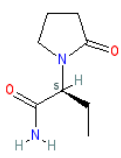
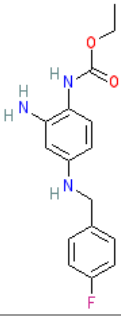
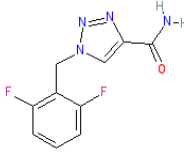
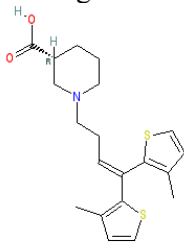
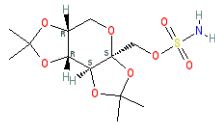
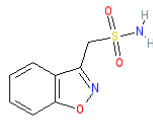
L'interruzione della terapia antiepilettica, sia programmata sia accidentale, può determinare un peggioramento del quadro clinico, con aumento della frequenza e della severità delle crisi, fino allo sviluppo di stato epilettico. Sebbene relativamente raro, un sovradosaggio acuto di AEDs può condurre a depressione respiratoria e compromissione cardiovascolare, anche se difficilmente le concentrazioni plasmatiche raggiungono livelli letali. Un ulteriore limite clinico è rappresentato dalle numerose interazioni farmacologiche, dovute all'azione di molti AEDs come induttori o inibitori degli enzimi epatici coinvolti nel metabolismo dei farmaci, con conseguenze rilevanti in pazienti sottoposti a politerapia (Patsalos & Perucca, 2003).

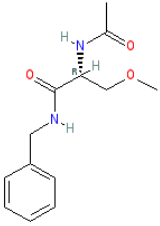
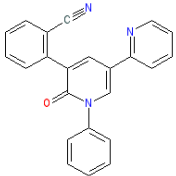
I principali farmaci antiepilettici, i loro meccanismi d'azione, nonché i principali effetti collaterali e interazioni farmacologiche, sono riassunti in Tabella 2.

Tabella 2. Sommario dei principali farmaci antiepilettici attualmente in uso clinico e delle loro caratteristiche.

Classe	Meccanismo d'azione	Applicazione clinica	Effetti tossici	Interazioni
Fenitoina,  fosfenitoina 	Blocco dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti, riduzione del rilascio di glutammato	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali	Diplopia, atassia, iperplasia gengivale, irsutismo, neuropatia	Fenobarbital, carbamazepina, isonazide, felbamato, oxcarbamazepina, topiramato, fluoxetina, fluconazolo, digossina, chinidina, ciclosporina, steroidi, contraccettivi orali
Primidone 	Simile alla Fenitoina	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali	Sedazione, disturbi cognitivi, atassia, iperattività	Simili al Fenobarbital
Fenobarbital 	Aumento della risposta mediata dal recettore GABA_A, riduzione delle risposte eccitatorie	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi miocloniche, crisi generalizzate, crisi neonatali, stato epilettico	Sedazione, disturbi cognitivi, atassia, iperattività	Valproato, carbamazepina, felbamato, fenitoina, ciclosporina, felodipina, lamotrigina, nifedipina, nimodipina, steroidi, teofillina, verapamil
Etosuccimide 	Riduzione delle correnti di Ca²⁺ di tipo T	Assenze	Nausea, cefalea, vertigini, iperattività	Valproato, fenobarbital, fenitoina, carbamazepina, rifampicina
Carbamazepina 	Blocco dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti, diminuzione del rilascio di glutammato	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali	Nausea, diplopia, atassia, iponatriemia, cefalea	Fenitoina, valproato, fluoxetina, verapamil, antibiotici macrolidi, isonazide, propoxifene, danazolo, fenobarbital, primidone

Diazepam 	Potenziamento della risposta del recettore GABA _A	Stato di male epilettico	Sedazione	Minime
Clonazepam 	Come Diazepam	Crisi di assenza, crisi miocloniche, spasmi infantili	Sedazione	Minime
Gabapentin 	Riduzione della trasmissione eccitatoria mediante azione sui canali del Ca ²⁺ voltaggio-dipendenti presinaptici	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi generalizzate	Sonnolenza, vertigini, atassia	Minime
Pregabalin 	Come Gabapentin	Crisi parziali	Sonnolenza, vertigini, atassia	Minime
Vigabatrin 	Inibizione irreversibile della GABA-transaminasi	Crisi parziali, spasmi infantili	Sonnolenza, vertigini, psicosi, riduzione del campo visivo	Minime
Valproato 	Blocco dei canali del Na ⁺ voltaggio-dipendenti, aumento della disponibilità di GABA	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi generalizzate, crisi di assenza, crisi miocloniche	Nausea, tremore, aumento ponderale, perdita di capelli, teratogeno, epatotossico	Fenobarbital, fenitoina, carbamazepina, lamotrigina, felbamato, rifampicina, etosuccimide, primidone
Lamotrigina 	Prolungata inattivazione dei canali del Na ⁺ voltaggio-dipendenti, riduzione del rilascio di glutammato	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi generalizzate, crisi di assenza	Vertigini, cefalea, diplopia, eruzioni cutanee	Valproato, carbamazepina, oxcarbazepina, fenitoina, fenobarbital, primidone, succinimidi, sertralina, topiramato

Levetiracetam 	Azione sulla proteina sinaptica SV ₂ A con conseguente alterazione del rilascio di neurotrasmettitori	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi generalizzate	Nervosismo, vertigini, depressione, convulsioni	Rare
Retigabina 	Attivazione dei canali del K ⁺ della classe Kv7	Trattamento di associazione delle crisi parziali	Vertigini, sonnolenza, confusione, visione offuscata, pigmentazione bluastra di cute labbra e retina	Minime
Rufinamide 	Prolungata inattivazione dei canali del Na ⁺ voltaggio-dipendenti	Trattamento di associazione della sindrome di Lennox-Gastaut	Sonnolenza, vomito, diarrea, ipertensione	Non metabolizzata dagli isozimi P450
Tiagabina 	Blocco della ricaptazione del GABA mediante legame selettivo a GAT-1	Crisi parziali	Nervosismo, vertigini, depressione, convulsioni	Fenobarbital, fenitoina, carbamazepina, primidone
Topiramato 	Blocco dei canali del Na ⁺ voltaggio-dipendenti e dei recettori AMPA/kainato, potenziamento della trasmissione GABAergica	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi generalizzate, crisi di assenza, emicrania	Sonnolenza, rallentamento cognitivo, confusione, parestesie	Fenitoina, carbamazepina, contraccettivi orali, lamotrigina, litio
Zonisamide 	Blocco dei canali del Na ⁺ voltaggio-dipendenti	Crisi tonico-cloniche generalizzate, crisi parziali, crisi miocloniche	Sonnolenza, disturbi cognitivi, confusione, difficoltà di concentrazione	Minime

Lacosamide 	Aumentata inattivazione dei canali del Na⁺	Crisi tonico- cloniche generalizzate, crisi parziali	Vertigini, cefalea, nausea, lieve aumento del tratto PR	Minime
Perampanel 	Blocco dei recettori AMPA	Crisi parziali con o senza generalizzazione secondaria	Vertigini, sonnolenza, cefalea, sindromi psichiatriche	Aumento della clearance da parte di induttori del CYP3A4

2. SCOPO DEL LAVORO

I canali ionici sono proteine transmembrana fondamentali per la regolazione dell'eccitabilità cellulare, modulando il flusso di ioni come sodio, potassio, calcio e cloro attraverso la membrana plasmatica. Nel SNC, la loro funzione è cruciale per la generazione e la propagazione dei potenziali d'azione. Mutazioni nei canali ionici possono interferire con la corretta conduzione dei segnali elettrici, causando patologie neurologiche, tra cui le Encefalopatie Epilettiche e dello Sviluppo (DEE), disturbi caratterizzati da crisi epilettiche precoci, ritardo dello sviluppo, disabilità cognitive e frequente farmacoresistenza. Tra i canali del potassio associati a patologie epilettiche, i canali KCNT1 e KCNB1 rivestono un ruolo importante in diverse forme di DEE. In particolare, le mutazioni identificate nel gene KCNT1 sono generalmente associate ad effetti GoF, mentre, le mutazioni identificate nel gene KCNB1, sono associate prevalentemente ad effetti LoF.

In tale ambito, lo scopo di questo Progetto di Ricerca è stato quello di caratterizzare le conseguenze funzionali indotte da varianti genetiche identificate, in collaborazione con diversi gruppi clinici operanti sul territorio nazionale ed internazionale, nei canali del potassio KCNT1 o KCNB1 in pazienti affetti da DEE refrattarie ai trattamenti convenzionali, come dettagliato in tabella 3:

Tabella 3. Caratteristiche note dei pazienti affetti da DEE portatori delle varianti in KCNT1 o KCNB1 in studio

Sostituzione nucleotidica	Variante amminoacidica	Età (anni)	Sesso	Fenotipo	Presentano almeno 2 crisi al giorno
KCNT1-1066 C>T	KCNT1-R356W	3	F	DEE	Si
KCNT1-1066 C>T	KCNT1-R356W	14	F	EIMFS	Si
KCNT1-1193 G>A	KCNT1-R398Q	1.5	M	EIMFS	Si
KCNT1-1283 G>A	KCNT1-R428Q	3	M	DEE	Si
KCNB1-104 T>C	KCNB1-L35P	7	M	DEE	Si
KCNB1-539 A>G	KCNB1-E180G	9	M	DEE	No
KCNB1-608-623 delCCATTGCCCTGTCCCT	KCNB1-I204T*fs38	11	M	DEE	Si
KCNB1-916 C>T	KCNB1-R306C	22	F	DEE	No
KCNB1-934 C>T	KCNB1-R312C	Non noto	Non noto	DEE	Non noto
KCNB1-935 G>A	KCNB1-R312H	15	M	DEE	No
KCNB1-1045 G>T	KCNB1-V349F	23	M	DEE	No
KCNB1-1107G>A	KCNB1-W369*	8.5	M	DEE	No
KCNB1-1139 A>G	KCNB1-Y380C	5	M	DEE	No
KCNB1-1139 A>G	KCNB1-Y380C	3	F	DEE	No
KCNB1-1235 T>C	KCNB1-I412T	Non noto	Non noto	DEE	Non noto
DEE= encefalopatie epilettiche e dello sviluppo, EIMFS=epilepsy of infancy with migrating focal seizures; F= femmina; M=maschio					

Tali varianti ricadono su diversi domini funzionali dei due canali (Figura 12):

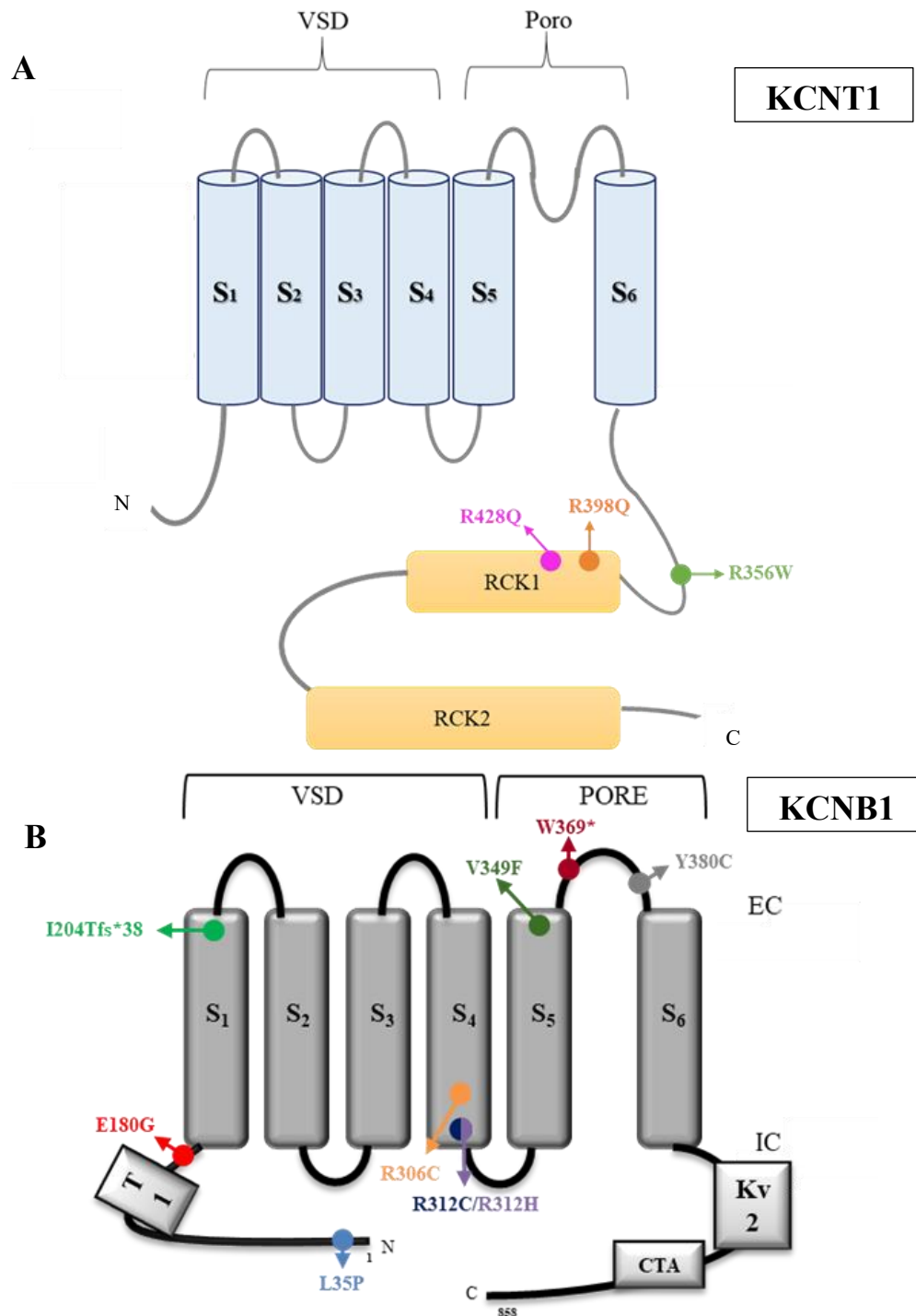


Figura 12. Topologia dei canali KCNT1 o KCNB1. A) Topologia del canale KCNT1, in cui sono rappresentati i domini del VSD (cilindri azzurri denominati da S₁ a S₄) e del poro (cilindri azzurri S₅ e S₆), i domini N- e C- terminali citosolici ed i domini RCK1 e 2 (box arancioni); inoltre è mostrata la distribuzione delle varianti in studio all'interno del canale. B) Topologia del canale KCNB1, in cui sono rappresentati i domini del VSD (cilindri grigio scuro denominati da S₁ a S₄) e del poro (cilindri grigio scuro S₅ e S₆), i domini N- e C- terminali citosolici ed i domini T1, CTA e Kv2 (box grigio chiaro); inoltre è mostrata la distribuzione delle varianti in studio all'interno del canale.

A tale scopo, queste varianti sono state ingegnerizzate in plasmidi per espressione eterologa tramite mutagenesi sito-diretta e sono stati condotti esperimenti di elettrofisiologia su cellule CHO transientemente trasfettate con i plasmidi codificanti per i canali in forma wild-type o mutante.

Tali esperimenti avevano lo scopo di:

- definire le conseguenze funzionali indotti da ciascuna variante sulla funzione del corrispondente canale wild-type, in termini di densità di corrente, spostamento della voltaggio-dipendenza e cinetiche di attivazione e deattivazione, al fine di classificare le varianti in studio come varianti associate a perdita di funzione (o *loss-of-function*, LoF) o a guadagno di funzione (o *gain-of-function*, GoF);
- studiare la sensibilità farmacologica dei canali wild-type o mutanti allo scopo di identificare potenziali nuovi trattamenti farmacologici personalizzati in grado di ristabilire la normale funzionalità dei canali: in particolare, sono stati testati il farmaco fluoxetina (FLX) sui canali KCNT1, mentre i farmaci metformina (MET), FLX e cannabidiolo (CBD) sono stati testati sui canali KCNB1.

Tali farmaci sono stati selezionati secondo una strategia di *drug repurposing*, ovvero il riposizionamento di farmaci già approvati e in uso clinico per il trattamento di altre patologie, ma capaci di modulare l'attività dei canali in studio: infatti, questo approccio rappresenta una scelta particolarmente vantaggiosa rispetto alla progettazione e allo sviluppo *de novo* di farmaci antiepilettici, in quanto consente di ridurre significativamente i tempi e i costi associati alla progettazione e alla sperimentazione clinica dei potenziali farmaci. Tale aspetto risulta di fondamentale importanza nel contesto delle DEE, considerata la loro severità, la farmacoresistenza delle crisi e la presenza di importanti comorbidità, per le quali un intervento terapeutico tempestivo può influenzare in maniera determinante l'evoluzione clinica. Inoltre, l'utilizzo di farmaci con un profilo farmacocinetico e di sicurezza già noto permette di migliorare l'efficacia terapeutica e di ridurre i potenziali effetti collaterali, rendendo questa strategia particolarmente rilevante per i pazienti affetti da epilessie farmacoresistenti. Tale strategia si inserisce nel contesto della **medicina personalizzata**, in quanto la scelta del trattamento viene orientata sulla base della specifica mutazione genetica e dell'effetto funzionale ad essa associato scegliendo, in particolare, farmaci attivatori in pazienti portatori di varianti LoF e farmaci bloccanti in pazienti portatori di varianti GoF.

Inoltre, avendo svolto un periodo di ricerca all'estero, nello specifico presso l'*University of Texas Health Science Center* (San Antonio, TX, USA), sotto la supervisione del Prof. Mark S. Shapiro, a partire da evidenze già riportate in letteratura e discusse nell'Introduzione, secondo cui i canali del potassio KCNT1 risultano regolati dal fosfolipide di membrana PIP₂, sono stati condotti ulteriori esperimenti di elettrofisiologia, allo scopo di descrivere la modulazione muscarinica delle correnti KCNT1-mediate, anche in presenza di varianti associate a DEE. Questi studi hanno lo scopo di individuare modalità indirette di regolare l'attività del canale, che potrebbero costituire possibili nuovi target per approcci farmacologici innovativi nelle DEE.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Ingegnerizzazione dei plasmidi incorporanti le varianti in studio

Le varianti nel canale KCNT1 oggetto di questo studio sono state inserite all'interno del plasmide **RC214820** (Figura 13; *OriGene, Rockville, MD, USA*), contenente il cDNA codificante per l'isoforma umana di tipo A del canale KCNT1, mentre le varianti identificate nel canale KCNB1 sono state inserite nel plasmide pRC/CMV (ottenuto in collaborazione con il gruppo di Ricerca del Prof. J.S. Trimmer, Dipartimento di fisiologia, Università DAVIS, CA, USA) contenente il cDNA codificante per l'isoforma umana del canale KCNB1.

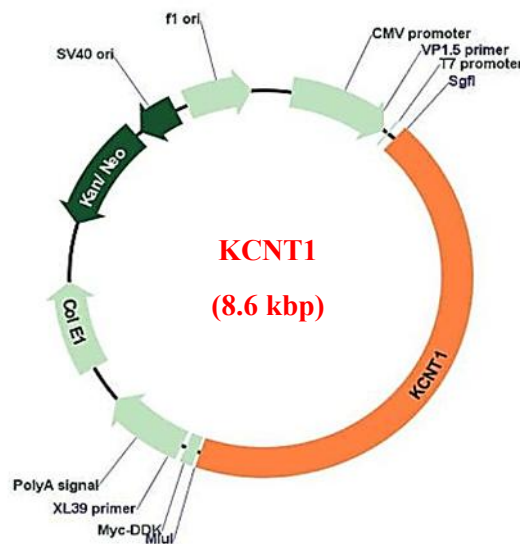


Figura 13. Mappa del plasmide utilizzato per il canale KCNT1. Schema del plasmide incorporante il cDNA codificante per l'isoforma umana del canale KCNT1 WT (Origene, cod. RC214820). La cassetta KAN/NEO indica la presenza di cDNA codificante per proteine in grado di conferire resistenza agli antibiotici kanamicina/neomicina. Il plasmide utilizzato per il canale KCNB1, invece, presenta una sequenza codificante per proteine in grado di conferire resistenza all'antibiotico ampicillina e non presenta invece tag.

A tale scopo, sono state effettuate reazioni di mutagenesi sito-diretta basate su PCR, che vanno sotto il nome di *quick-change*. Per tali reazioni di PCR, sono stati disegnati i seguenti primers su regioni del cDNA codificanti per porzioni dei canali d'interesse prossime alla posizione di ciascuna variante (indicata in rosso in tabella 4). Per la variante KCNB1 I204Tfs*38, il plasmide mutato è stato realizzato dall'azienda Azenta (Leipzig, Germany).

Tabella 4: Primers utilizzati per le reazioni di mutagenesi sito-diretta di KCNT1 o KCNB1

Nome oligonucleotidi	Sequenza oligonucleotidi	Temperatura di melting (°C)	Contenuto in GC (%)
KCNT1-R356W FWD	5'-GGATGGAG T GGCAGAAGTC-3'	60	58
KCNT1-R356W REV	5'-GACTTCTGCC A CTCCATCC-3'	60	58
KCNT1-R398Q FWD	5'-CCACCCCC A GCTCCAGG-3'	60	76
KCNT1-R398Q REV	5'-CCTGGAGC T GGGGGTGG-3'	60	76
KCNT1-R428Q FWD	5'-GGTCCCAGC A GGTCATC-3'	56	65
KCNT1-R428Q REV	5'-GATGACCT T GCTGGGACC-3'	56	65
KCNB1-L35P FWD	5'-GGTCCGCC C CAACGTCG-3'	62	76
KCNB1-L35P REV	5'-CGACGTTG G GGCGGACC-3'	62	76
KCNB1-E180G FWD	5'-GGACCTACTGG G GAAGCC-3'	60.5	67
KCNB1-E180G REV	5'-GGCTTC C CCAGTAGGTCC-3'	60.5	67
KCNB1-R306C FWD	5'-CGAATTCTC T GCATCCTTAAG-3'	60	43
KCNB1-R306C REV	5'-CTTAAGGATGC A GAGAATTCG-3'	60	43
KCNB1-R312C FWD	5'-GCTTGCA T GCCACTCCACTG-3'	61	60
KCNB1-R312C REV	5'-AGTGGAGTGGC A TGCAAGC-3'	61	60
KCNB1-R312H FWD	5'-GCTTGCAC A CCACTCCACTG-3'	61	60
KCNB1-R312H REV	5'-CAGTGGAGTGG T GTGCAAGC-3'	61	60
KCNB1-V349F FWD	5'-CCAGCCTT T TCTTCTTTGC-3'	54	47
KCNB1-V349F REV	5'-GCAAAGAAGA A AAGGCTGG-3'	54	47
KCNB1-W369* FWD	5'-CCTCTTTCTG A TGGGCCAC-3'	59	58
KCNB1-W369* REV	5'-GTGGCCCA T CAGAAAGAGG-3'	59	58
KCNB1-Y380C FWD	5'-CTGTTGGGT G TGGAGACATC-3'	59	55
KCNB1-Y380C REV	5'-GATGTCTCCA C ACCCAACAG-3'	59	55
KCNB1-I412T FWD	5'-CCCATCA C CGTCAATAACTTC-3'	57	48
KCNB1-I412T REV	5'-GAAGTTATTGACG G TGATGGG-3'	57	48

FWD: forward REV: reverse

Tali primers sono stati utilizzati per allestire le reazioni di PCR per ciascuna variante in studio usando i reagenti e le quantità riassunti in tabella 5, per un volume finale di 50 µl. Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite con termociclatore Mastercycler (Eppendorf, USA) secondo il protocollo riportato (Figura 14):

Tabella 5: Condizioni sperimentali per allestire ciascuna reazione di PCR (quick-change)

Componenti mix di PCR	μl
Templato (100 ng/ μl)	1
Primer FWD (10 μM)	3
Primer REV (10 μM)	3
Buffer Q5 (5x)	10
dNTP (10 mM)	1
Q5 (2U/ μl)	0.5
Buffer GC	10
H ₂ O	21.5

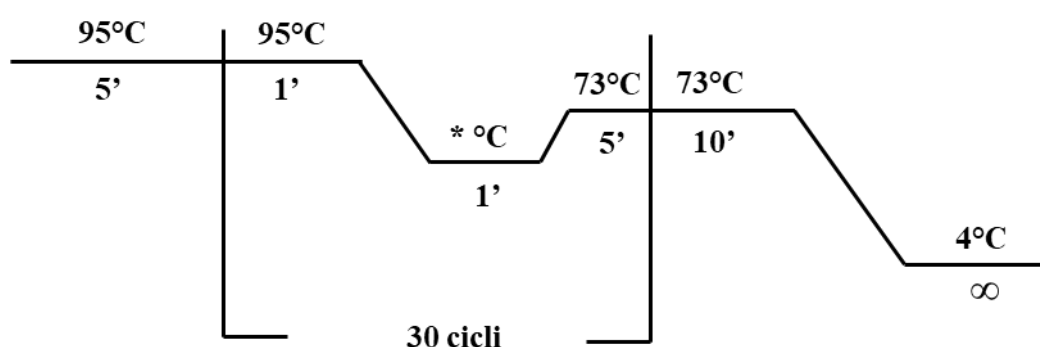


Figura 14. Procollo Quick-change PCR. Protocollo utilizzato per mutagenesi sito-diretta dei plasmidi contenenti il cDNA codificante l'isoforma umana dei canali KCNT1 e KCNB1. *: temperature comprese tra 54°C e 58°C in base alle temperature di melting dei primers utilizzati per ciascuna mutagenesi (Tabella 5).

I prodotti della PCR sono stati quindi sottoposti a digestione utilizzando 1 μl dell'enzima DpnI (4U/ μl , *New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA) e 5 μl del buffer specifico (SmartCut 1x NEB) e lasciata a 37°C per 1 ora allo scopo di eliminare il templato WT contenente i siti "CATG" metilati riconosciuti dall'enzima. Una volta ultimata la digestione, è stato utilizzato l'intero volume per trasformare tramite shock termico (45" a 42°C, seguito da 2' a 4°C) 250 μl di cellule DH5 α precedentemente rese competenti in laboratorio. Il tutto è stato piastrato su terreno LB gelificato con Agar (25 g/L) addizionato con antibiotico specifico (25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamicina per le varianti in KCNT1 e 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillina per le varianti in KCNB1). Le piastre sono state quindi incubate per circa 16 ore a 37°C. Quindi è stata valutata la correttezza della procedura osservando la presenza di colonie batteriche. Per procedere all'amplificazione su piccola scala dei plasmidi contenuti all'interno delle cellule batteriche, alcune delle colonie ottenute sono state rinfrescate in 6 mL terreno liquido LB + antibiotico e lasciate a 37°C per circa 16 ore.

3.2 Estrazione di DNA plasmidico su piccola scala (mini-prep)

L'estrazione del DNA plasmidico su piccola scala (mini-prep) è stata condotta mediante l'utilizzo del kit *HiPurA plasmid DNA Miniprep Purification kit* (Himedia, Einhausen, Germania). A tale scopo, la coltura batterica, lasciata a crescere per circa 16 ore a 37°C con agitazione a 200 rpm, è stata pellettata usando una minicentrifuga (Minispin Plus, Eppendorf) a 14000 rpm per 1'. È stato poi eliminato il surnatante ed il pellet batterico è stato risospeso utilizzando 250 µl di soluzione di risospensione HP1 fredda (contenente 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA), precedentemente addizionata con 100 µg/ml RNasi A, così come indicato dalle istruzioni della casa produttrice. Successivamente è stato utilizzato il buffer di lisi HP2 (contenente 200 mM NaOH, 1% SDS) per denaturare il DNA e le proteine e favorire il discioglimento delle membrane. Sono poi stati aggiunti 350 µl di buffer HN3 (contenente potassio acetato 3M, pH 5.5), che consente la rinaturazione selettiva del solo DNA plasmidico. Dopo centrifugazione a 14000 rpm per 10', il DNA plasmidico rimane in soluzione, mentre il DNA cromosomiale e le proteine denaturate sedimentano; il surnatante è stato trasferito su colonne HiElute contenute nel kit, in grado di legare il DNA, e centrifugato a 14000 rpm per 1'. Successivamente le colonne sono state lavate con 500 µl di wash buffer HPB (contenente acetato di potassio 1M, pH 5.0) e si è centrifugato nuovamente a 14000 rpm per 1'; dopodiché, in seguito all'aggiunta di 700 µl buffer HPE (contenente NaCl 1M, MOPS 50 mM, pH 7.0, isopropanolo 15%) precedentemente addizionato con etanolo (96-100%), è stata eseguita una nuova centrifugazione nelle stesse condizioni. Come ultimo passaggio, per eluire il DNA, è stato utilizzato un opportuno volume di acqua per biologia molecolare a 60°C ed effettuato un'ultima centrifuga sempre alla massima velocità per 1'.

3.3 Digestione diagnostica dei cloni e sequenziamento

Il DNA plasmidico ottenuto dalla procedura di mini-prep di ciascuna variante è stato sottoposto a digestione enzimatica, utilizzando gli enzimi: EcoRI per i cloni contenenti il DNA codificante il canale KCNB1, e la coppia di enzimi EcoRI+HindIII per i cloni contenenti il DNA codificante per il canale KCNT1, in grado di produrre frammenti del plasmide di peso diverso tra loro e facilmente distinguibili mediante corsa elettroforetica. Le reazioni sono state lasciate a 37°C per 1h e poi sottoposte a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% TBE 0.5x (contenente EDTA 1 mM pH 8.0, acido borico 44.5 mM, Tris 44.6 mM) colorato con Bromuro d'etidio (0.4 µg/ml). Le reazioni sono state lasciate correre fino a separazione di uno standard di peso molecolare corso in parallelo e usato come riferimento 1 kb (*Thermo Scientific*; codice: #SM0311; Figura 15A). In parallelo, i campioni non digeriti sono stati corsi anche con il marcatore si masa λ /H (*New England Biolabs*; codice: N3012L; Figura 15B), al fine di valutare la concentrazione di DNA plasmidico estratto mediante confronto delle intensità delle bande di massa nota rispetto a quelle presenti nei campioni. I gel così ottenuti, sono stati poi osservati all'ultravioletto e le immagini acquisite con Gel-doc EZ Imager (Bio-Rad). Dall'analisi delle immagini ottenute sono stati selezionati i cloni da sottoporre a reazione di sequenziamento (Eurofins, Milano).

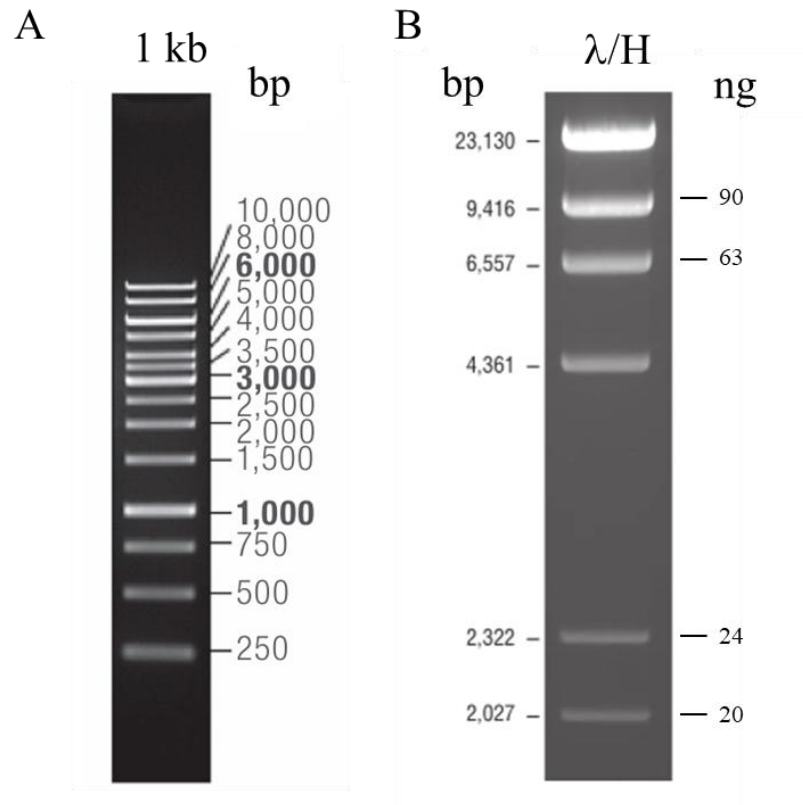


Figura 15. Profilo di separazione dei marker utilizzati per la digestione diagnostica. A) Marker ad alta risoluzione 1kb per frammenti da 250 a 10000 kb. B) Migrazione del fago λ digerito con l'enzima HindIII che produce frammenti a concentrazione nota (ng).

3.4 Estrazione di DNA plasmidico su larga scala (maxi-prep)

Una volta che il sequenziamento ha permesso di identificare il clone positivo a ciascuna variante in studio, è stata effettuata una preparazione plasmidica su larga scala (maxi-prep), utilizzando il kit di estrazione *Plasmid DNA Extraction Maxi Filter Endotoxin Free* (Fisher Molecular Biology, Roma, IT). Il clone positivo per ciascuna variante è stato rinfrescato con 5 ml di LB con Ampicillina (100 µg/ml) o Kanamicina (25 µg/ml) e lasciato a 37°C per circa 8 ore in agitazione a 200 rpm; tale clone è stato quindi utilizzato per inoculare 500 ml di LB con Ampicillina o Kanamicina e lasciato a 37°C per circa 16 ore in agitazione. La coltura batterica è stata quindi centrifugata (Beckman Coulter) a 6000 g a 4°C per 10', ed il pellet batterico risospeso con 20 ml di buffer PM1 freddo (contenente Tris-Cl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasi 100 µg/ml). Successivamente i batteri sono stati lisati in 20 ml di buffer PM2 (contenente NaOH 200 mM, SDS 1%) e incubati per 5' a RT. Sono stati successivamente aggiunti 20 ml di buffer PM3 freddo (contenente acetato di potassio 3 M, pH 5.5) e il tutto è stato risospeso finché la viscosità non è stata neutralizzata. La sospensione è stata quindi centrifugata a 20.000 g a 4°C per 30'. Intanto, si è proceduto ad equilibrare la colonna per il legame del DNA con 12.5 ml di buffer PEQ (contenente NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, pH 7.0, isopropanolo 15%, Triton x-100 0.15%).

A centrifuga ultimata, il surnatante è stato caricato sulla colonna equilibrata e lasciato eluire per gravità. La colonna è stata poi lavata con 30 ml di buffer PW (contenente potassio acetato 1M, pH 5.0) ed è stato fatto eluire il DNA con 15 ml di buffer PEL (contenente NaCl 1.25 M, Tris-Cl 50 mM, pH 8.5, isopropanolo 15%). Direttamente all'eluato sono stati aggiunti 11 ml di isopropanolo e centrifugato a 20.000 g a 4°C per 30'. A fine centrifuga il surnatante è stato delicatamente rimosso ed il pellet raccolto con 2 ml di etanolo freddo al 70%. Il prodotto risultante è stato centrifugato (Minispin Plus, Eppendorf) a 14000 rpm per 10', dopodiché il surnatante è stato eliminato ed il pellet lasciato ad asciugare all'aria per circa 16 ore. Il giorno seguente, il pellet è stato risospeso in un appropriato volume di acqua per biologia molecolare, lasciato 30' a 37°C e quantizzato mediante lettura spettrofotometrica (Lambda25-UV/VIS spectrometer) della densità ottica a 260 nm (per misurare la concentrazione degli acidi nucleici) e a 280 nm (per misurare la concentrazione delle proteine). Se il rapporto OD₂₆₀/OD₂₈₀ risultava compreso tra ~1.5 e ~2, la preparazione di DNA risultava accettabile. Prima di procedere a successivi esperimenti, tale preparazione è stata sottoposta nuovamente a procedura di sequenziamento (Eurofins, Milano) per confermare la presenza della mutazione in studio e per escludere l'eventuale inserzione aspecifica di ogni altra mutazione nell'intera sequenza codificante per i canali in studio.

1.3 Colture cellulari e trasfezioni

I plasmidi ottenuti, contenenti il cDNA codificante per le isoforme wild-type o mutanti dei canali KCNT1 o KCNB1, sono stati espressi in cellule ovariche di criceto cinese (CHO) coltivate in mezzo di coltura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) all'interno di capsule Petri dal diametro di 100 mm. Il DMEM è stato completato con 50 ml di *Fetal Bovine Serum* (FBS), 5 ml di L-Glutammina (200 mM, Sigma-Aldrich) e 5 ml di penicillina/streptomicina (10.000 U di penicillina/10 mg streptomicina, Sigma-Aldrich, Milano, IT). Ogni 2-3 giorni le cellule venivano raccolte utilizzando il reagente Tripsina (0.05% tripsina, 0.2% EDTA in PBS; *Himedia, Einhausen*, Germania) per rimuoverle dalla piastra di crescita e trasferite in nuove Petri contenenti mezzo DMEM fresco, e infine conservate in incubatore a 37°C. Per le trasfezioni, le CHO sono state piastrate ad una confluenza di circa il 70% su capsule Petri dal diametro di 40 mm al cui interno è stato posto un vetrino precedentemente sterilizzato con etanolo al 70% e mediante esposizione al calore (180°C per 3h); infine, il vetrino veniva trattato con poli-L-lisina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) al fine di favorire l'adesione delle cellule. Dopo 24h dalla piastratura, le cellule sono state trasfettate utilizzando il reagente Lipofectamina (Invitrogen) secondo le istruzioni della casa produttrice. Come marcatore di trasfezione veniva utilizzato, in ogni trasfezione, un plasmide codificante per la proteina *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP). I reagenti ed i quantitativi utilizzati per trasfettare ciascun vetrino sono riassunti in tabella 6:

Tabella 6: Condizioni sperimentali per trasfezioni transienti dei plasmidi codificanti per i canali KCNT1 o KCNB1 wild-type o mutanti.

	DNA plasmidico (KCN*+ EGFP, µg)	Opti-MEM (µl)	Mix Lipo** (µl)	Opti-MEM dopo 30 minuti (ml)
CAMPIONE	3.6 + 0.4	250	250	1
*KCNT1 WT o mutante/KCNB1 WT o mutante				
**La mix Lipo è stata preparata con 5 µl di Lipofectamina + 250 µl di Opti-MEM per ogni campione				

Utilizzando le stesse condizioni sperimentali sopra descritte, il canale KCNT1 wild-type ed il mutante R356W sono stati co-espressi insieme al recettore muscarinico M1, tramite trasfezioni transienti, con un rapporto 1:1, utilizzando l'EGFP come marcatore di trasfezione. I reagenti ed i quantitativi utilizzati per trasfettare ciascun vetrino sono riassunti in tabella 7:

Tabella 7: Condizioni sperimentali per trasfezioni transienti dei plasmidi codificanti per i canali KCNT1 wild-type o mutanti con M1R.

	DNA plasmidico (KCNT1*+ M1R + EGFP, µg)	Opti-MEM (µl)	Mix Lipo** (µl)	Opti-MEM dopo 30 minuti (ml)
CAMPIONE	1.8 + 1.8 + 0.4	250	250	1
*KCNT1 WT o KCNT1-R356W **La mix Lipo è stata preparata con 5 µl di Lipofectamina + 250 µl di Opti-MEM per ogni campione				

3.5 Esperimenti di elettrofisiologia sui canali KCNT1 WT o mutanti

Dopo 24h dalla trasfezione, si è proceduto al protocollo di registrazione tramite tecnica di *patch-clamp* in configurazione *whole-cell*, con amplificatore Axopatch 200B (Molecular Devices, Union City, CA). La tecnica di *patch-clamp* prevede l'utilizzo di elettrodi di vetro con resistenza di 3-5 MΩ quando riempiti con soluzione intracellulare contenente (in mM): KCl 130, NaCl 10, Mg-ATP 5, EGTA 5. I vetrini contenenti le CHO trasfettate sono stati, quindi, immersi in soluzione extracellulare (contenente: NaCl 138 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosio 10 mM, HEPES 10 mM) e alloggiati sul microscopio. Le correnti sono state misurate con diversi protocolli di voltaggio:

1. **attivazione:** l'applicazione di step depolarizzanti da -90 mV a +60 mV, con un incremento di 10 mV per ogni step ed un potenziale di mantenimento a -80 mV, permette di misurare:
 - a) **densità di corrente:** la corrente, misurata posizionando il cursore alla fine di ogni traccia (Figura 16, cursore 1) è stata poi divisa per la grandezza della singola cellula, valutata in base alla capacità della membrana plasmatica (espressa in picoFarad);
 - b) **componente istantanea:** la corrente espressa a +60 mV all'inizio della traccia (corrente istantanea, I_{inst} ; Figura 16, cursore 2) veniva divisa per la corrente misurata alla fine della stessa, (corrente allo stato stazionario, $I_{steady-state}$; Figura 16, cursore 1);
 - c) **voltaggio-dipendenza dell'attivazione:** i valori di corrente misurati a +60 mV (Figura 16, cursore 1) sono stati normalizzati al valore massimo e approssimati all'equazione:

$$y = I_{min} + \frac{(I_{max} - I_{min})}{1 + \exp\left(\frac{V_{1/2} - V_{test}}{k}\right)}$$

dove:

I_{min} : densità di corrente minima,

I_{max} : densità di corrente massima,

V_{test} : valore di potenziale testato (da -90 mV a +60 mV),

$V_{1/2}$: valore di potenziale a cui la metà dei canali si trova nello stato aperto,

k : misura della pendenza della curva.

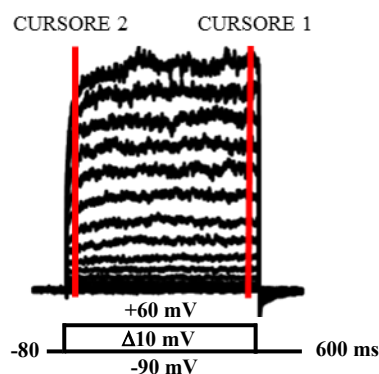


Figura 16. Protocollo di attivazione. Esempio di tracce di corrente misurate utilizzando il protocollo di voltaggio mostrato in basso. Sono indicate le posizioni dei cursori utilizzati per l'analisi.

2. **protocollo di rampa:** le correnti venivano misurate in seguito a variazioni del potenziale da -90 mV a +60 mV in 2.5 secondi, sia quando le cellule erano in soluzione controllo, sia in presenza di farmaco, sia dopo l'interruzione dell'esposizione al farmaco (washout, Figura 17). I dati sono stati espressi come percentuale della densità di corrente misurata in presenza di farmaco rispetto a quella di controllo.

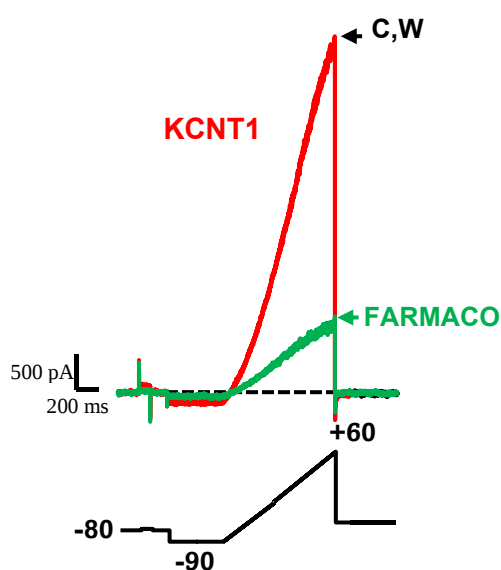


Figura 17. Protocollo di rampa. Esempio di correnti misurate utilizzando il protocollo di voltaggio mostrato in basso, su cellule esprimanti KCNT1 WT, in cui sono mostrate le tracce di corrente espresse durante l'esposizione al farmaco (in verde), in soluzione di controllo (C) o nel washout (W).

3.6 Esperimenti di elettrofisiologia sui canali KCNB1 WT o mutanti

Anche per le cellule esprimenti i canali KCNB1 wild-type o mutanti, dopo 24h dalla trasfezione, si è proceduto al protocollo di registrazione tramite tecnica di *patch-clamp* in configurazione *whole-cell*, con amplificatore Axopatch 200B (Molecular Devices, Union City, CA). La tecnica di *patch-clamp* prevede l'utilizzo di elettrodi di vetro con resistenza di 3-5 MΩ quando riempiti con soluzione intracellulare, contenente (in mM): KCl 140, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 10, Mg-ATP 5). I vetrini contenenti le CHO trasfettate sono stati, quindi, immersi in soluzione extracellulare (contenente: NaCl 138 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosio 10 mM, HEPES 10 mM) e alloggiati sul microscopio. Le correnti sono state misurate con diversi protocolli di voltaggio:

1. **attivazione:** l'applicazione di step depolarizzanti da -80 mV a +120 mV, con un incremento di 10 mV per ogni step ed un potenziale di mantenimento a 0 mV, permette di misurare:
 - a) **densità di corrente:** la corrente, misurata posizionando il cursore a +80 mV alla fine di ogni traccia (Figura 18, cursore 1) è stata poi divisa per la grandezza della singola cellula, valutata in base alla capacità della membrana plasmatica (espressa in pF);
 - b) **cinetica di attivazione:** le tracce di corrente misurate ad ogni potenziale sono state fittate ad una funzione doppia esponenziale di seguito riportata, ottenendo così la misura della velocità di attivazione dei canali “ τ_{ACT} ” (espressa in ms) che comprende: una componente rapida (τ_{FAST}) ed una lenta (τ_{SLOW}); e delle ampiezze A_i , anch'esse comprendenti una componente rapida (A_{FAST}) ed una lenta (A_{SLOW}), espressa come rapporto $A_{FAST}/(A_{FAST}+A_{SLOW})$ (Figura 18, cursori 1 e 2);

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

Dove:

A_i : ampiezza delle correnti ioniche,

t : tempo,

τ_i : costante di tempo che descrive la velocità di attivazione o deattivazione del canale,

C: termine noto

- c) **voltaggio-dipendenza dell'attivazione:** i valori di corrente misurati a 0 mV (Figura 18, cursore 1) sono stati normalizzati al valore massimo e approssimati all'equazione:

$$y = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + \exp(V_{1/2} - V_{test} / k))$$

dove:

I_{min} : densità di corrente minima,

I_{max} : densità di corrente massima,

V_{test} : valore di potenziale testato (da -80 mV a +120 mV),

$V_{1/2}$: valore di potenziale a cui la metà dei canali si trova nello stato aperto,

k : misura della pendenza della curva;

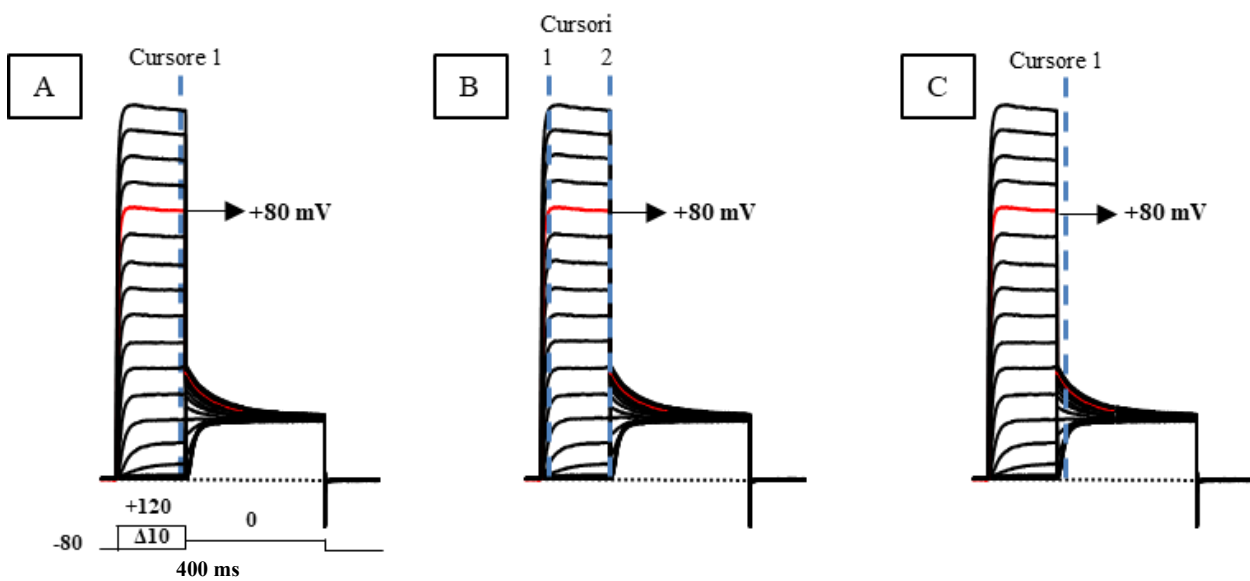


Figura 18: Protocollo di attivazione. Esempio di tracce di corrente ottenute utilizzando il protocollo mostrato. Sono mostrate le posizioni dei cursori utilizzati per l'analisi (barre azzurre) della densità di corrente a +80 mV (A), delle cinetiche di attivazione (B) e della voltaggio-dipendenza dell'attivazione (C).

2. **deattivazione:** l'applicazione di potenziali da -120 mV a +40 mV con un incremento di 10 mV per ogni step, permette di misurare la voltaggio-dipendenza della **cinetica di deattivazione**: a tale scopo, le correnti sono state fittate ad una funzione doppia esponenziale (riportata sopra) per ottenere la misura della velocità di deattivazione " τ_{DEACT} " che comprende: una componente rapida (τ_{FAST}) ed una lenta (τ_{SLOW}) e delle ampiezze A_i , anch'esse comprendenti una componente rapida (A_{FAST}) ed una lenta (A_{SLOW}), espressa come rapporto $A_{FAST}/(A_{FAST}+A_{SLOW})$ (Figura 19, cursori 1 e 2);

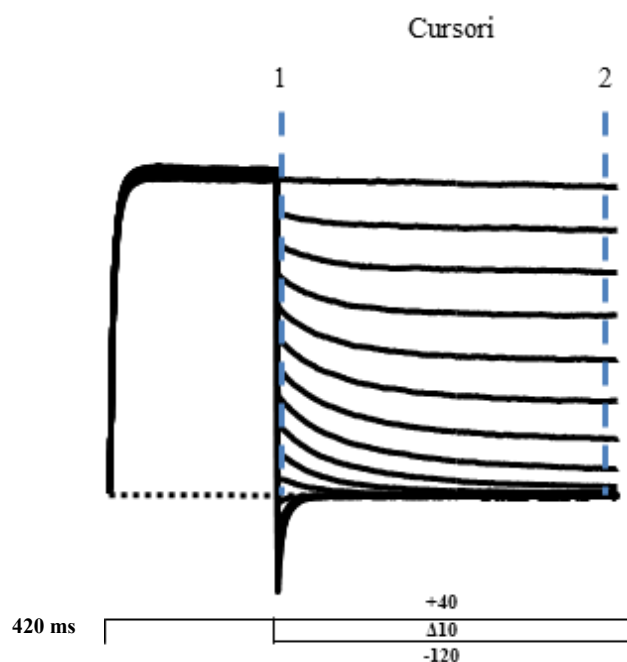


Figura 19: Protocollo di deattivazione. Esempio di tracce di corrente ottenute utilizzando il protocollo mostrato in basso. Sono mostrate le posizioni dei cursori utilizzati per l'analisi (barre azzurre).

3. **Protocollo di rampa:** sono state misurate le correnti espresse modificando il potenziale da -80 mV a 0 mV (Figura 20A) oppure da -80 a +40 mV (Figura 20B), in base alla variazione della voltaggio-dipendenza misurata tra canale WT e mutante, in 2.5 secondi; in soluzione controllo, in presenza di farmaco e dopo l'interruzione dello stesso. I dati sono stati espressi come % della densità di corrente misurata in presenza di farmaco rispetto alla soluzione controllo.

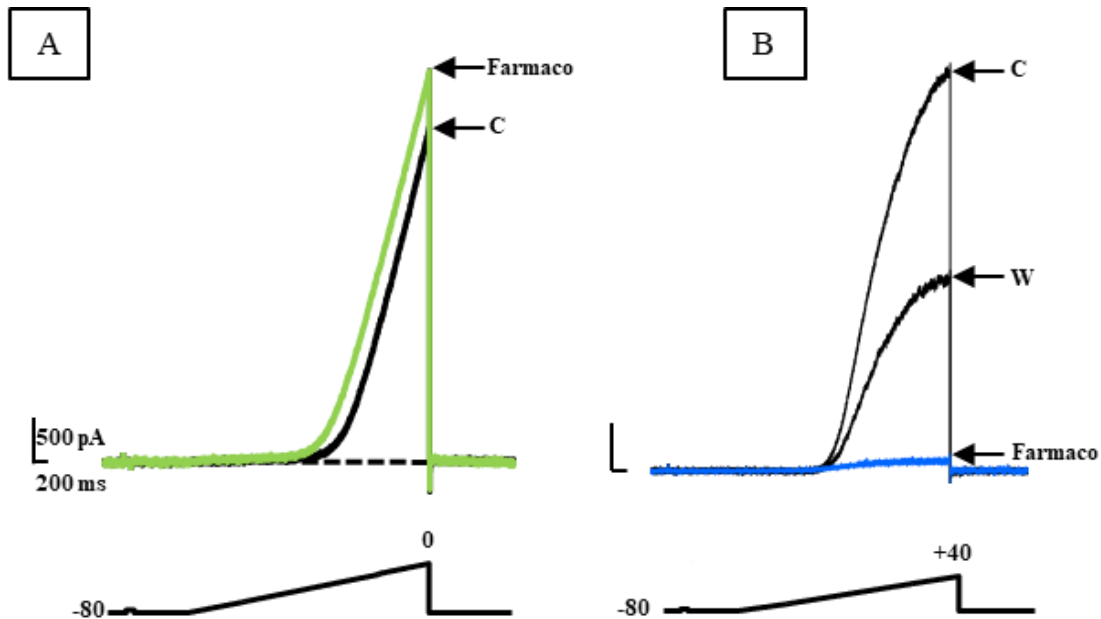


Figura 20. Protocollo di rampa. Esempi di correnti misurate tramite i rispettivi protocolli mostrati in basso, su cellule esprimenti KCNB1 wild-type, in soluzione controllo (C), dopo 2-3 min di esposizione del farmaco (verde o blu), e dopo washout (W).

3.7 Preparazione dei farmaci utilizzati

I farmaci utilizzati nel corso degli esperimenti sono stati preparati come soluzioni stock concentrate e successivamente diluite nella soluzione extracellulare alla concentrazione finale desiderata immediatamente prima dell'uso. La **fluoxetina** (Thermo Fisher Scientific; CAS: 56296-78-7) è stata preparata come soluzione stock a 100 mM in dimetilsolfossido (DMSO) e utilizzata alle concentrazioni finali di 10 μ M per KCNT1 e 50 μ M per KCNB1. Il **cannabidiolo** (PhytoLab; CAS: 13956-29-1) è stato preparato come soluzione stock a 100 mM in DMSO e impiegato alla concentrazione finale di 10 μ M per entrambi i canali. La **metformina** (Sigma-Aldrich; CAS: 1115-70-4) è stata preparata come soluzione stock a 100 mM in metanolo e utilizzata alla concentrazione finale di 10 μ M. L'**oxotremorina** (gentilmente fornita dal Prof. Shapiro, Department of Cellular & Integrative Physiology, UTH, San Antonio, TX, USA) è stata disciolta in acqua per ottenere una soluzione stock a 100 mM e utilizzata a concentrazioni comprese tra 0.001 e 10 μ M. Per controllare eventuali effetti aspecifici dei solventi, la soluzione extracellulare utilizzata come controllo è stata corretta con i rispettivi solventi (DMSO o metanolo) alle stesse concentrazioni finali presenti nelle condizioni sperimentali.

3.8 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati espressi come valore medio $\pm$ errore standard medio. Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state valutate con il test *t* di Student; le differenze vengono considerate significative quando $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Studio delle proprietà funzionali e della sensibilità farmacologica di canali KCNT1 wild-type o incorporanti le varianti in studio

4.1.1 Ingegnerizzazione dei plasmidi incorporanti ciascuna variante in studio

Per studiare gli effetti funzionali indotti dalle tre varianti (R356W, R398Q e R428Q) in KCNT1 identificate in pazienti, sono state allestite delle reazioni di PCR, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Queste sono state poi usate per trasformare cellule batteriche competenti che, acquisivano la capacità di crescere su terreno selettivo (in questo caso, addizionato con kanamicina). Alcuni dei cloni sono stati, quindi, amplificati su piccola scala per valutare la presenza di ciascuna mutazione desiderata.

Per le varianti R356W e R428Q sono state selezionate 6 colonie, mentre per R398Q è stata ottenuta 1 colonia. Il corrispondente DNA plasmidico è stato digerito con gli enzimi EcoRI+HindIII, in grado di formare due frammenti, come dettagliato in Figura 21.

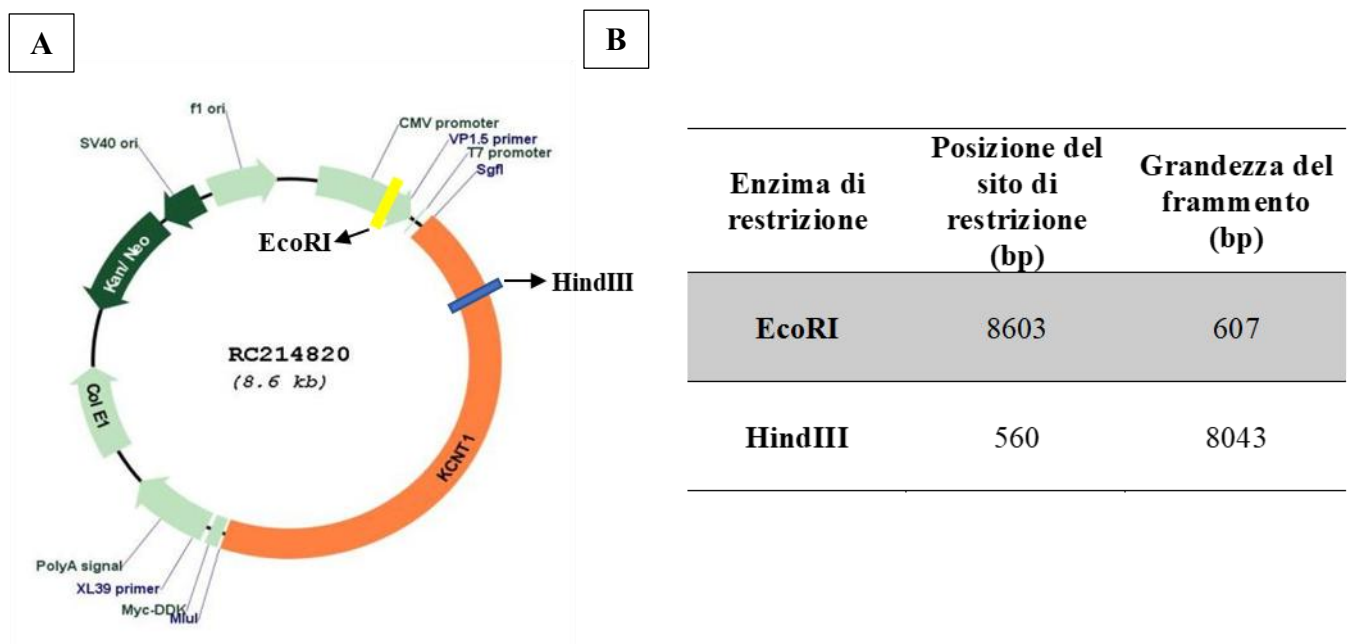


Figura 21. Analisi del plasmide codificante per KCNT1. A) Schema del plasmide incorporante il cDNA codificante per l'isoforma umana del canale KCNT1 wild-type (Origene, cod. RC214820). La cassetta KAN/NEO indica gli antibiotici kanamicina/neomicina verso i quali il plasmide induce resistenza. La barra gialla indica la posizione del sito di restrizione per EcoRI, mentre quella azzurra quello per HindIII. B) Analisi del plasmide mostrato in A in seguito al taglio con gli enzimi di restrizione indicati.

Tutte le digestioni sono state allestite utilizzando le seguenti condizioni:

	Templato (μl)	H₂O (μl)	EcoRI (μl)	HindIII (μl)	NEB2 (μl)	Volume finale (μl)
KCNT1 WT (100 ng/μl)	5	8	0.25	0.25	1.5	15
KCNT1 *	“	“	“	“	“	“

***= DNA plasmidico incorporante la variante R356W, R398Q o R428Q**

Insieme ad i campioni digeriti, sono stati caricati su gel anche gli stessi campioni non digeriti insieme al marker quantitativo λ /H (New England Biolabs; codice: N3012L) per avere una misura della concertazione del DNA plasmidico estratto.

Per la variante R356W l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNT1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita; il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si evince dalla Figura 22, la digestione del campione WT produce due frammenti di peso pari a ~ 8000 bp e 600 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione rispetto al campione WT, producendo dei frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati tutti inviati a sequenziamento per verificare la presenza della mutazione e l'assenza di altre non desiderate.

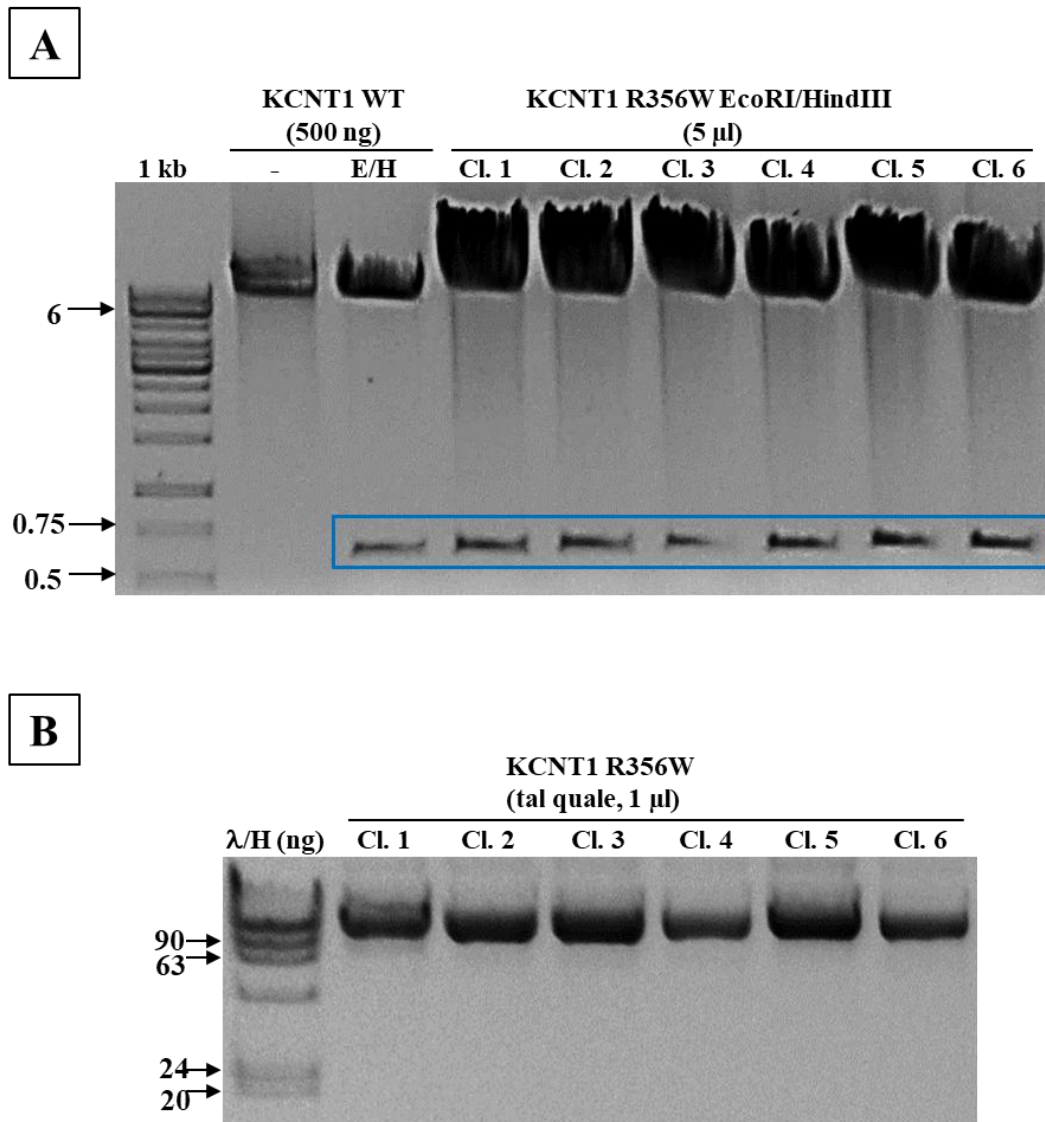


Figura 22. Analisi elettroforetica dei cloni KCNT1 (putativamente incorporanti la mutazione) R356W. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI/HindIII, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type. Il box azzurro evidenzia i frammenti di peso atteso, come dall'analisi riportata in figura 21. B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ/H.

Dall'analisi degli elettroferogrammi, si evince la presenza della mutazione c.1066C>T, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.R356W, per il clone 3 (Figura 23).

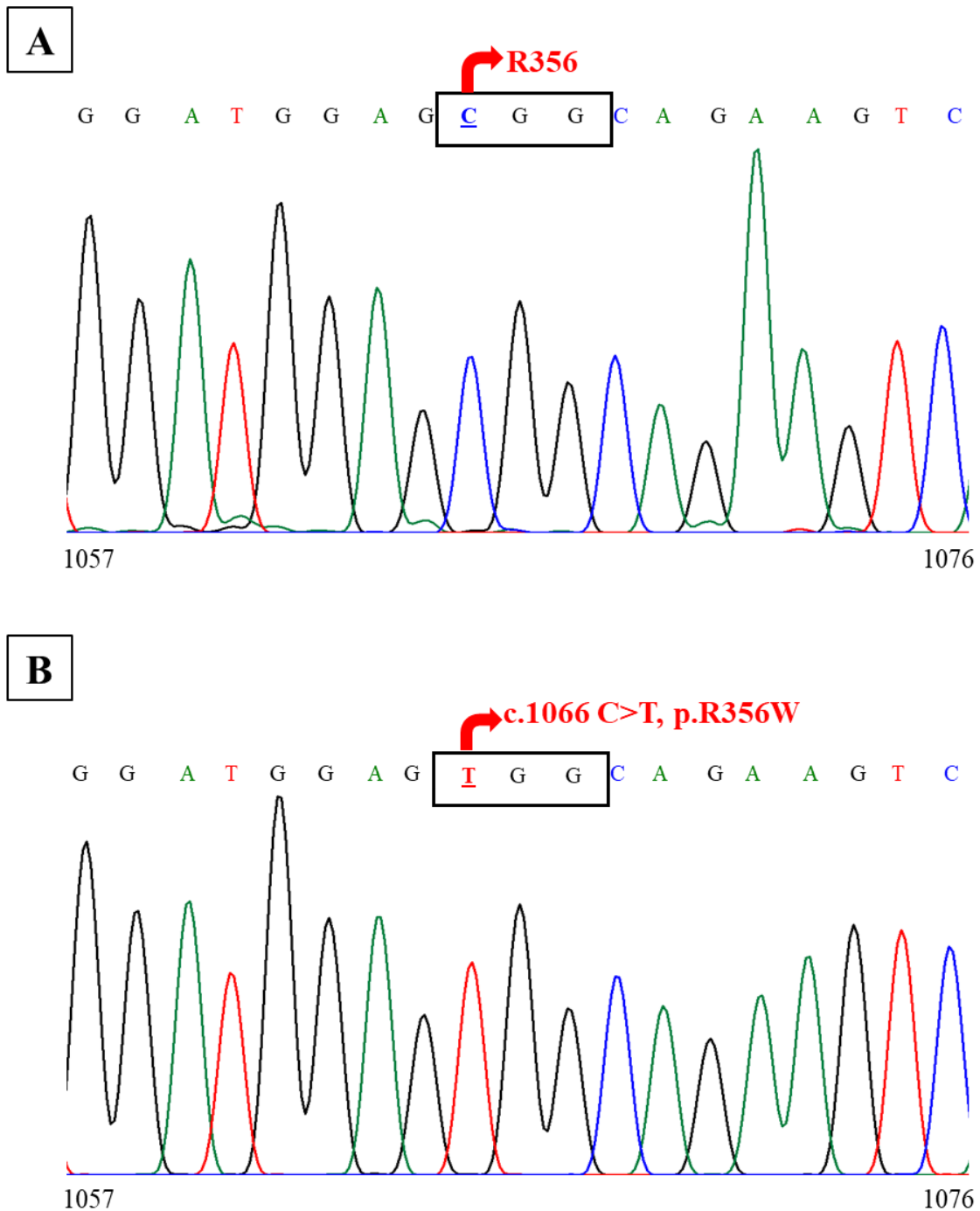


Figura 23. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNT1 wild-type o KCNT1 R356W. Porzione (da 1057 a 1076) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNT1 wild-type (A) o incorporante la mutazione R356W (B; clone 3 mostrato in figura 22A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo mutato.

Per la variante R398Q l'avvenuta digestione è stata valutata nello stesso modo della variante R356W. Come si può notare dalla Figura 24, la digestione del campione WT produce, anche in questo caso, due frammenti di peso pari a ~ 8000 bp e 600 bp; ed il campione presenta lo stesso pattern di digestione del campione WT, per cui il campione è stato inviato a sequenziamento.

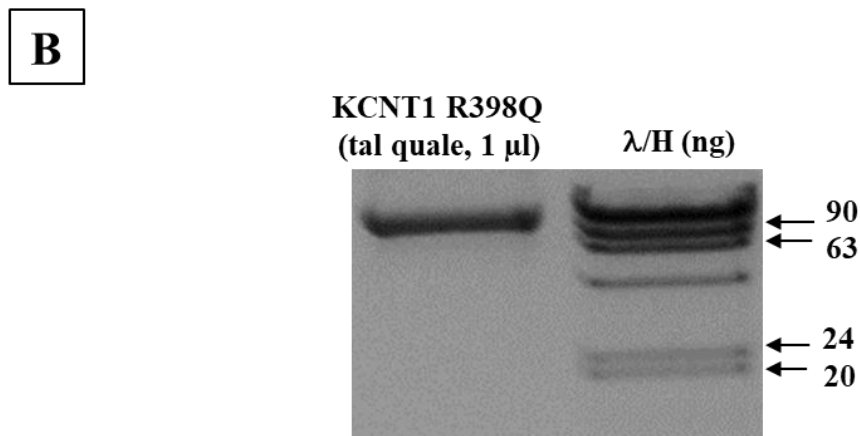
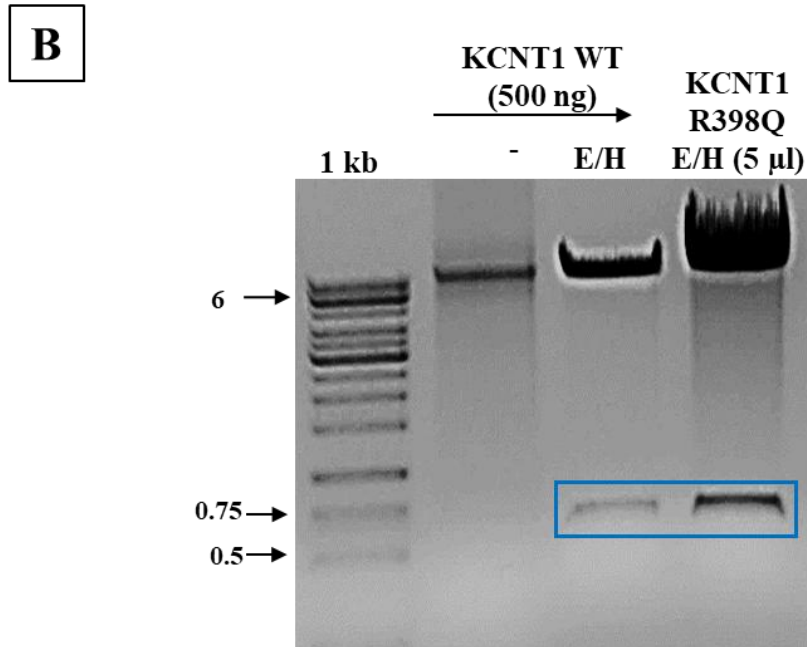


Figura 24. Analisi elettroforetica del clone KCNT1 (putativamente incorporante la mutazione) R398Q. A) Separazione elettroforetica del clone digerito con EcoRI/HindIII, confrontato con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type. Il box azzurro evidenzia i frammenti di peso atteso, come dall'analisi riportata in figura 21. B) Separazione elettroforetica del clone non digerito confrontato con il marker quantitativo λ /H.

Similmente, si evince la presenza della mutazione c.1193G>A, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.R398Q, per il clone 1 (Figura 25).

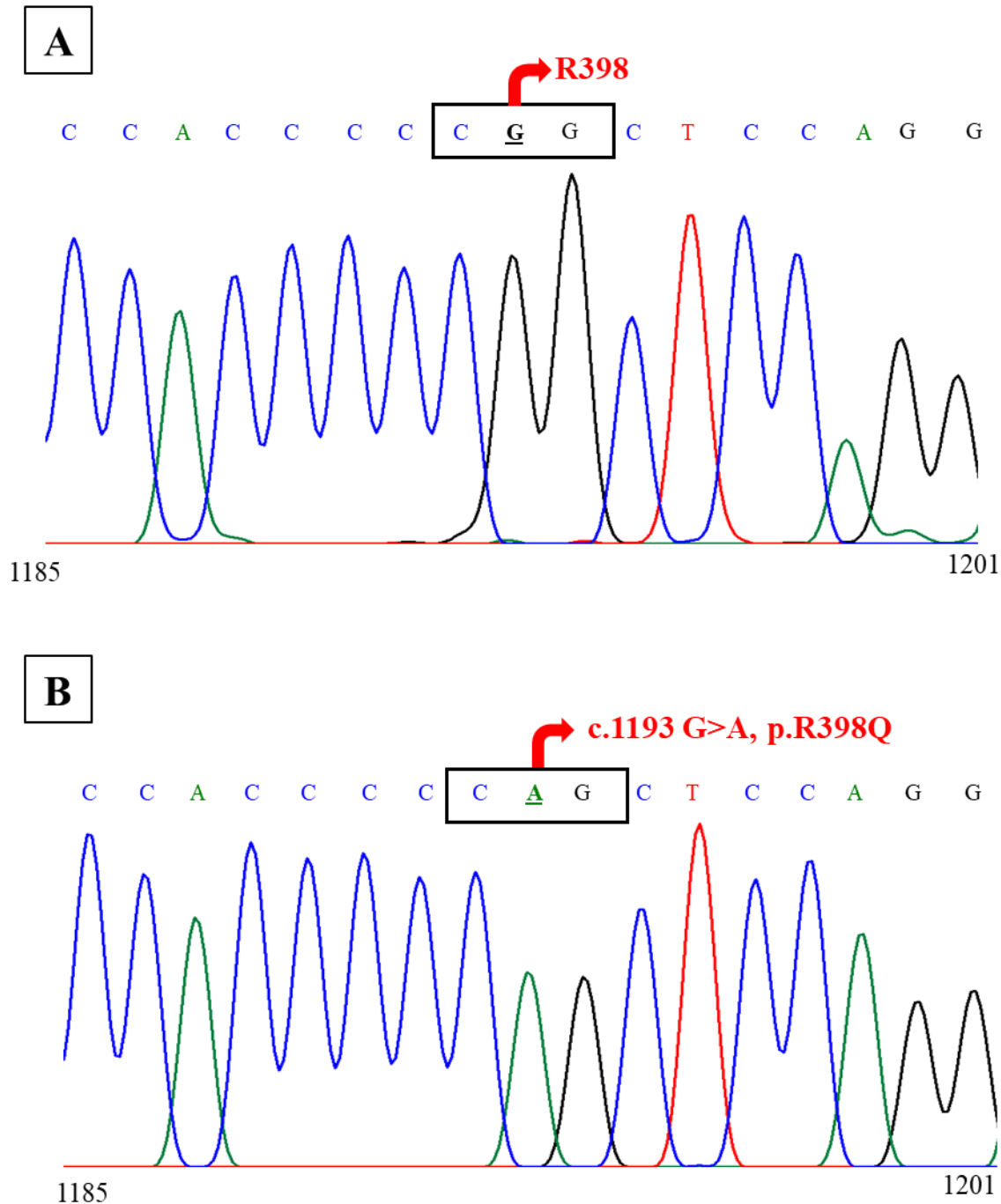


Figura 25. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNT1 wild-type o KCNT1 R398Q. Porzione (da 1185 a 1201) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNT1 wild-type (A) o incorporante la mutazione R398Q (B; clone 1 mostrato in figura 24A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo mutato.

Anche la reazione di digestione della variante R428Q è stata valutata confrontando il campione KCNT1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita, il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Il campione WT produce i frammenti attesi di peso pari a ~ 8000 bp e 600 bp come mostrato in Figura 26 e tutti i campioni mostrano lo stesso pattern di digestione del campione WT indicando che la digestione è avvenuta in maniera corretta per tutti i campioni, per cui tutti sono stati inviati a sequenziamento.

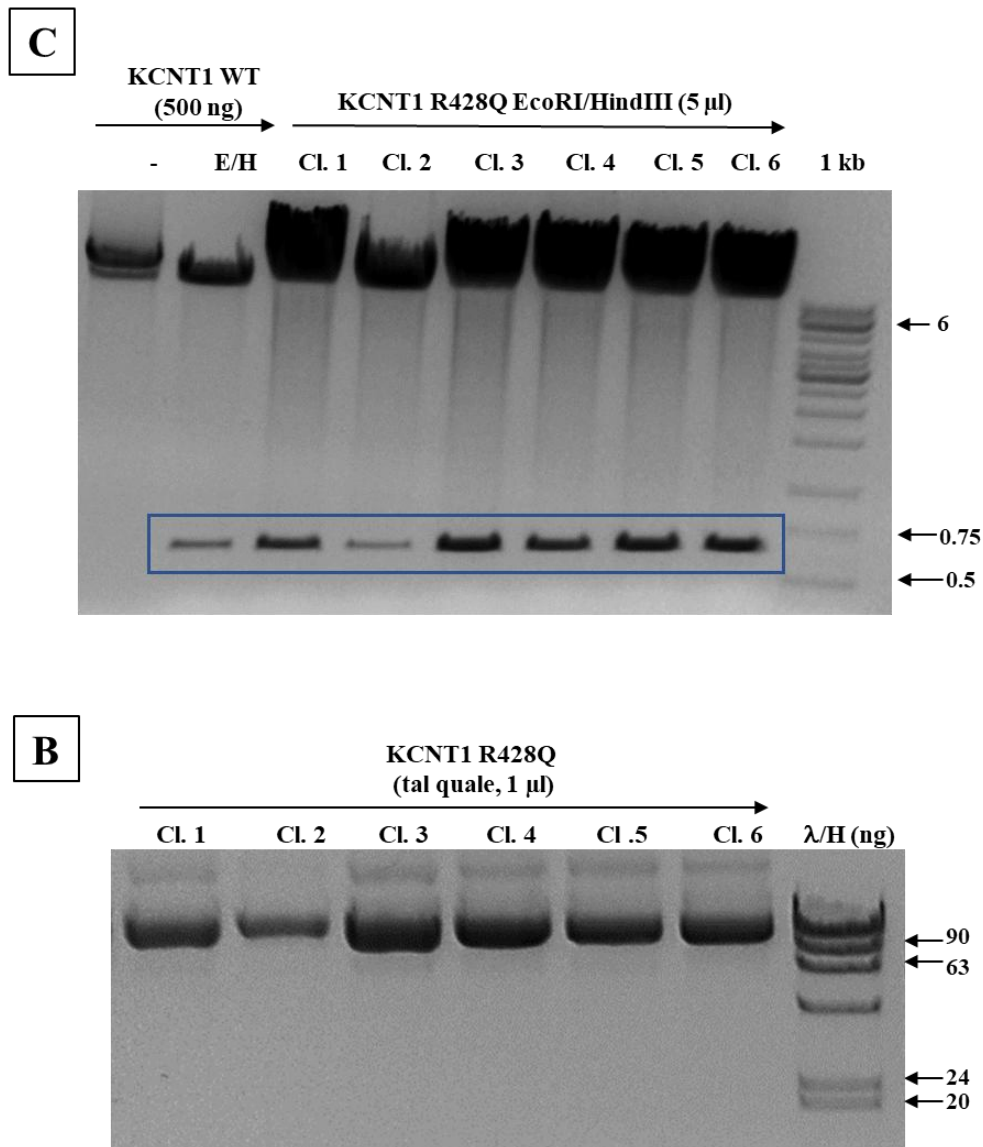


Figura 26. Analisi elettroforetica dei cloni KCNT1 (putativamente incorporanti la mutazione) R428Q. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI/HindIII, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type. Il box azzurro evidenzia i frammenti di peso atteso, come atteso dall'analisi riportata in figura 21. B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ/H.

Anche in questo caso, dagli elettroferogrammi, si evince la presenza della mutazione c.1283G>A, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.R428Q, per il clone 2 (Figura 27).

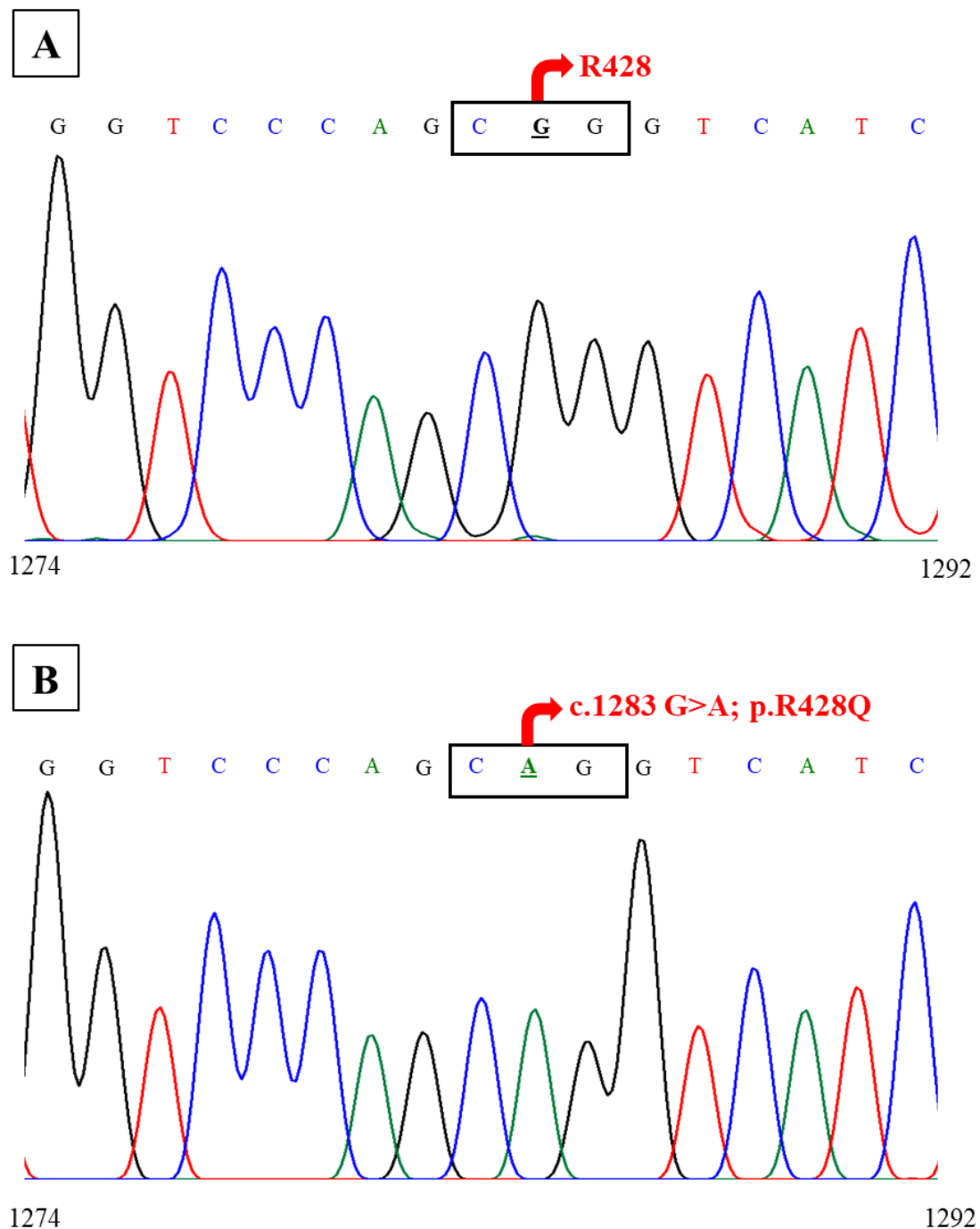


Figura 27. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNT1 wild-type o KCNT1 R428Q. Porzione (da 1274 a 1292) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNT1 wild-type (A) o incorporante la mutazione R428Q (B; clone 2 mostrato in figura 26A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo mutato.

4.1.2 Quantificazione del DNA plasmidico ottenuto mediante ciascuna procedura di maxi-prep

I cloni risultati positivi al sequenziamento, sono stati utilizzati per preparazioni su larga scala (maxi-prep) che sono state successivamente quantizzate mediante lettura spettrofotometrica. I risultati ottenuti per ciascuna maxi-prep sono riportati in Tabella 8:

Tabella 8: **Quantificazione spettrofotometrica dei prodotti di maxi-prep ottenuti per ciascuna variante**

KCNT1-R356W				
μl	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260nm} / OD _{280nm}	Concentrazione (ng/ μl)
1 μl	0.0310	0.0137	2.3	1085
2 μl	0.0905	0.0457	2.0	1583.75
4 μl	0.2071	0.1085	1.9	1812.125
Concentrazione finale = 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$				
KCNT1-R398Q				
μl	OD _{260nm}	OD _{280nm}	Ratio	Concentrazione ng/ μl
1 μl	0.0399	0.0185	2.2	1396.5
2 μl	0.0721	0.0361	2.0	1261.75
4 μl	0.2752	0.1477	1.9	2408
Concentrazione finale = 1.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$				
KCNT1-R428Q				
μl	OD _{260nm}	OD _{280nm}	Ratio	Concentrazione ng/ μl
1 μl	0.0631	0.0334	1.9	2208.5
2 μl	0.1169	0.0597	2.0	2045.75
4 μl	0.2519	0.1318	1.9	2204.125
Concentrazione finale = 2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$				

Poiché le letture a 260 nm e a 280 nm sono risultate lineari rispetto all'aumento di volume del campione, si è proceduto al calcolo del *ratio*, ovvero il rapporto OD₂₆₀/OD₂₈₀ ed al calcolo della concentrazione ottenuta moltiplicando il valore ottenuto per il fattore di diluizione e per 50 (1 μg DNA=50 OD). Quindi per ottenere la concentrazione finale è stata fatta una media delle concentrazioni ottenute ai diversi volumi.

4.1.3 Caratterizzazione funzionale e farmacologica dei canali KCNT1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio

Le cellule trasfettate sono state utilizzate per esperimenti di elettrofisiologia al fine di valutare gli effetti indotti dalle varianti in studio sul canale WT.

In particolare, i canali KCNT1 WT esprimono forti correnti uscenti, con una densità massima a +60 mV pari a 143.65 ± 26.92 pA/pF ($n=12-61$); normalizzando e fittando tali correnti all'equazione di Boltzmann sono stati ricavati i valori di $V_{1/2}$ e la pendenza della curva (k) che misuravano 17.77 ± 4.10 mV e 24.01 ± 1.90 mV/efold, rispettivamente. L'attivazione dei canali WT ha mostrato la presenza di una componente istantanea tempo-indipendente, seguita da una tempo-dipendente; il rapporto tra queste due componenti ($I_{\text{inst}}/I_{\text{steady-state}}$) è pari a 0.24 ± 0.01 .

Dagli esperimenti condotti sui canali mutanti è emerso che ciascuna variante induce: aumento della densità di corrente (Figura 28A-B), spostamento della voltaggio-dipendenza verso valori più negativi (Figura 28C) ed aumento della componente istantanea (Figura 28D) rispetto al canale WT, suggerendo effetti di guadagno di funzione (GoF).

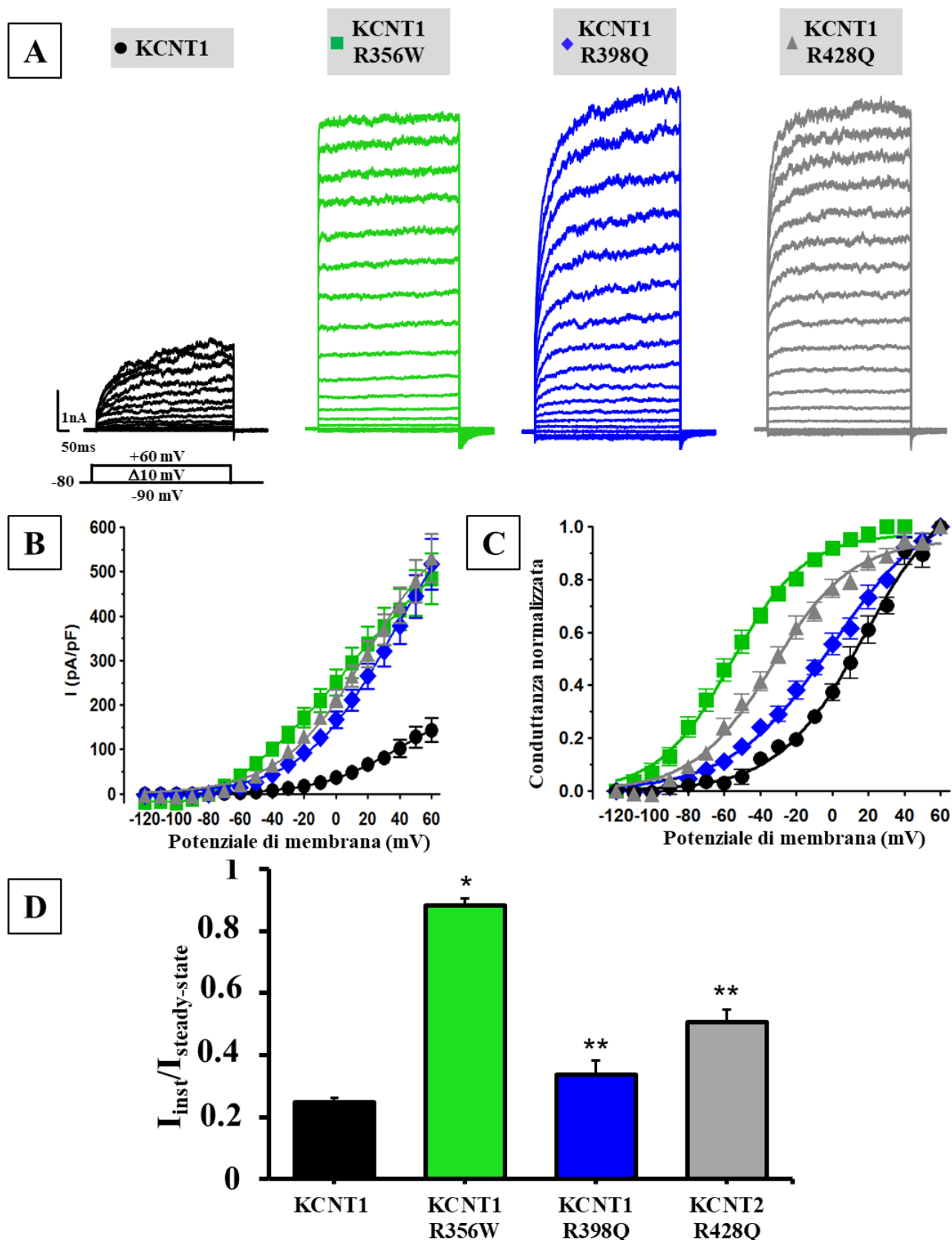


Figura 28. Analisi funzionale dei canali KCNT1 WT o mutanti. A) Tracce di corrente rappresentative misurate in cellule CHO esprimenti KCNT1 WT o i canali mutanti indicati, in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in figura. B, C, D) Quantificazione delle densità di corrente (B), della conduttanza (C) o della componente istantanea (D). * = $p < 0.05$ vs KCNT1; ** = $p < 0.05$ vs KCNT1 e KCNT1 R356W.

Le proprietà funzionali dei canali KCNT1 WT o mutanti sono riassunti in Tabella 9.

Tabella 9. **Proprietà biofisiche dei canali WT o incorporanti ciascuna variante.**

CANALE	n	Densità di corrente a +60 mV (pA/pF)	V _{1/2} (mV)	k (mV/efold)	I _{inst} /I _{steady-state}
KCNT1 WT	12-61	143.65±26.92	17.77±4.10	24.01±1.90	0.24±0.01
KCNT1 R356W	13	484.46±57.03*	-56.02±1.92*	20.18±1.92	0.88±0.02*
KCNT1 R398Q	16-17	517.24±57.19*	-0.57±3.03*	27.93±1.57	0.34±0.05*
KCNT1 R428Q	15-19	513.25±54.76*	-33.16±1.85*	22.06±1.32	0.50±0.04*

*= $p < 0.05$ vs KCNT1 WT

Allo scopo di revertire gli effetti GoF indotti dalle varianti, sono stati condotti ulteriori esperimenti di elettrofisiologia in presenza di bloccanti dei canali KCNT. Dalla letteratura è emerso che il farmaco antidepressivo fluoxetina (FLX) è in grado di bloccare le correnti espresse da diversi canali del K⁺ (Ambrosino *et al.*, 2023; Soldovieri *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2020), tra cui anche il canale KCNT2 (Cioclu *et al.*, 2023). Pertanto, sulla base dell'elevata omologia di sequenza tra i due canali, tale farmaco è stato testato anche sui canali KCNT1 WT o mutanti. Come mostrato in Figura 29, l'esposizione a 10 µM FLX dei canali WT produce una diminuzione della corrente del 75.0±3.4% (n=12); quando testato sui canali mutanti, il farmaco ha mostrato un effetto di blocco maggiore rispetto al canale WT. Inoltre, sia per i canali wild-type che mutanti l'effetto della FLX è stato reversibile (Tabella 10, Figura 29B).

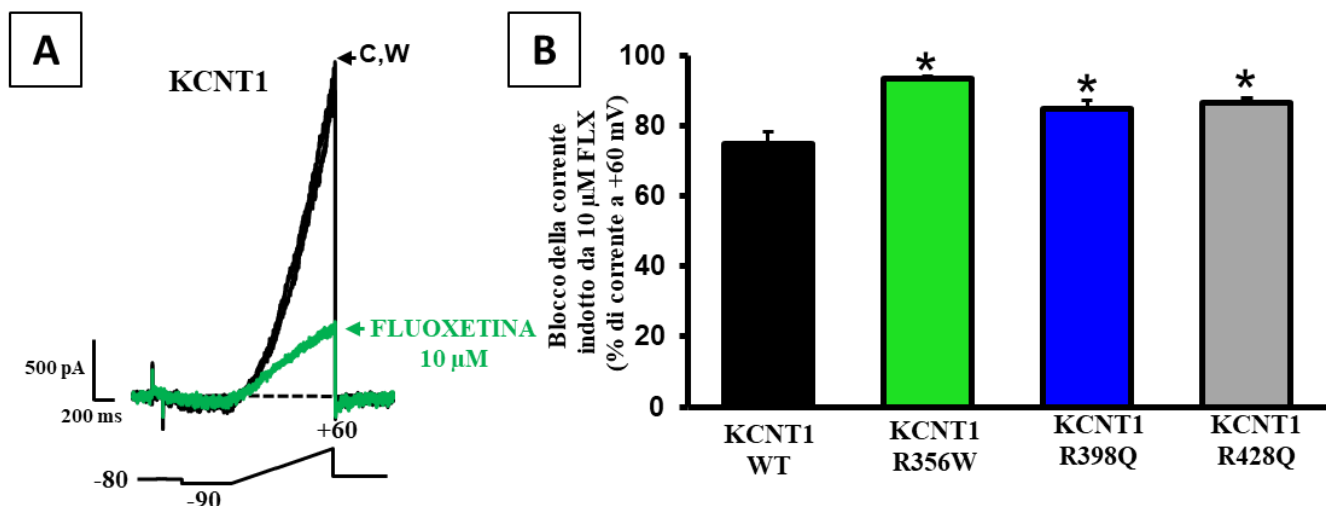


Figura 29. Proprietà farmacologiche dei canali WT o mutanti. A) Tracce di corrente espresse dal canale KCNT1 WT in soluzione controllo (C), dopo 2'-3' di esposizione a 10 μM FLX (in verde) o dopo washout (W). B) Percentuale di inibizione della corrente espressa a +60 mV in soluzione di controllo dai canali indicati. * = $p < 0.05$ vs KCNT1 WT.

Tabella 10. Proprietà farmacologiche dei canali KCNT1 WT o incorporanti ciascuna variante in studio.

Variante	n	Effetto del farmaco (% di blocco della corrente a +60 mV)
KCNT1 WT	12	75.0% ± 3.4
KCNT1 R356W	13	93.5% ± 0.6*
KCNT1 R398Q	17	84.7% ± 2.5*
KCNT1 R428Q	15	86.6% ± 1.3*

Sulla base di tali risultati, i clinici che hanno individuato tali pazienti hanno ritenuto opportuno iniziare ad aggiungere il farmaco fluoxetina al loro trattamento standard, riscontrando un generale miglioramento cognitivo, dell'umore e del comportamento e, nel caso del paziente portatore della variante R398Q, una significativa riduzione delle crisi epilettiche (>75%).

4.1.4 Studio della modulazione delle correnti di KCNT1 in seguito ad attivazione del recettore muscarinico M1

Per studiare la modulazione delle correnti espresse dal canale KCNT1 da parte del recettore muscarinico M1, sono stati condotti esperimenti in cellule CHO co-esprimenti KCNT1 con M1R. L'obiettivo era valutare l'effetto dell'agonista Oxotremorina-M (Oxo-M) sulla corrente espressa dai canali KCNT1 e determinare se mutazioni patogenetiche del canale potessero alterare la risposta farmacologica. Questi esperimenti permettono di distinguere tra effetti diretti sul canale e modulazioni mediate da pathway recettoriali, fornendo informazioni cruciali per la comprensione della fisiopatologia di KCNT1 e per l'identificazione di possibili target terapeutici. Quando diverse concentrazioni di Oxo-M (0.001-10 μ M) sono state perfuse su cellule CHO esprimenti KCNT1+M1 è stata misurata una significativa diminuzione della corrente, con una percentuale di inibizione delle correnti a +60 mV pari a $84.4 \pm 2.3\%$ (n=15; Figura 30A) e IC_{50} pari a 50 ± 20 nM (n=24, Figura 30B). Quando il test veniva effettuato su cellule co-esprimenti KCNT1-R356W+M1R, è stata osservata una significativa riduzione della corrente inibita ($57.9 \pm 2.3\%$; n=11; $p < 0.05$ vs KCNT1+M1R; Figura 30A), senza variazioni significative di IC_{50} (60 ± 10 nM; n=26; $p > 0.05$; Figura 30B). Come controllo, non è stato misurato alcun effetto significativo quando l'Oxo-M (10 μ M) è stata perfusa su cellule che esprimevano solo subunità KCNT1 WT (le correnti massime a +60 mV erano 312.6 ± 71.0 pA o 276.5 ± 61.9 pA nella soluzione di controllo o dopo esposizione a 10 μ M Oxo-M, rispettivamente; n=12-14; $p > 0.05$), escludendo così un effetto di blocco diretto indotto da Oxo-M sulle correnti KCNT1.

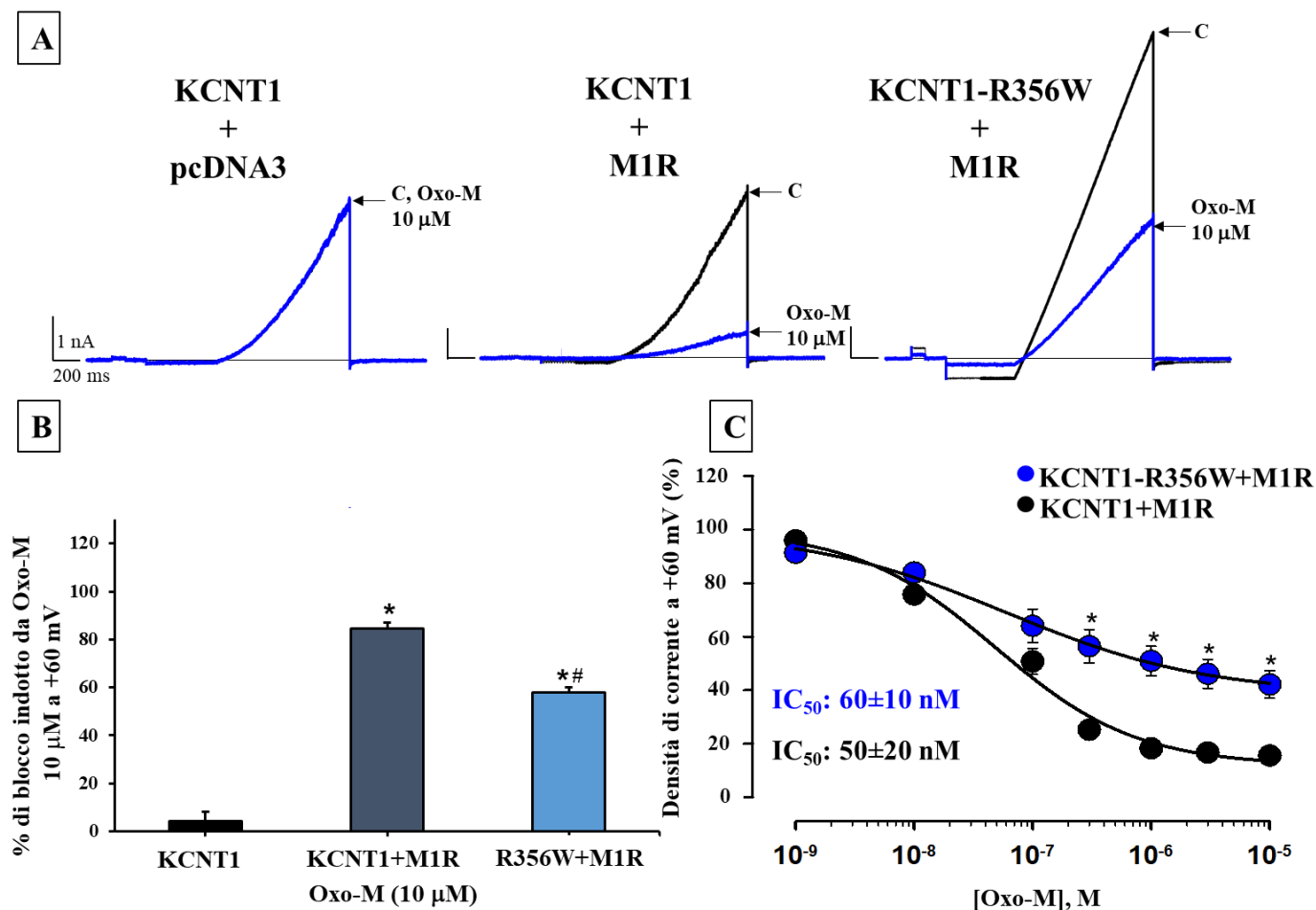


Figura 30. Studio degli effetti prodotti dell'Oxo-M su cellule esprimenti KCNT1+M1R o KCNT1+R356W+M1R. A) Tracce di corrente espresse dai canali indicati, secondo il protocollo riportato in basso, in soluzione controllo (C) e dopo 2'-3' di esposizione a 10 μ M Oxo-M (in blu). B) Quantificazione della corrente residua espressa dai canali indicati dopo la perfusione di Oxo-M (10 μ M; * = $p < 0.05$ vs KCNT1, # = $p < 0.05$ vs KCNT1+M1R). C) curve concentrazione-risposta dell'effetto di inibizione indotto da Oxo-M (0.001-10 μ M) sulle correnti espresse dai canali indicati (* = $p < 0.05$ vs la stessa concentrazione in KCNT1+M1R).

4.2 Studio delle proprietà funzionali e della sensibilità farmacologica di canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio

4.2.1 Ingegnerizzazione dei plasmidi incorporanti ciascuna variante in studio

Per studiare le dieci varianti (L35P, E180G, I204Tfs*38, R306C, R312C, R312H, V349F, W369*, Y380C e I412T) in KCNB1 identificate in pazienti, sono state allestite delle reazioni di PCR, come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*. Queste sono state poi usate per trasformare cellule batteriche competenti che, acquisivano la capacità di crescere su terreno selettivo (in questo caso, addizionato con ampicillina). Alcuni dei cloni sono stati, quindi, amplificati su piccola scala per valutare la presenza di ciascuna mutazione desiderata. Per ciascuna variante sono state selezionate 6 colonie, ad eccezione della variante R312H per cui sono state selezionate 12 colonie. Il corrispondente DNA plasmidico è stato digerito con l'enzima EcoRI, in grado di formare tre frammenti, come dettagliato in Figura 31.

Enzima di restrizione	Posizione del sito di restrizione (bp)	Grandezza del frammento (bp)
EcoRI	910	959
	4490	3580
	9086	4596

Figura 31. Analisi del plasmide codificante per KCNB1. Analisi dei frammenti attesi, del plasmide utilizzato per i canali KCNB1, in seguito al taglio con l'enzima di restrizione EcoRI.

Tutte le digestioni sono state allestite utilizzando le seguenti condizioni:

	Templato (µl)	H ₂ O (µl)	EcoRI (µl)	NEB2 (µl)	Volume finale (µl)
KCNB1 WT (100 ng/µl)	5	8.25	0.25	1.5	15
KCNB1*	“	“	“	“	“

*= DNA plasmidico (potenzialmente) incorporante le varianti L35P, E180G, I204Tfs*38, R306C, R312C, R312H, V349F, W369*, Y380C o I412T

Per la variante L35P l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita. Il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si evince dalla Figura 32, la digestione del campione WT produce tre frammenti di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione rispetto al campione WT, producendo dei frammenti della lunghezza attesa, oltre a frammenti di peso maggiore probabilmente associabili ad una più elevata concentrazione del DNA plasmidico e quindi ad una digestione enzimatica non avvenuta completamente; pertanto, tutti i campioni sono stati inviati a sequenziamento per verificare la presenza della mutazione e l'assenza di altre non desiderate. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ /H, Figura 32B).

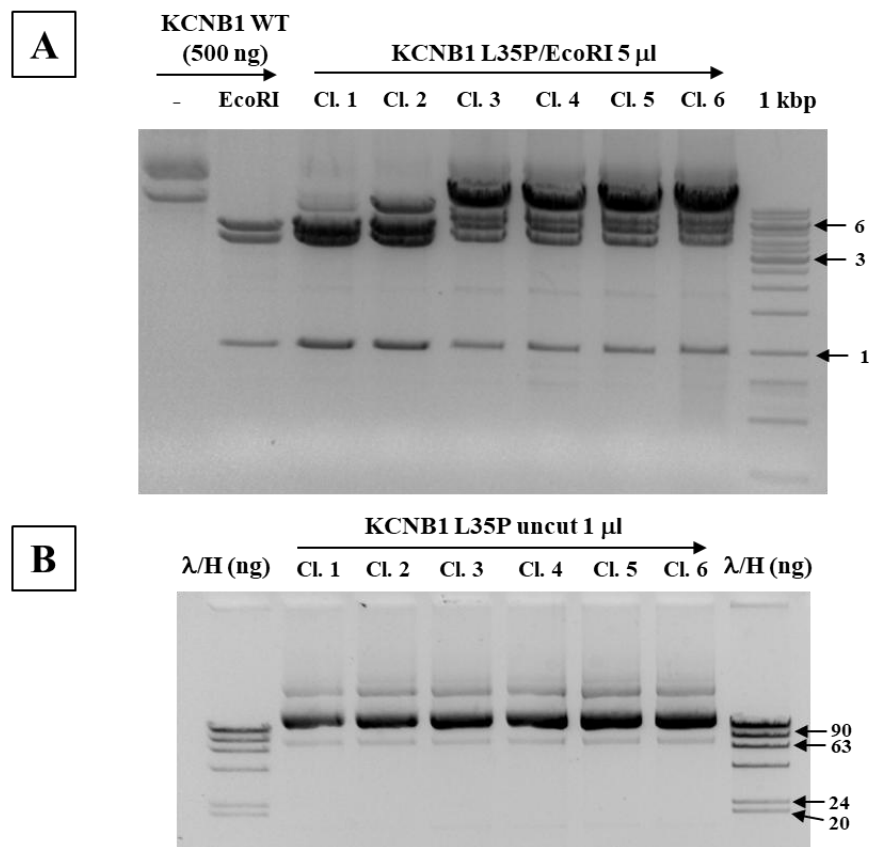


Figura 32. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) L35P. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kbp ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ /H.

Dall'analisi degli elettroferogrammi, si evince la presenza della mutazione c.104 T>C, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.L35P, per il clone 1 (Figura 33).

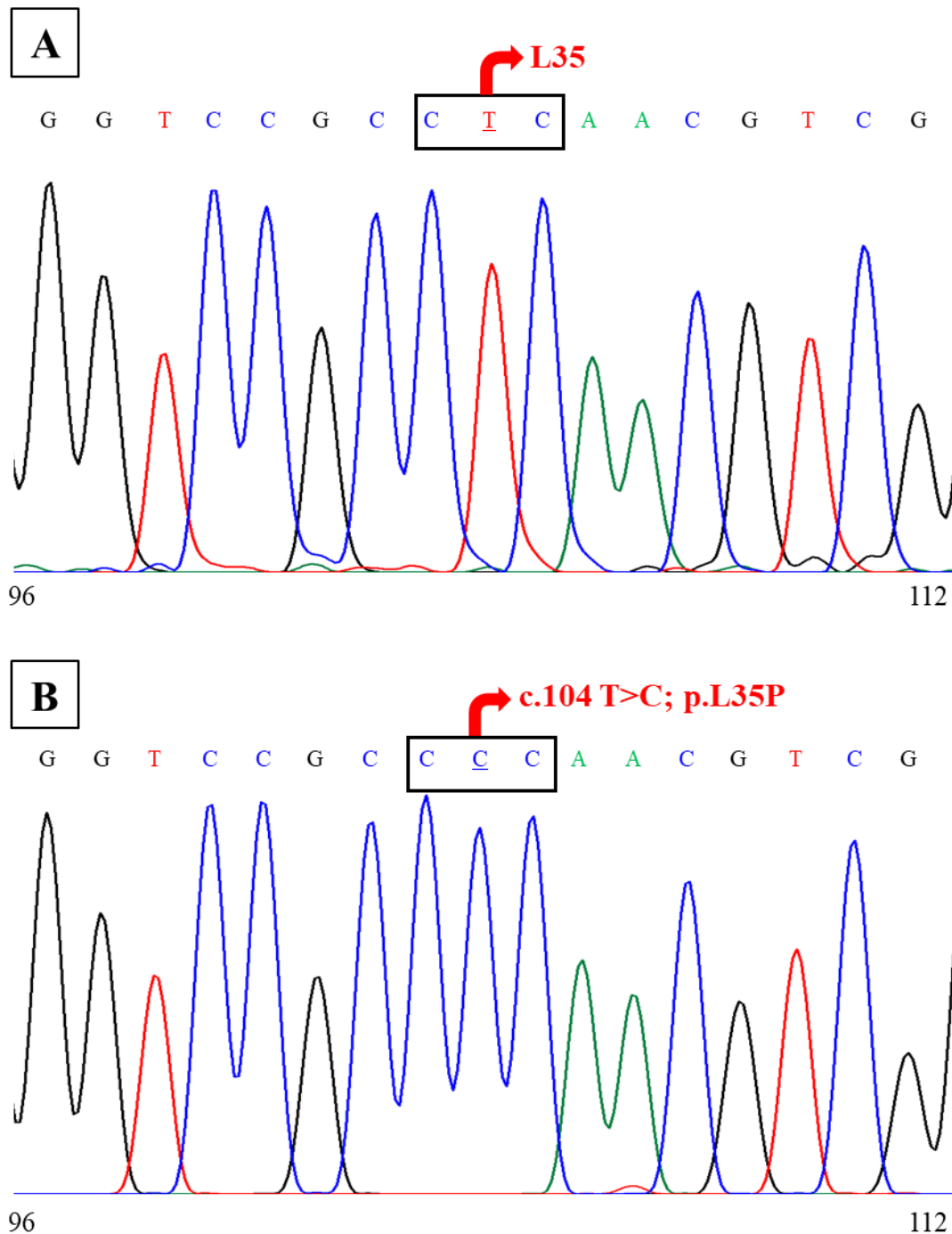


Figura 33. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 L35P. Porzione (da 96 a 112) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione L35P (B; clone 1 mostrato in figura 32A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Anche per la variante E180G l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita. Il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si può osservare dalla Figura 34, la digestione del campione WT ha prodotto i tre frammenti attesi di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati tutti inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ/H , Figura 34B).

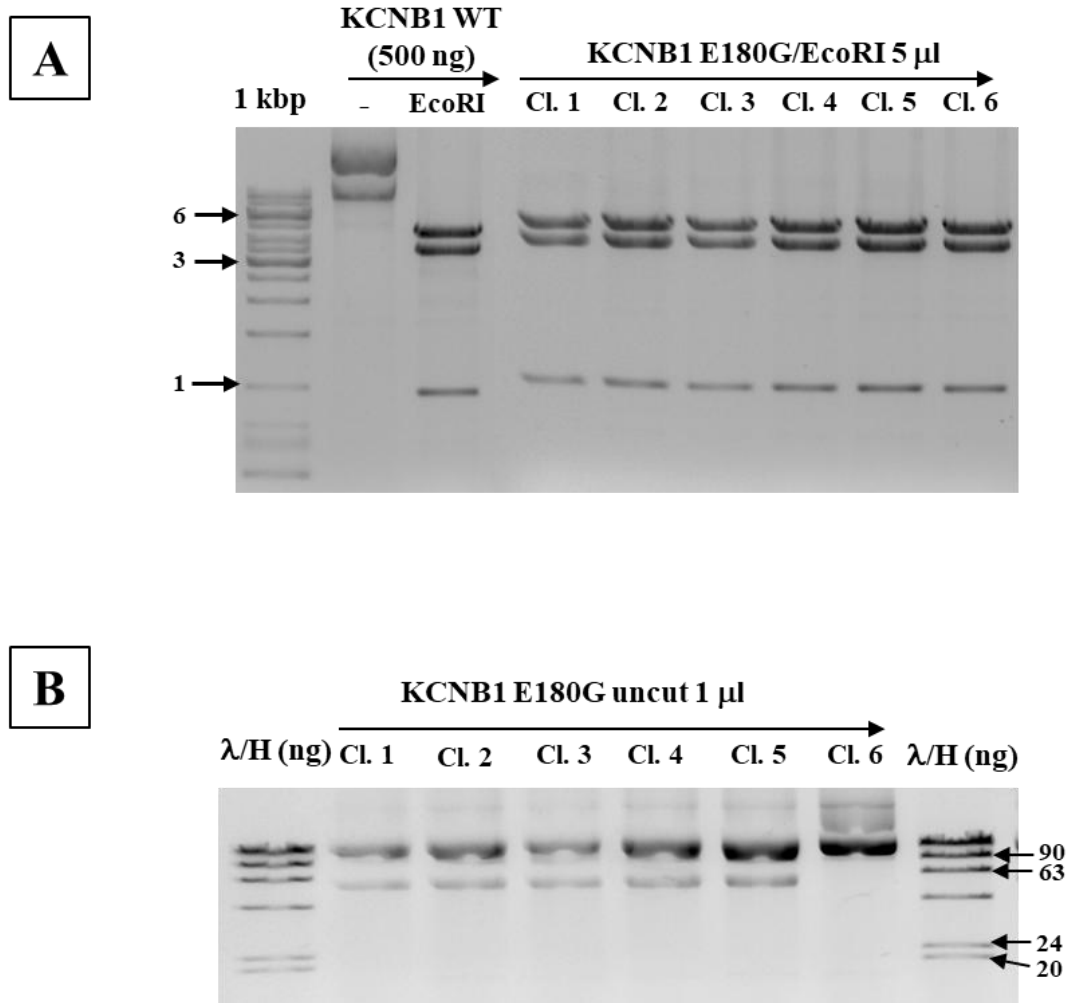


Figura 34. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) E180G. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ/H .

Dall'analisi degli elettroferogrammi, si evince la presenza della mutazione c.539A>G, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.E180G, per il clone 1 (Figura 35).

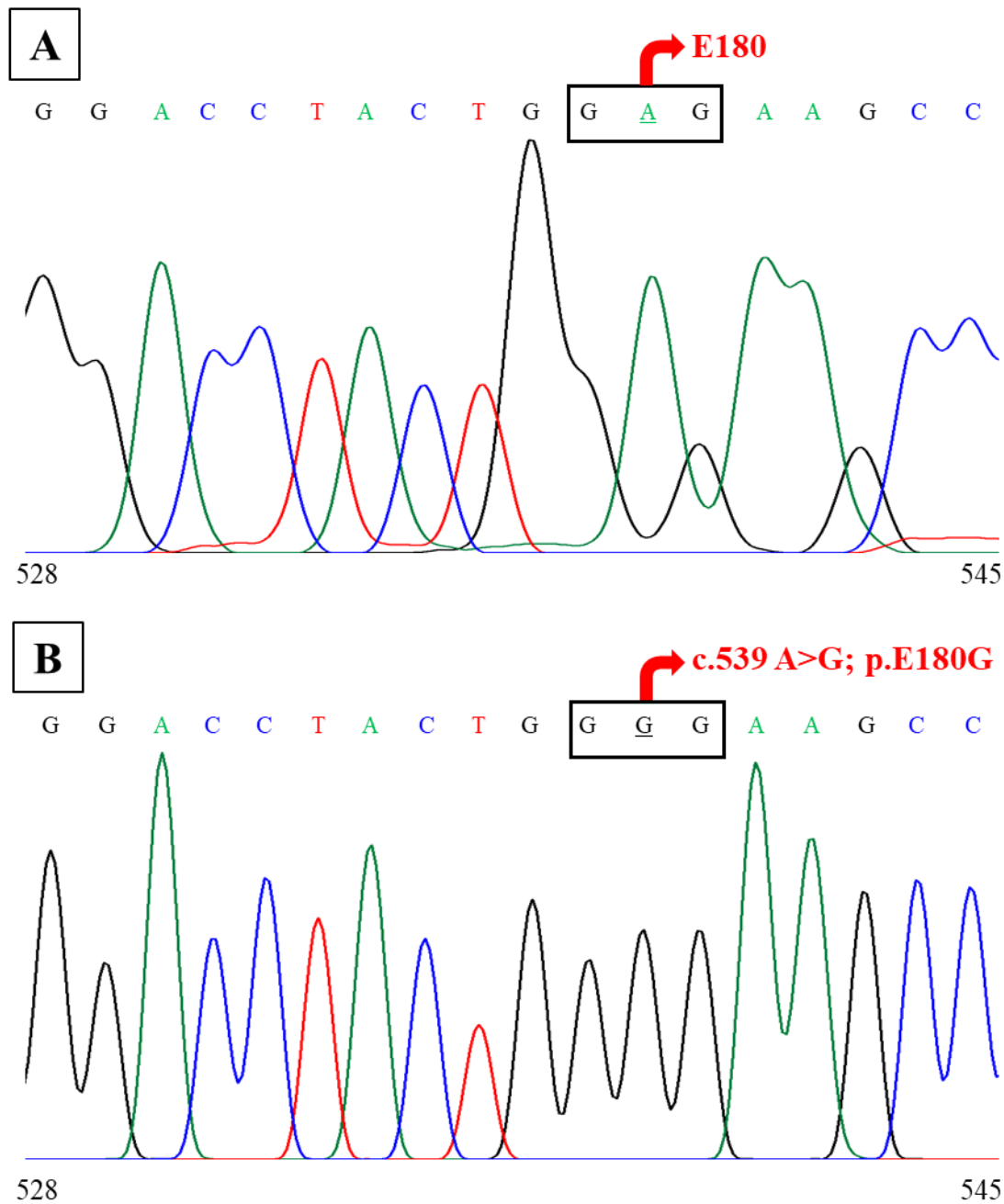


Figura 35. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 E180G. Porzione (da 528 a 545) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione E180G (B; clone 1 mostrato in figura 34A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Il plasmide ingegnerizzato dall'azienda Azenta, contenente la variante I204Tfs*38, è stato sottoposto a sequenziamento per verificare la correttezza della mutagenesi. Dall'elettroferogramma si evince la delezione di 16 nucleotidi (Figura 36A) che causa un cambiamento della cornice di lettura (Figura 36B, 37).

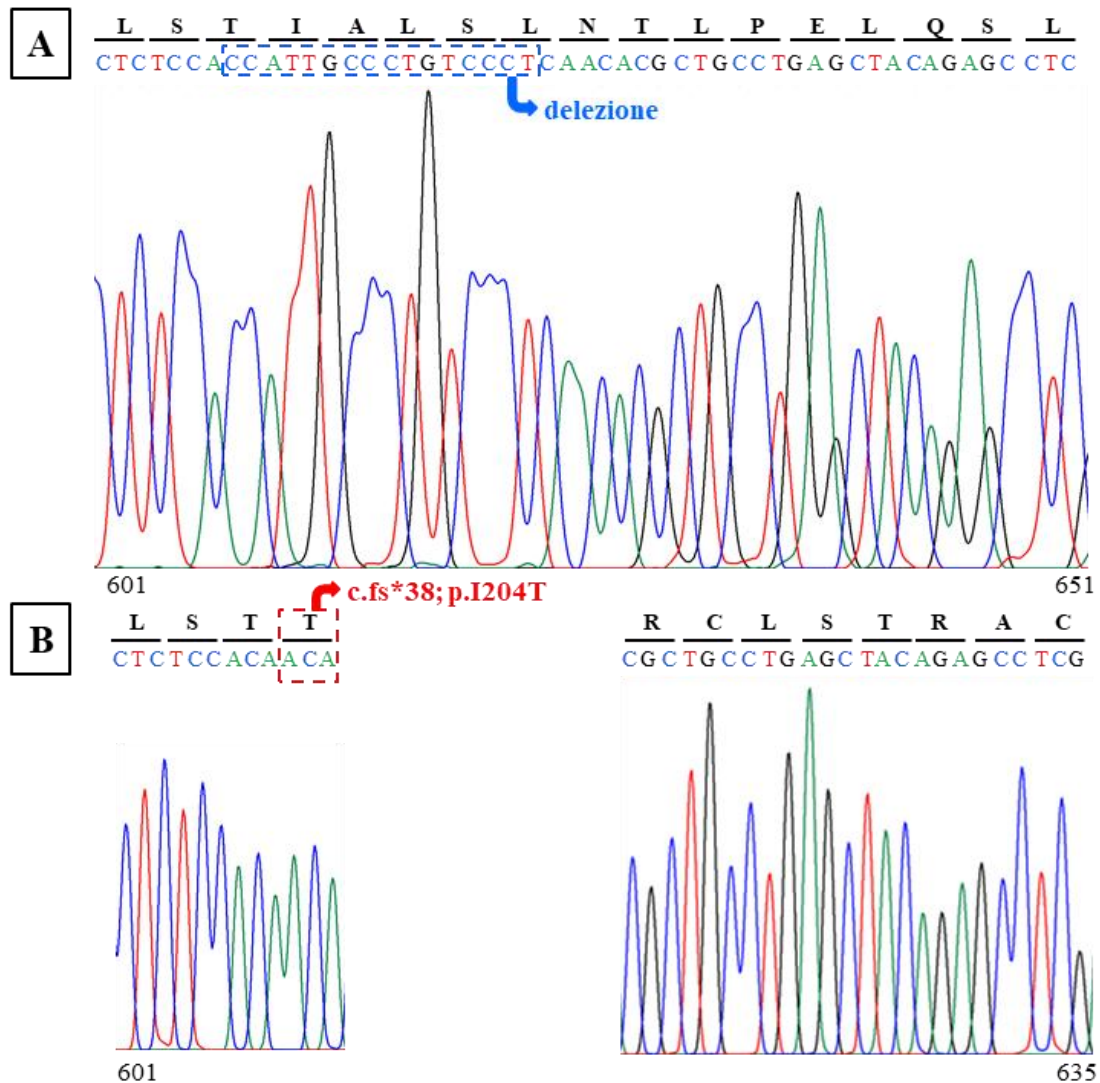


Figura 36. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 I204Tfs*38. A) Porzione degli elettroferogrammi (riportata in basso in ciascun elettroferogramma) ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type, in cui la linea blu tratteggiata indica i nucleotidi deleti. Le linee nere indicano la tripletta che codifica per l'amminoacido sopra indicato. B) Porzione degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide incorporante la mutazione I204Tfs*38, in cui il box rosso tratteggiato indicava sostituzione amminoacidica I>T, mentre le linee nere indicano la tripletta che codifica per l'amminoacido sopra riportato.

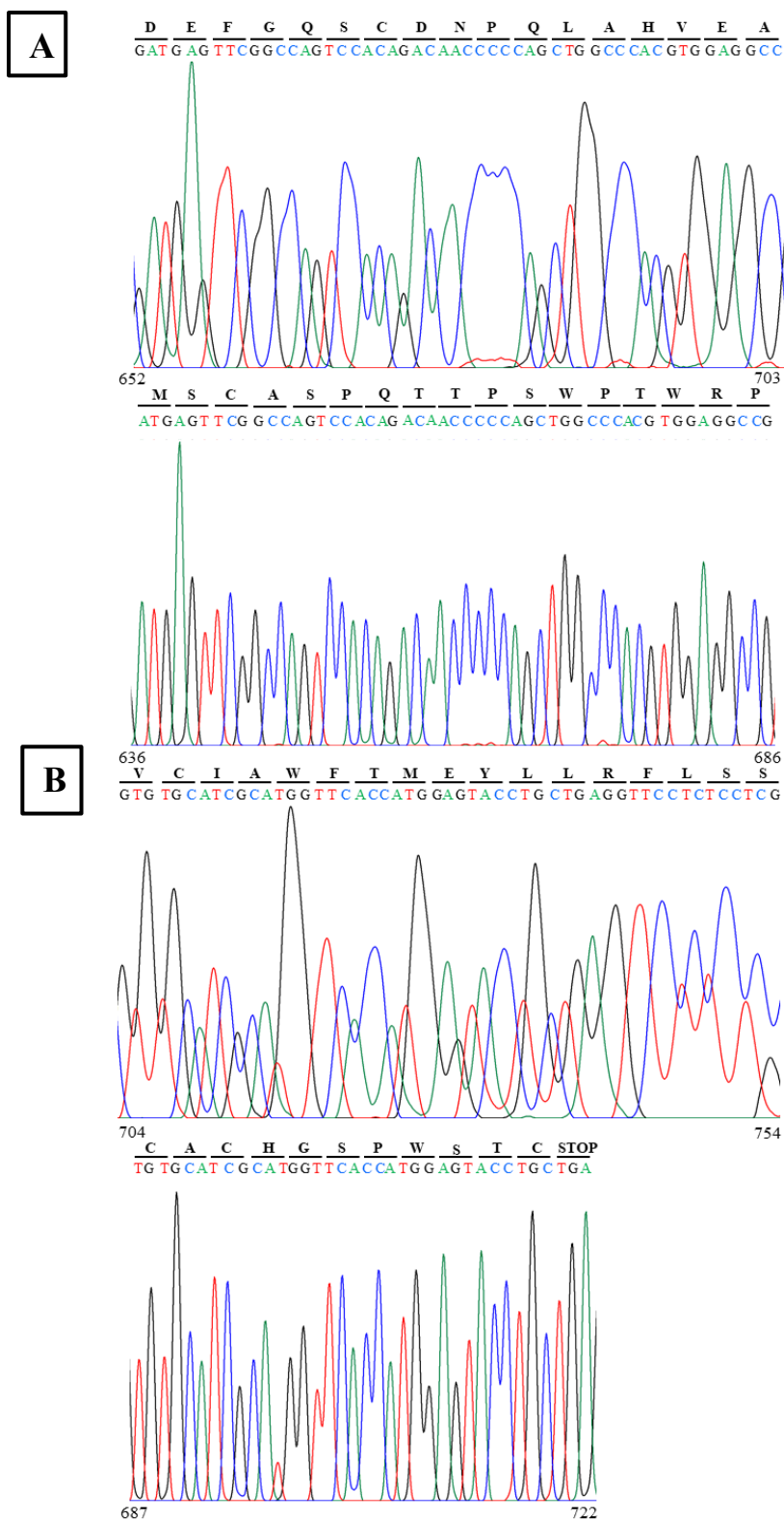


Figura 37. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 I204Tfs*38. A) In alto, lettura della sequenza amminoacidica della porzione di elettroferogramma (riportata in basso) del plasmide KCNB1 wild-type; in basso, shift di lettura degli amminoacidi nel mutante I204Tfs*38 nella stessa porzione di elettroferogramma. B) In alto, lettura della sequenza amminoacidica della porzione di elettroferogramma riportata in basso del plasmide KCNB1 wild-type, in basso, shift di lettura degli amminoacidi nel mutante I204Tfs*38 nella stessa porzione di elettroferogramma.

Similmente anche per la variante R306C l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita. Il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si può notare dalla Figura 38, la digestione del campione WT genera i tre frammenti attesi di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati tutti inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ/H , Figura 38B).

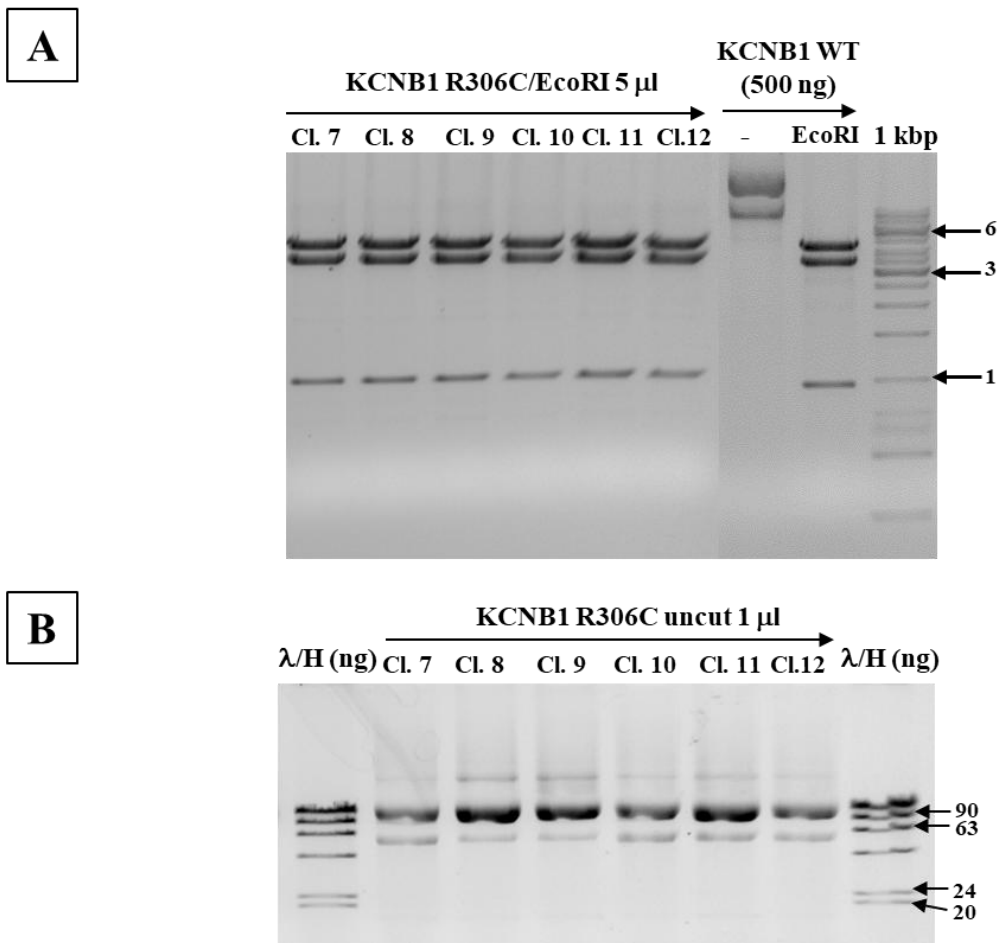


Figura 38. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) R306C. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kbp ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ/H .

Per quanto riguarda l'analisi degli elettroferogrammi, si evince la presenza della mutazione c.916C>T, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.R306C, per il clone 10 (Figura 39).

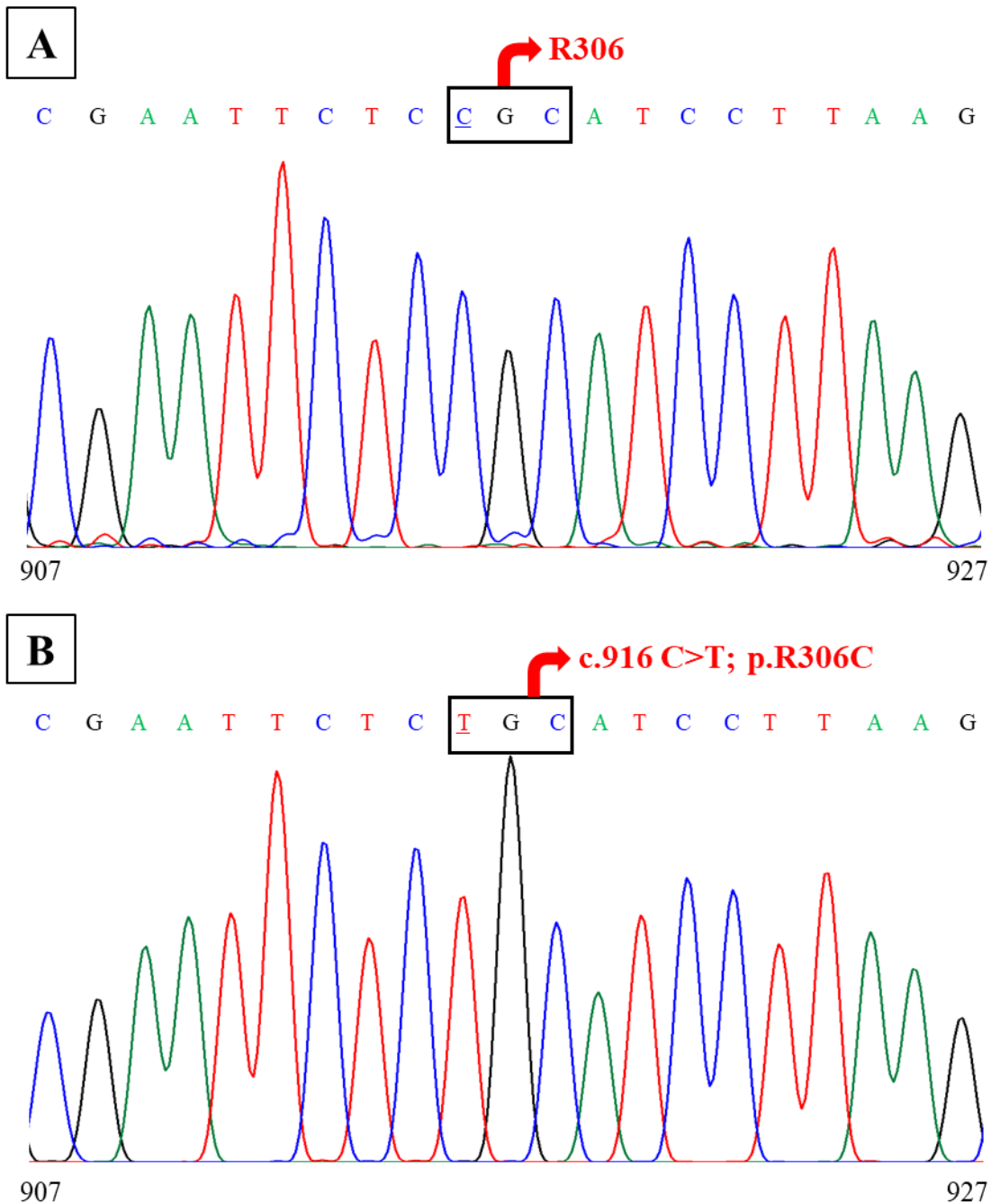


Figura 39. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 R306C. Porzione (da 907 a 927) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (**A**) o incorporante la mutazione R306C (**B**; clone 10 mostrato in figura 38A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Anche per la variante R312C l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita. Il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si può notare dalla Figura 40, la digestione del campione WT genera i tre frammenti attesi di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati tutti inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ/H, Figura 40B).

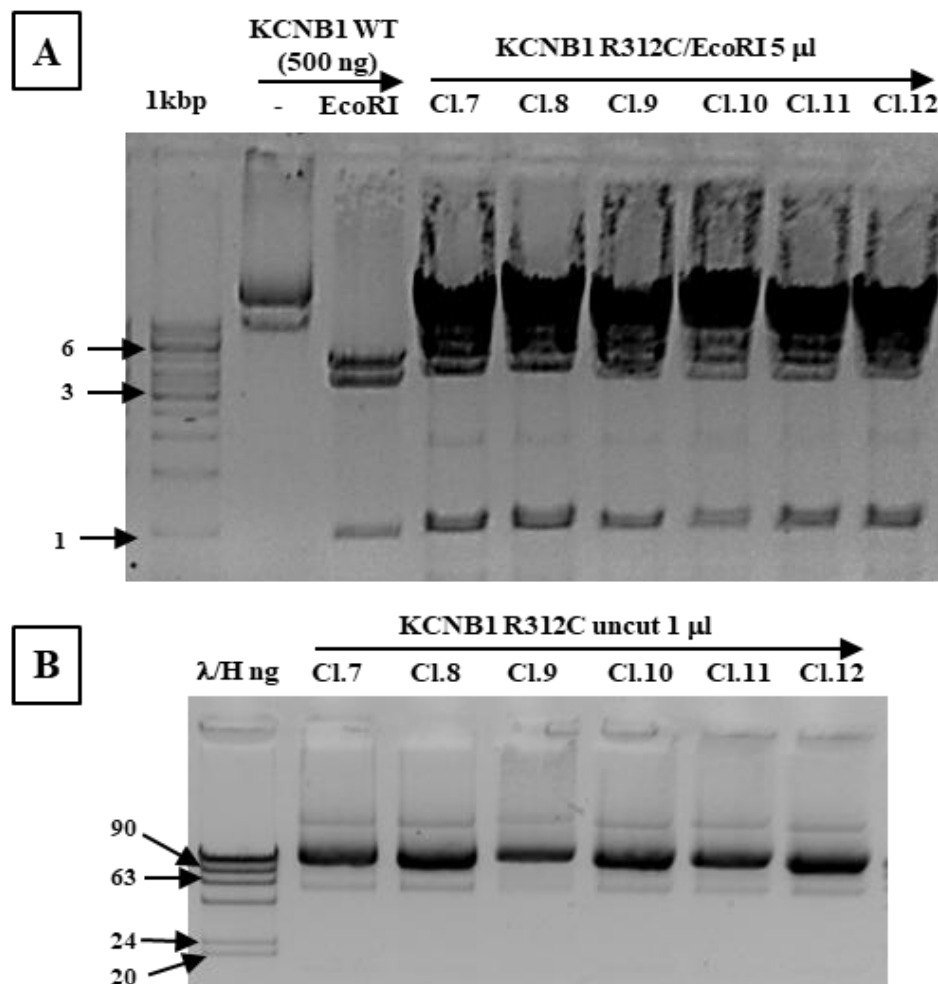


Figura 40. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) R312C. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ/H.

L'analisi degli elettroferogrammi ha evidenziato la presenza della mutazione c.934C>T, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.R312C, per il clone 12 (Figura 41).

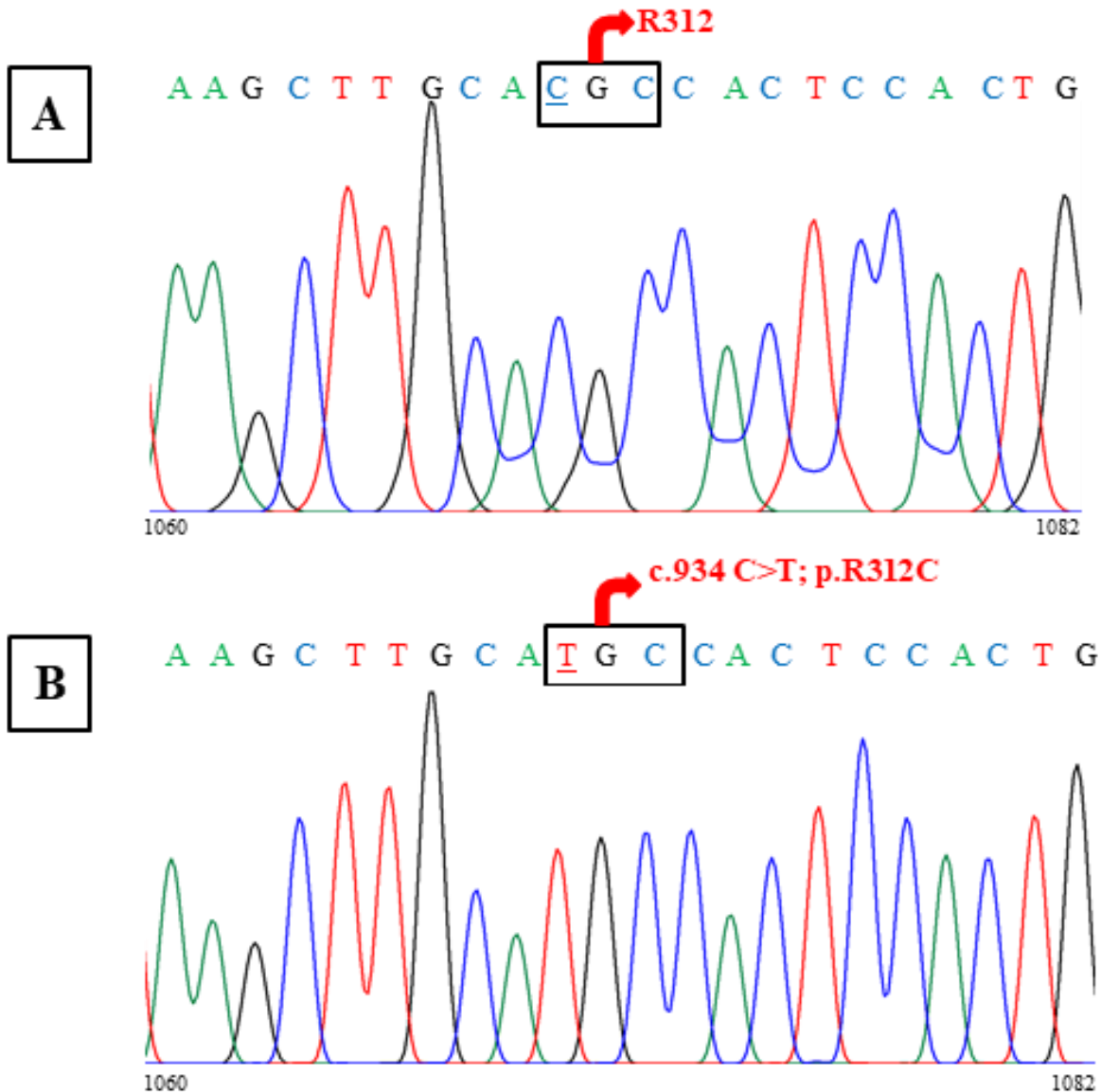


Figura 41. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 R312C. Porzione (da 1060 a 1082) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione R312C (B; clone 12 mostrato in figura 40A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Come la precedente, anche per la variante R312H l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita. Il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si può notare dalla Figura 42, la digestione del campione WT genera i tre frammenti attesi di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati tutti inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ /H, Figura 42B).

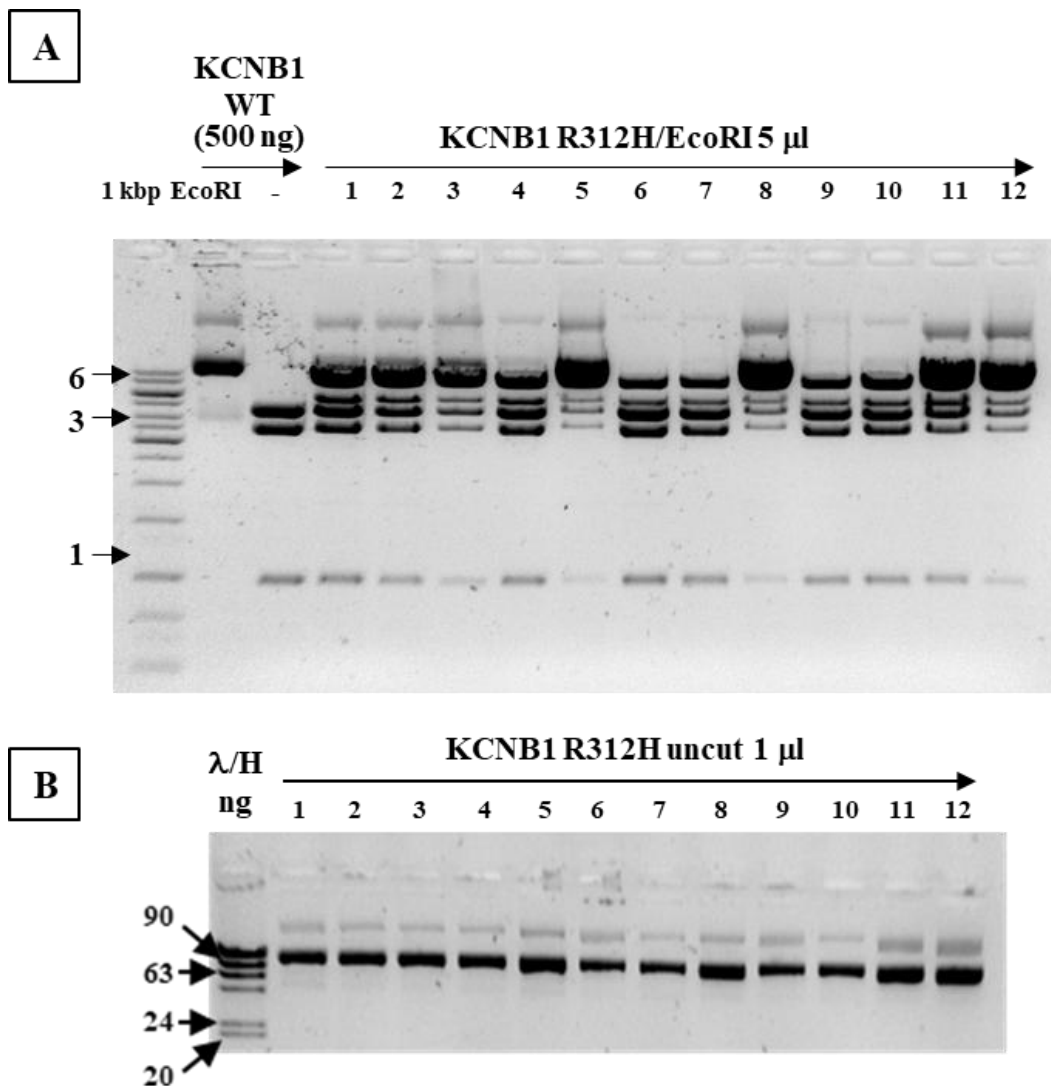


Figura 42. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) R312H. A) Separazione elettroforetica dei 12 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 12 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ /H.

L'analisi degli elettroferogrammi ha evidenziato la presenza della mutazione c.935G>A, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.R312H, per il clone 6 (Figura 43).

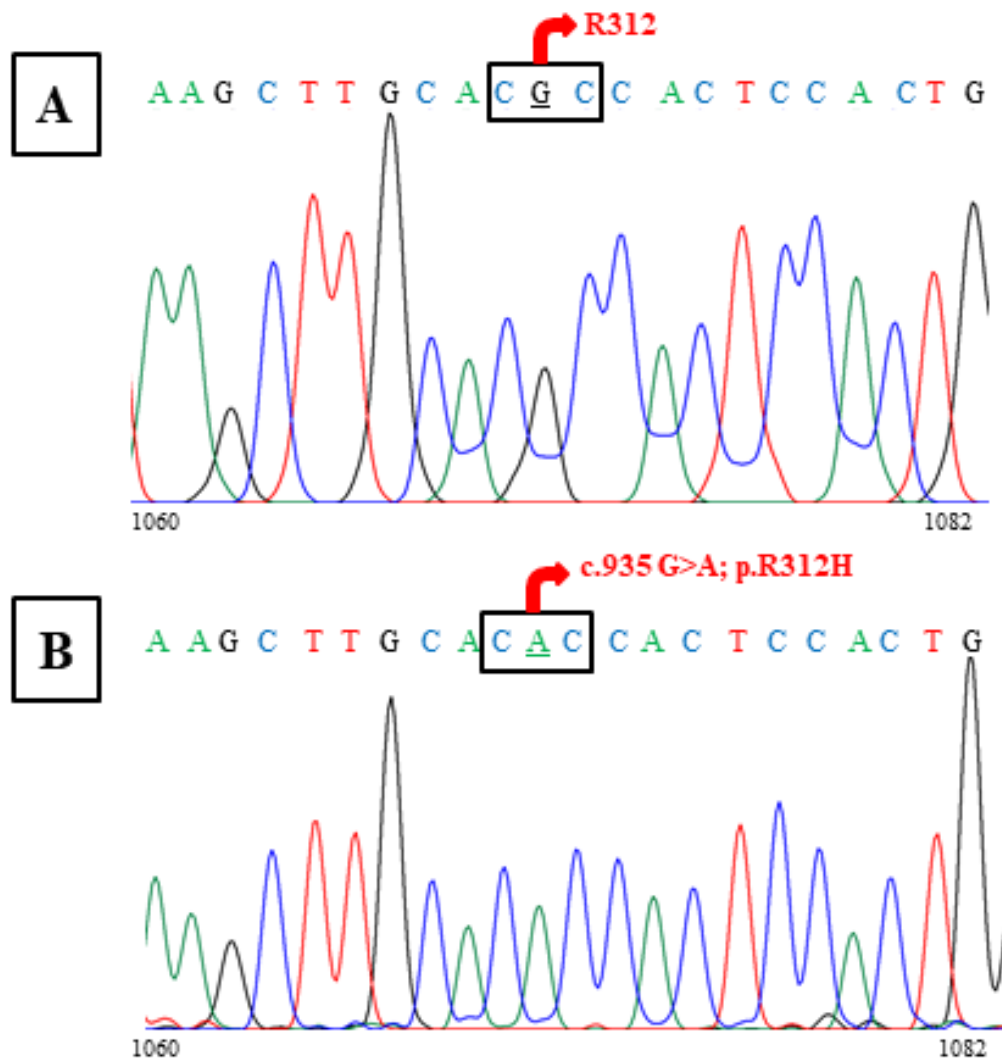


Figura 43. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 R312H. Porzione (da 1060 a 1082) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione R312H (B; clone 6 mostrato in figura 42A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato

Similmente anche per la variante V349F l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità non digerita. Il peso dei frammenti ottenuti in seguito a digestione enzimatica è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. Come si può notare dalla Figura 44, la digestione del campione WT genera i tre frammenti attesi di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp. Tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati tutti inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ /H, Figura 44B).

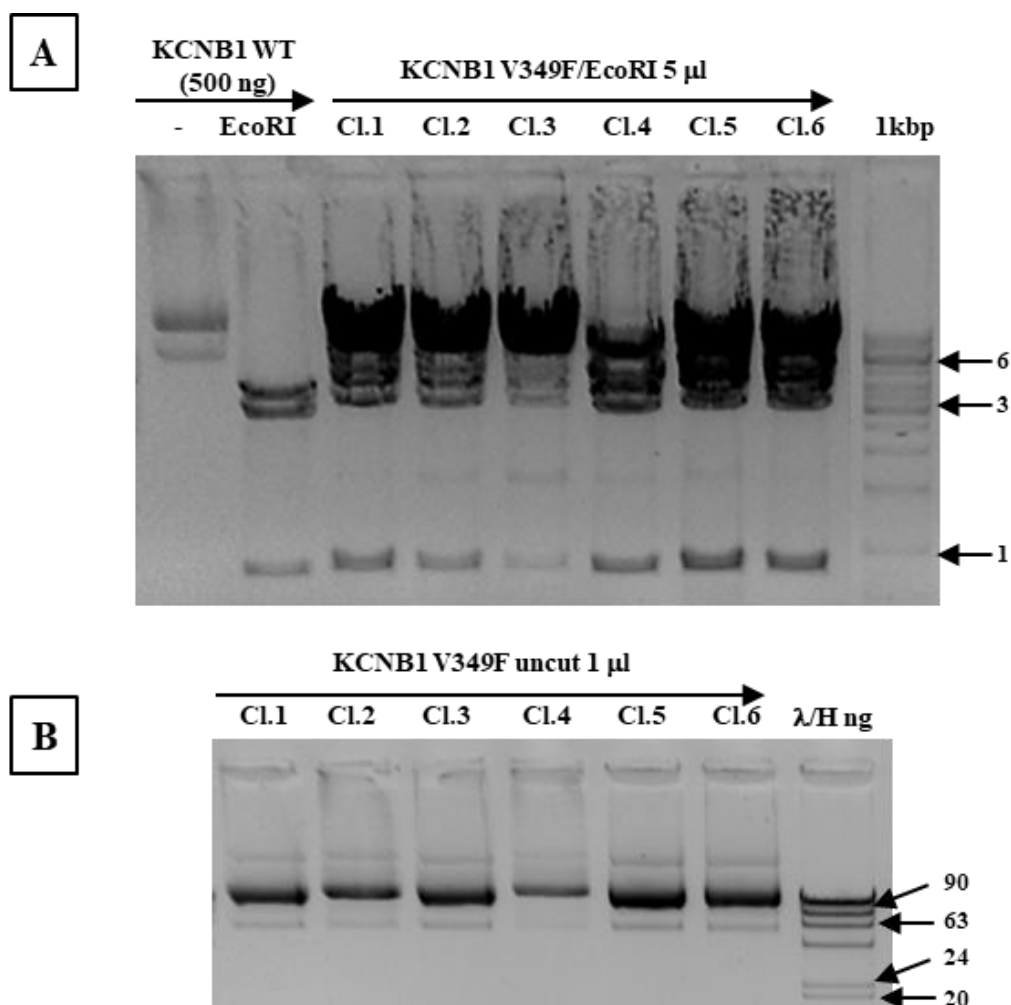


Figura 44. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) V349F. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ /H.

L'analisi degli elettroferogrammi ha evidenziato la presenza della mutazione c.1045G>T, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.V349F, per il clone 1 (Figura 45).

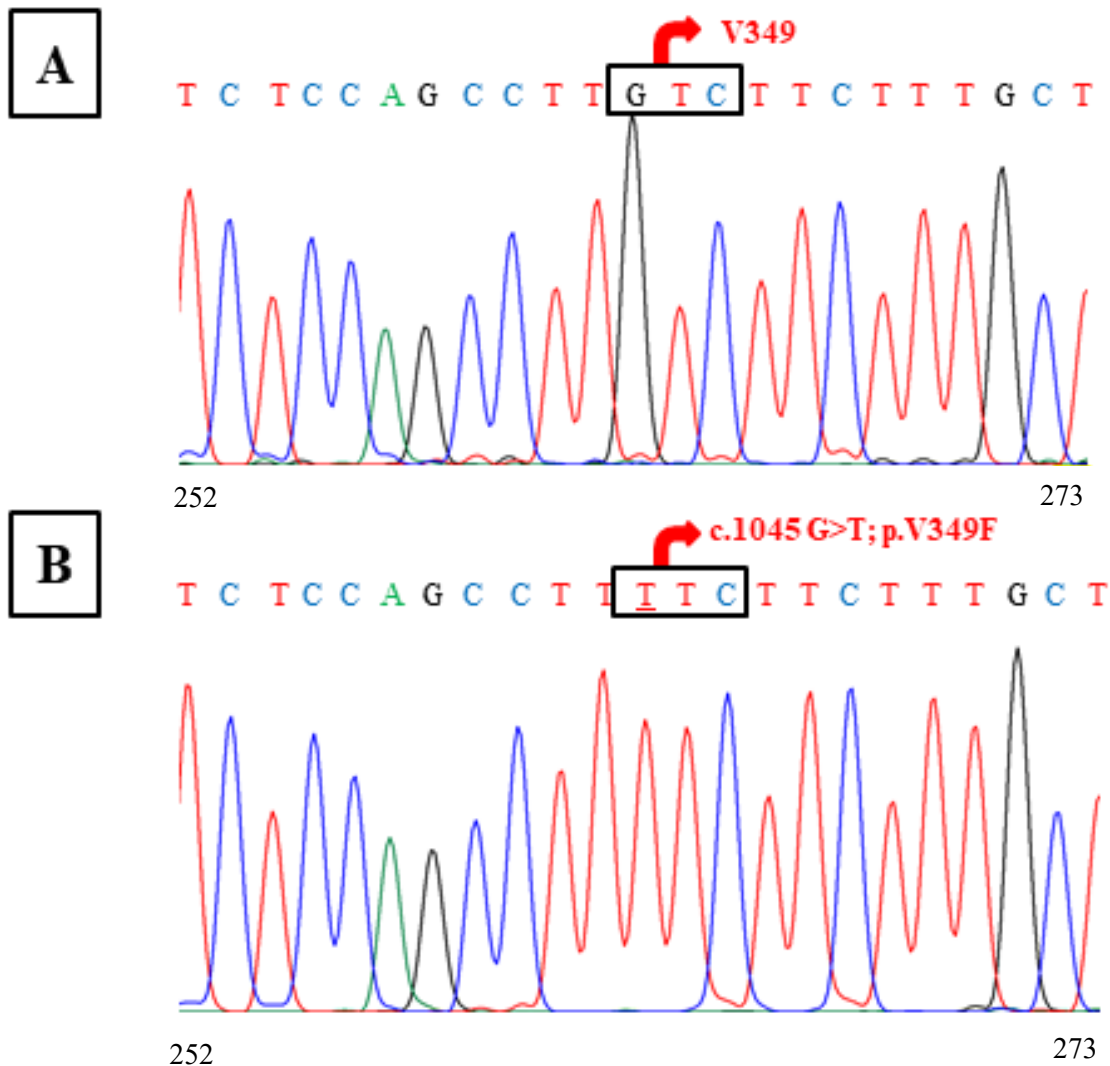


Figura 45. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 V349F. Porzione (da 252 a 273) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione V349F (B; clone 1 mostrato in figura 44A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Allo stesso modo delle varianti precedenti, anche la correttezza della digestione della variante W369* è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità di campione non digerito, ed il peso dei frammenti ottenuti è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. La digestione del campione WT ha generato i tre frammenti di peso atteso (di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp). Ad eccezione del clone 14, tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i tre frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ /H, Figura 46B).

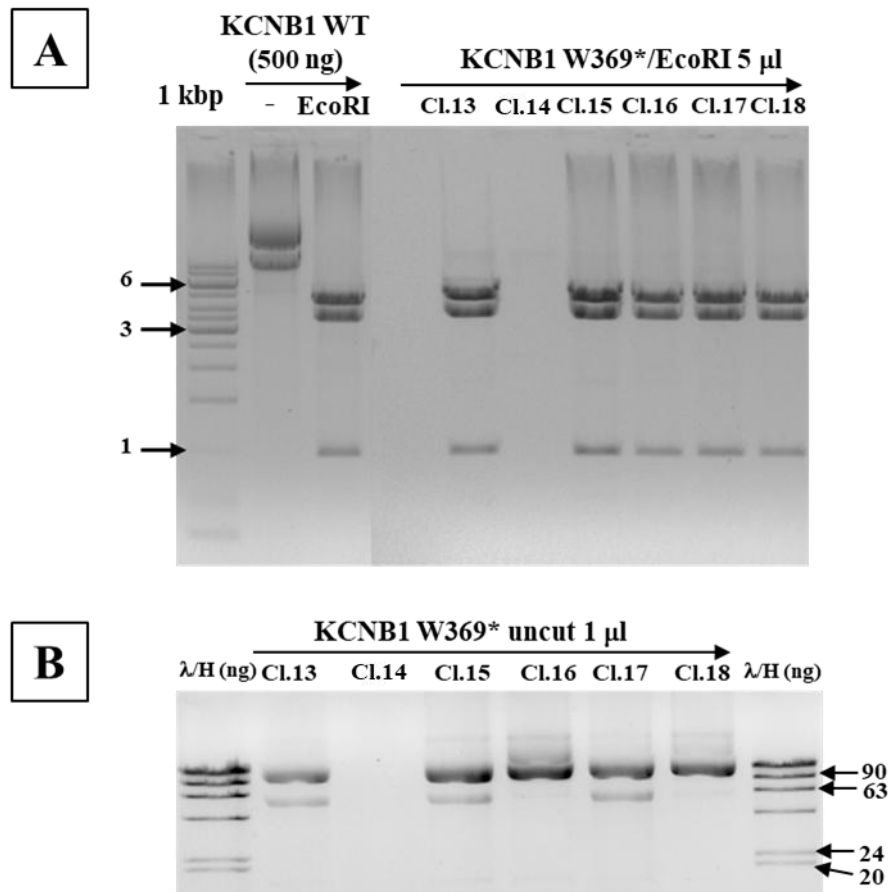


Figura 46. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) W369*. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kbp ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ /H.

L'analisi degli elettroferogrammi ha evidenziato la presenza della mutazione c.1107G>A, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.W369*, per il clone 16 (Figura 47).

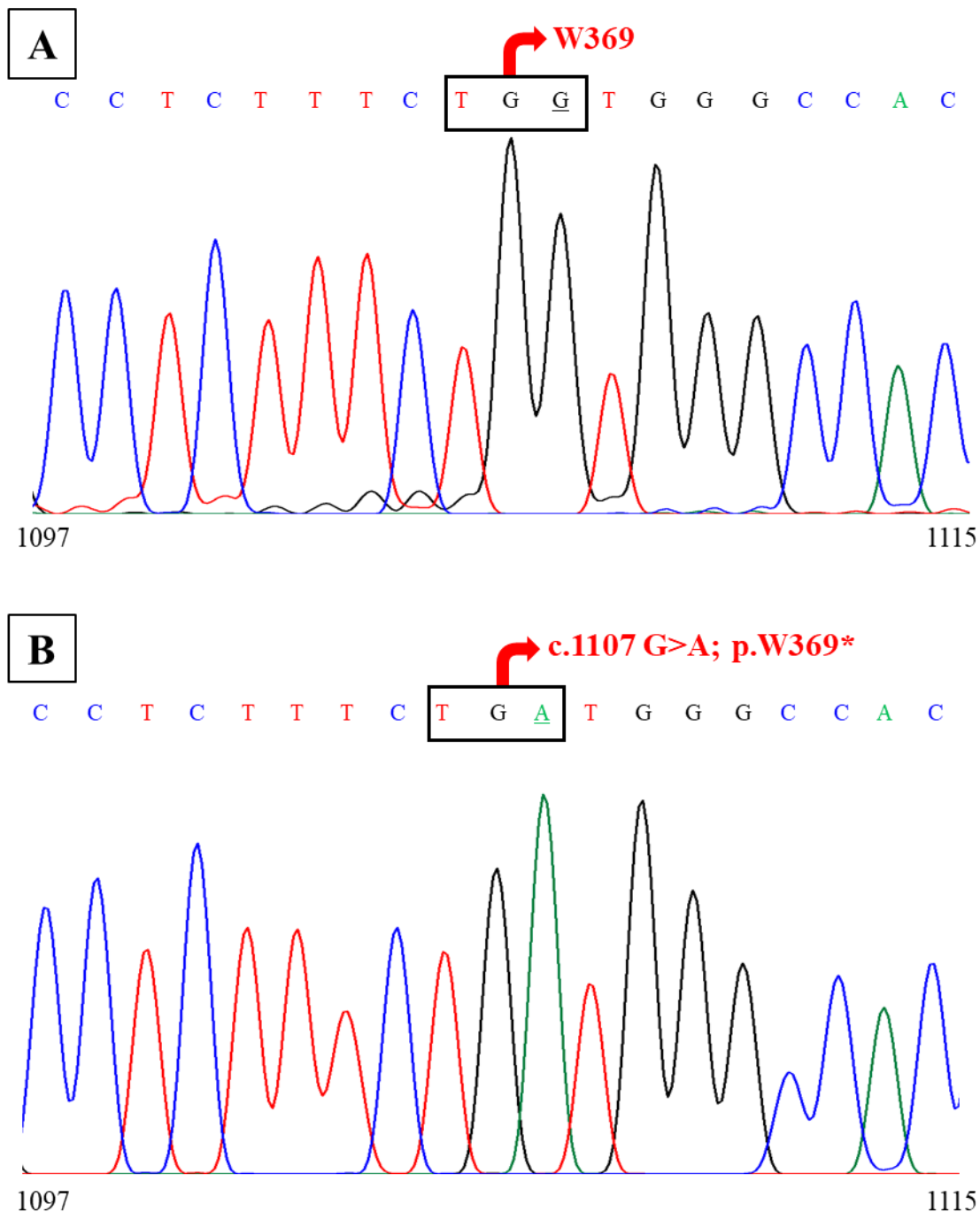


Figura 47. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 W369*. Porzione (da 1097 a 1115) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione W369* (B; clone 16 mostrato in figura 46A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Anche per l'ultima variante, Y380C, l'avvenuta digestione è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità di campione non digerito, ed il peso dei frammenti ottenuti è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. La digestione del campione WT ha generati i tre frammenti di peso atteso (di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp). Ad eccezione del clone 21, tutti i campioni hanno mostrato lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i tre frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati inviati a sequenziamento. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ /H, Figura 48B).

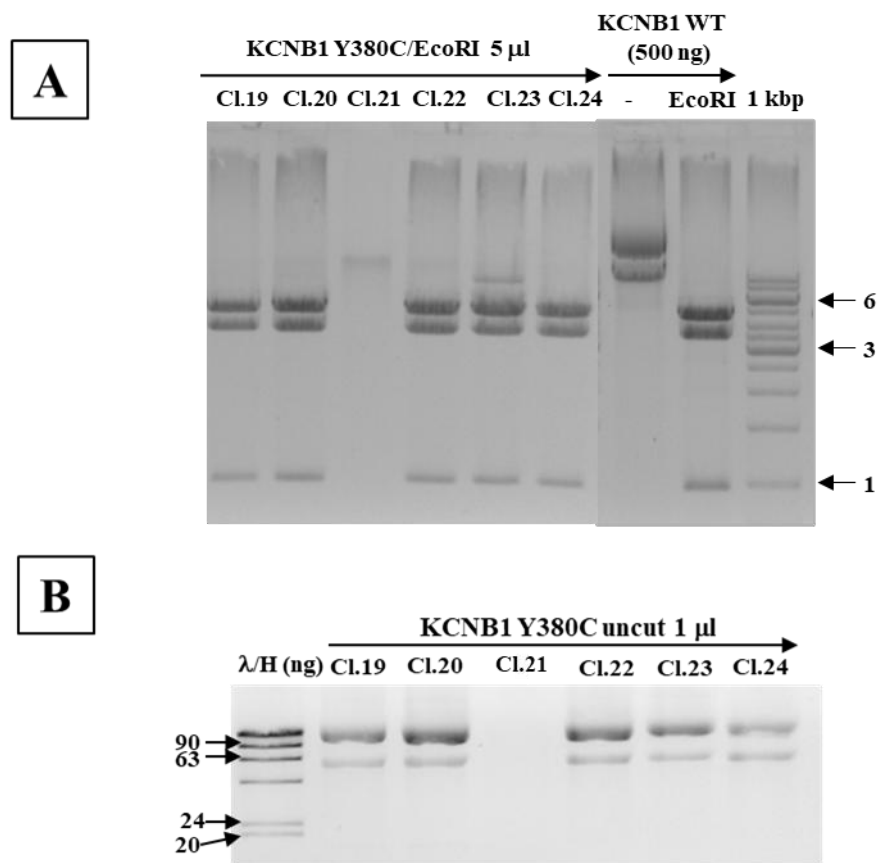


Figura 48. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) Y380C. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ /H.

Dall'analisi degli elettroferogrammi è emersa la presenza della mutazione c.1139 A>G, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.Y380C, per il clone 19 (Figura 49).

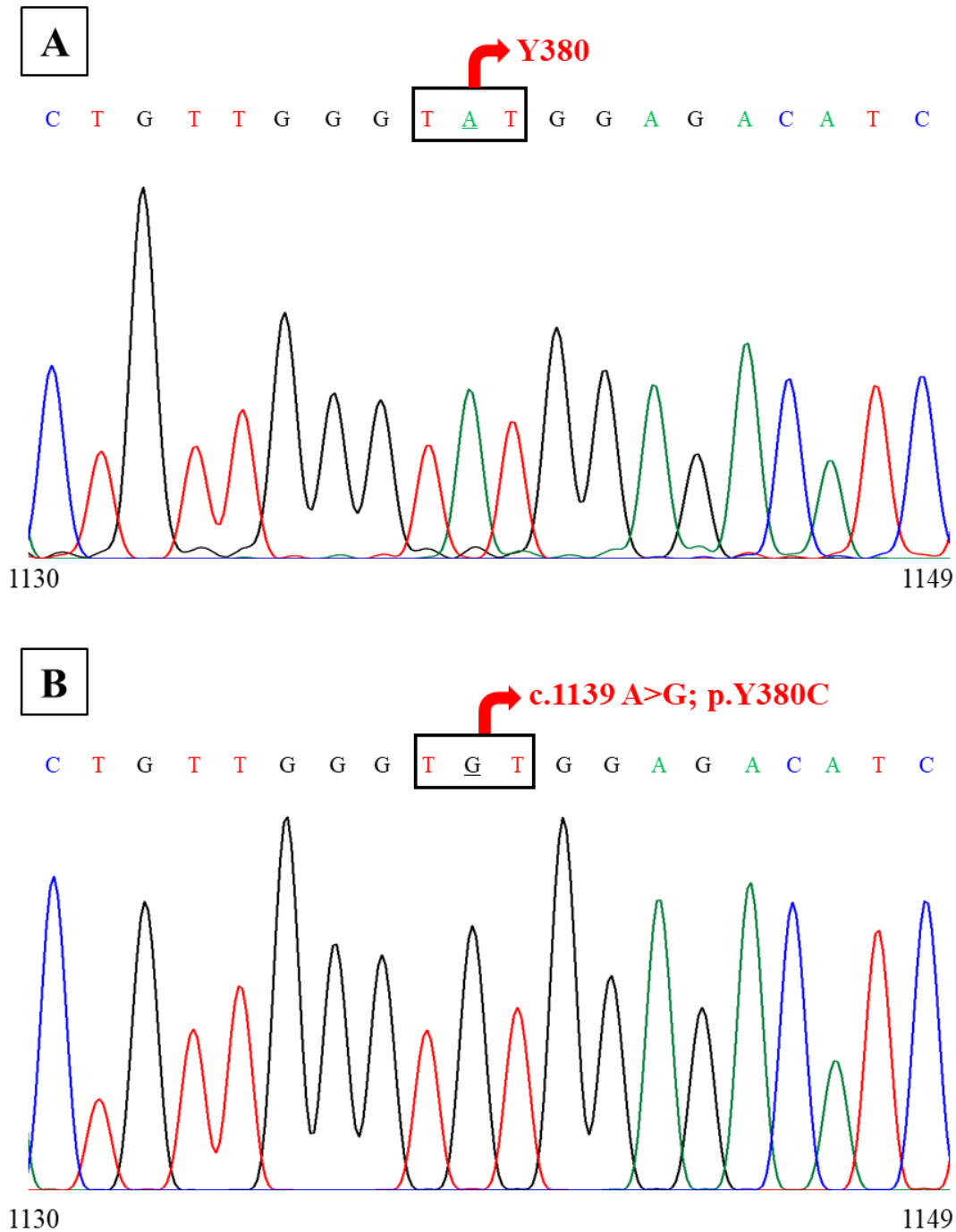


Figura 49. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 Y380C. Porzione (da 1130 a 1149) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione Y380C (B; clone 19 mostrato in figura 48A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

Come le varianti precedenti, anche la correttezza della digestione della variante I412T è stata valutata confrontando il campione KCNB1 WT sottoposto a restrizione con un'eguale quantità di campione non digerito, ed il peso dei frammenti ottenuti è stato misurato mediante confronto con il marcatore 1 kbp. La digestione del campione WT ha generato i tre frammenti di peso atteso (di peso pari a ~ 1000 bp, ~ 3500 bp e ~ 4500 bp). Solo i cloni 1, 2 e 3 hanno lo stesso pattern di digestione del campione WT, producendo i tre frammenti della lunghezza attesa, per cui sono stati inviati a sequenziamento solo questi 3 cloni. A tale scopo, 1 µl di ciascuna preparazione plasmidica è stata caricata tal quale su gel d'agarosio per valutare la concentrazione, in riferimento ad un marcatore di massa (λ /H, Figura 50B).

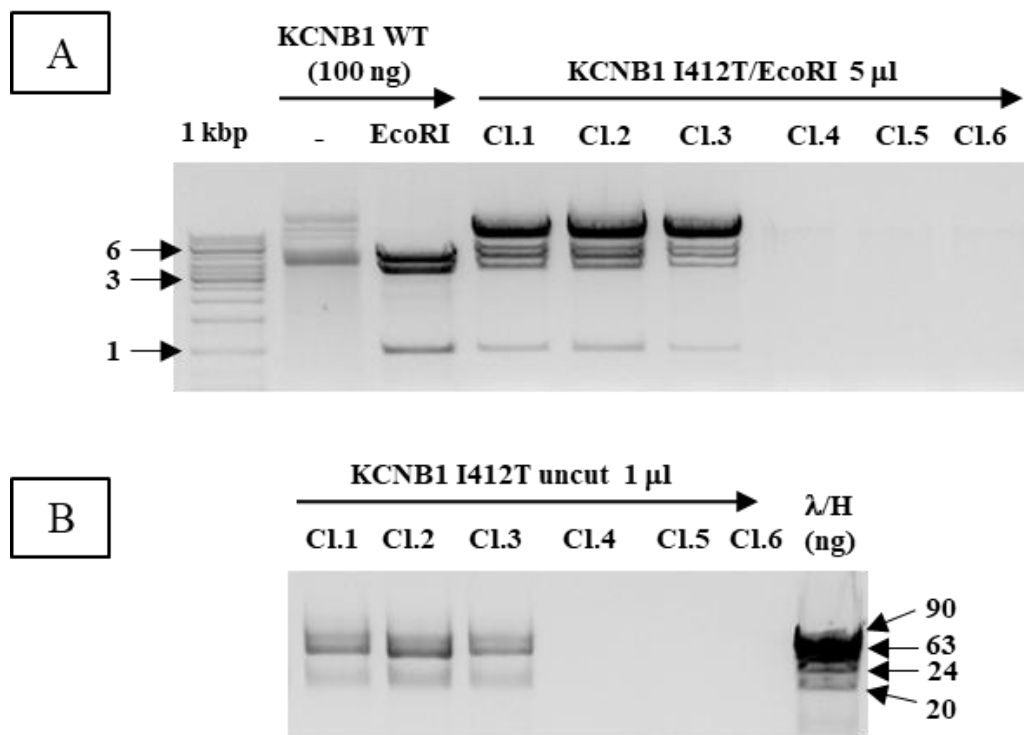


Figura 50. Analisi elettroforetica dei cloni KCNB1 (putativamente incorporanti la mutazione) I412T. A) Separazione elettroforetica dei 6 cloni digeriti con EcoRI, confrontati con il marker di peso molecolare 1 kb ed al wild-type (WT), digerito con lo stesso enzima o non digerito (-). B) Separazione elettroforetica dei 6 cloni non digeriti confrontati con il marker quantitativo λ /H.

Dall'analisi degli elettroferogrammi è emersa la presenza della mutazione c.1235 T>C, corrispondente alla mutazione amminoacidica p.I412T, per il clone 1 (Figura 51).

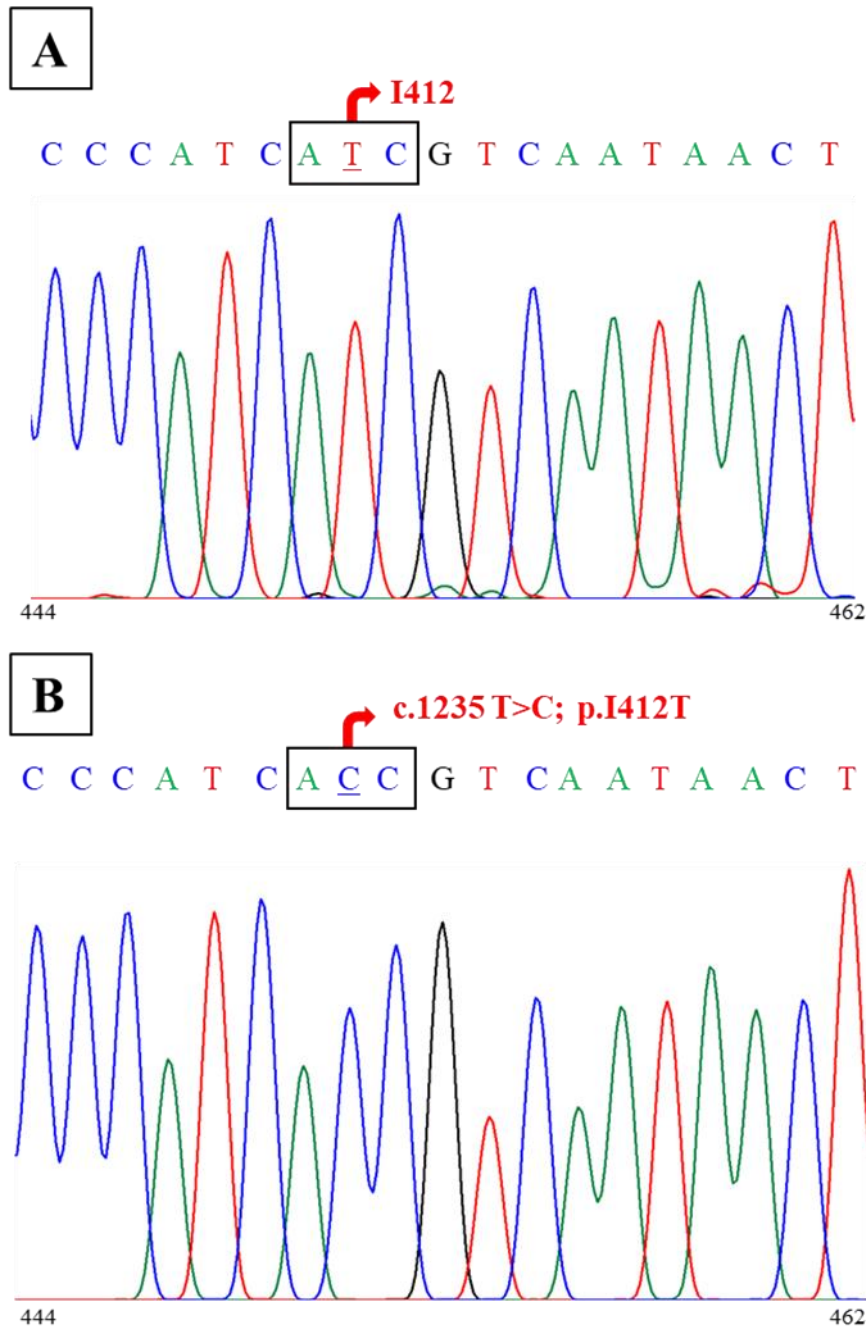


Figura 51. Elettroferogrammi dei plasmidi codificanti i canali KCNB1 wild-type o KCNB1 I412T. Porzione (da 444 a 462) degli elettroferogrammi ottenuti dalle reazioni di sequenziamento del plasmide codificante per il canale KCNB1 wild-type (A) o incorporante la mutazione I412T (B; clone 1 mostrato in figura 50A). In entrambi i pannelli il carattere sottolineato indica il residuo su cui cade la mutazione nucleotidica, mentre il box evidenzia la tripletta nucleotidica incorporante il residuo amminoacidico mutato.

4.2.2 Quantificazione del DNA plasmidico ottenuto mediante ciascuna procedura di maxi-prep

I cloni risultati positivi al sequenziamento, sono stati utilizzati per preparazioni su larga scala (maxi-prep), successivamente quantizzate mediante lettura spettrofotometrica. I risultati ottenuti per ciascuna maxi-prep sono riportati in Tabella 11:

Tabella 11. Quantificazione spettrofotometrica dei prodotti di maxi-prep per ciascuna variante

KCNB1-L35P				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/ OD_{280nm}	Concentrazione (ng/μl)
1 μl	0.0202	0.0156	1.3	707
2 μl	0.0474	0.0317	1.5	829.5
4 μl	0.0616	0.0445	1.4	539
Concentrazione finale = 0.8 μg/μl				
KCNB1-E180G				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/ OD_{280nm}	Concentrazione ng/μl
1 μl	0.0418	0.0290	1.4	1463
2 μl	0.0869	0.0602	1.4	1520.75
4 μl	0.1810	0.1200	1.5	1583.75
Concentrazione finale = 1.5 μg/μl				
KCNB1-R306C				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/ OD_{280nm}	Concentrazione ng/μl
1 μl	0.0416	0.0304	1.4	1456
2 μl	0.0754	0.0533	1.4	1319.5
4 μl	0.1547	0.1063	1.5	1353.625
Concentrazione finale = 1.4 μg/μl				

KCNB1-R312C				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/ OD_{280nm}	Concentrazione (ng/μl)
1 μl	0.0213	0.0134	1.6	745.5
2 μl	0.0459	0.0322	1.4	803.25
4 μl	0.0944	0.0661	1.4	826
Concentrazione finale = 0.8 μg/μl				
KCNB1-R312H				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/ OD_{280nm}	Concentrazione ng/μl
1μl	0.0381	0.0262	1.5	1333.5
2 μl	0.0865	0.0605	1.4	1513.75
4 μl	0.1863	0.1273	1.5	1630.125
Concentrazione finale = 1.5 μg/μl				
KCNB1-V349F				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/ OD_{280nm}	Concentrazione ng/μl
1 μl	0.0268	0.0182	1.5	938
2 μl	0.0659	0.0436	1.5	1153.25
4 μl	0.1353	0.0819	1.7	183.175
Concentrazione finale = 1.1 μg/μl				

KCNB1-W369*				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/OD_{280nm}	Concentrazione (ng/μl)
1 μl	0.0425	0.0304	1.4	1487.5
2 μl	0.0817	0.0564	1.4	1429.75
4 μl	0.1819	0.1180	1.5	1591.625
Concentrazione finale = 1.5 μg/μl				
KCNB1-Y380C				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/OD_{280nm}	Concentrazione ng/μl
1μl	0.0260	0.0169	1.5	910
2 μl	0.0437	0.0307	1.4	764.75
4 μl	0.0886	0.0608	1.5	775.25
Concentrazione finale = 0.7 μg/μl				
KCNB1-I412T				
μl	OD_{260nm}	OD_{280nm}	OD_{260nm}/OD_{280nm}	Concentrazione ng/μl
1μl	0.0336	0.0229	1.5	1176
2 μl	0.0728	0.0513	1.4	1274
4 μl	0.1415	0.0969	1.5	1238.5
Concentrazione finale = 1.2 μg/μl				

Poiché le letture a 260 nm e a 280 nm sono risultate lineari rispetto all'aumento di volume del campione, si è proceduto al calcolo della ratio, ovvero il rapporto OD₂₆₀/OD₂₈₀ ed al calcolo della concentrazione ottenuta moltiplicando il valore ottenuto per il fattore di diluizione e per 50 (1μg DNA= 50 OD). Quindi per ottenere la concentrazione finale è stata fatta una media delle concentrazioni ottenute ai diversi volumi.

4.2.3 Caratterizzazione funzionale dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione omomeric

Lo studio dei canali KCNB1, wild-type o mutanti, ha previsto sia l'analisi delle proprietà funzionali del canale allo stato stazionario che delle misure cinetiche. In particolare, è stato condotto sia uno studio della fase di attivazione che di deattivazione del canale; al contrario, non è stata studiata la fase di inattivazione, in quanto nelle nostre condizioni sperimentali la percentuale di corrente inattivante risulta trascurabile.

Le cellule esprimenti i canali KCNB1 WT producono forti correnti uscenti, con densità massima a +80 mV pari a 635.9 ± 62.4 pA/pF ($n=25$): nonostante il protocollo di attivazione prevedeva depolarizzazioni fino a +120 mV, sono stati considerati i valori di corrente misurati a +80 mV perché più riproducibili (spesso i valori a +120 mV risultavano infatti fuori scala). Fittando tali correnti all'equazione di Boltzmann sono stati ricavati i valori di $V_{1/2}$ e la pendenza della curva (k) che misuravano -3.1 ± 0.5 mV e 14.8 ± 0.4 mV/efold, rispettivamente (Tabella 12, Figura 52A). Dagli esperimenti condotti sui canali mutanti è emerso che la variante E180G induce uno spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso valori più negativi (Tabella 12, Figura 52C). Al contrario, la maggior parte dei canali incorporanti ciascuna delle altre varianti in studio risultano non funzionali, ad eccezione di quelli incorporanti la variante R312H in cui si osserva una diminuzione della densità di corrente (Tabella 12, Figura 52A-B), oltre che uno spostamento della voltaggio-dipendenza verso valori più positivi (Tabella 12, Figura 52C).

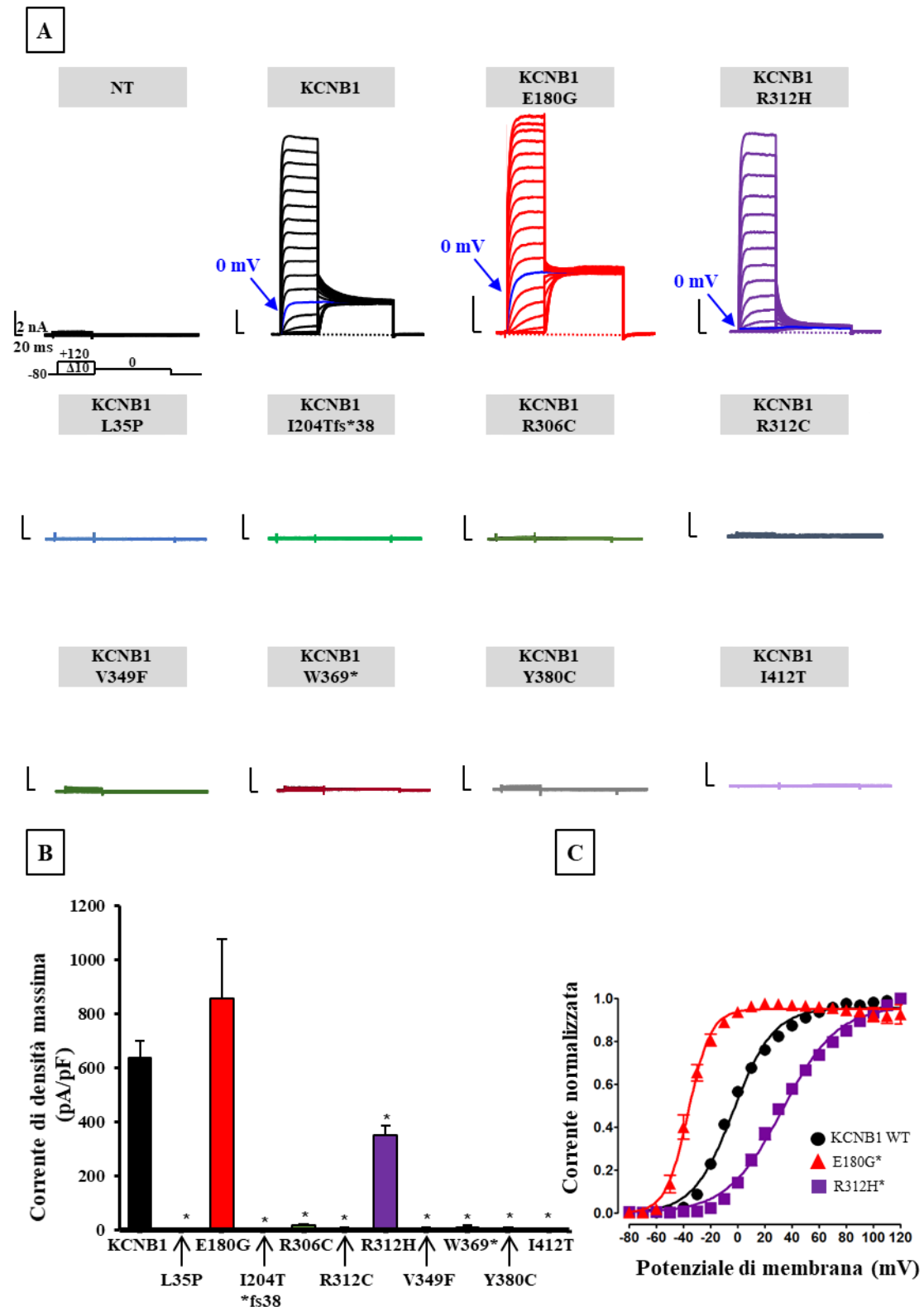


Figura 52. Analisi funzionale dei canali KCNB1 WT o mutanti in configurazione omomeric.
A) Tracce di corrente rappresentative misurate in cellule CHO non trasfettate (NT), incorporanti KCNB1 WT o esprimenti i canali incorporanti le varianti indicate in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in figura. B) Quantizzazione della densità di corrente di KCNB1 WT o dei canali indicati C) Quantificazione della conduttanza di KCNB1 WT (nero), KCNB1 E180G (rosso) o KCNB1 R312H (viola). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT

Per quanto riguarda le cinetiche di attivazione, la τ_{ACT} della variante E180G risulta complessivamente maggiore rispetto al canale WT con valori significativi da -10 a +10 e da +80 a +120 mV per la τ_{FAST} ed a 0 e +10 mV per la τ_{SLOW} , mentre per il rapporto tra le ampiezze non risultano differenze significative rispetto al canale WT, ad eccezione del valore riportato a +90 mV, in cui si osserva un aumento (Tabella 13, Figura 53A): tali dati indicano un rallentamento dell'attivazione rispetto al canale WT, ossia effetti LoF indotti dalla variante. Anche per la variante R312H la τ_{ACT} risulta complessivamente maggiore rispetto al canale WT, con valori significativi da 0 a +50 mV per la τ_{FAST} e da -10 a +50 mV ed a +120 mV per la τ_{SLOW} ; per le ampiezze si osserva un aumento significativo del loro rapporto rispetto al canale WT ai seguenti potenziali: 0, +60 e da +90 a +120 mV indicando una cinetica di attivazione più lenta rispetto ai canali WT (Tabella 13, Figura 53B) e quindi anche in questo caso effetti LoF indotti dalla variante. Invece, per quanto riguarda le altre varianti in studio (L35P, I204Tfs*38, R306C, R312C, V349F, W369*, Y380C e I412T) non è stato possibile effettuare l'analisi delle cinetiche di attivazione o deattivazione poiché risultavano non funzionali.

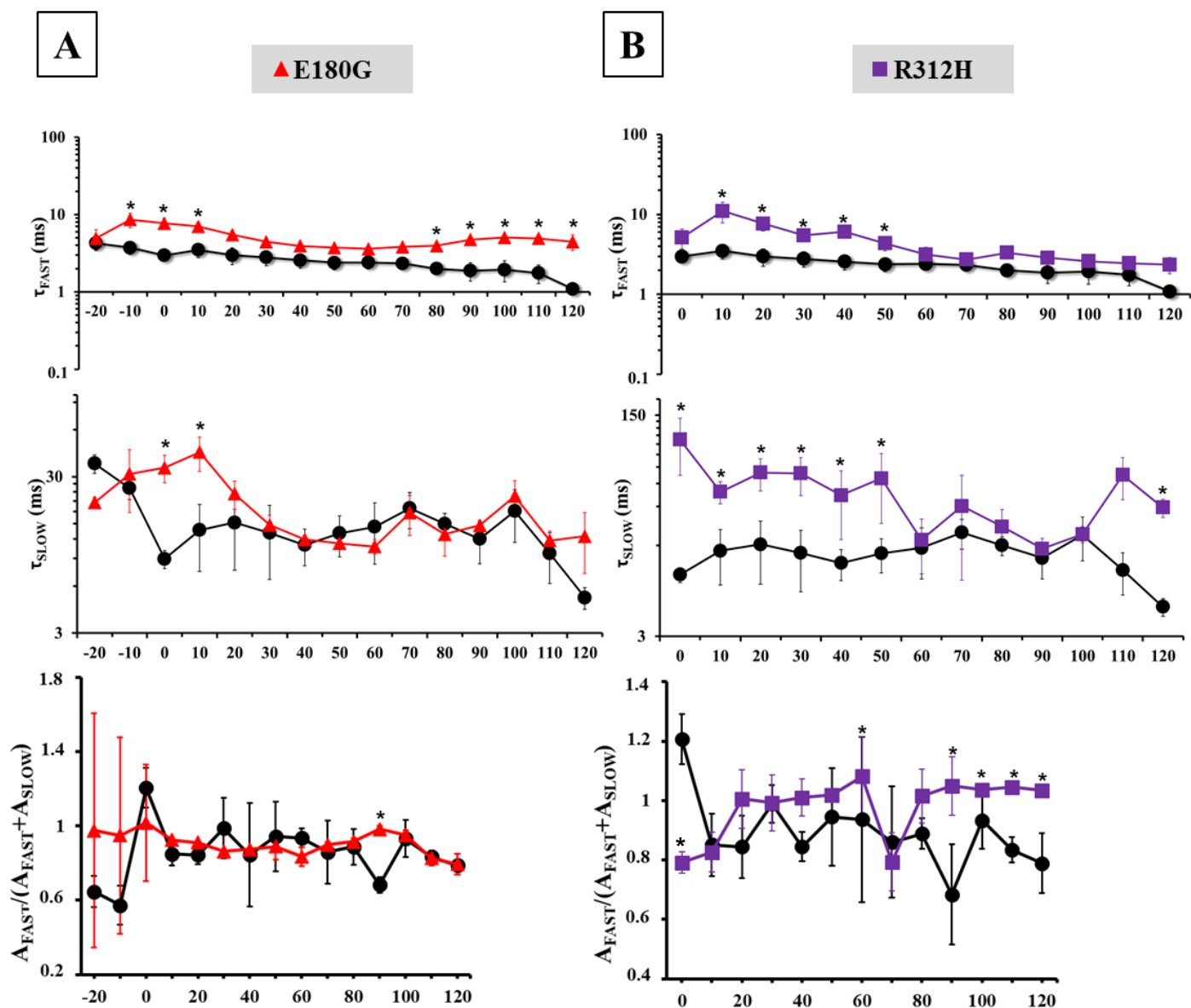


Figura 53. Cinetiche di attivazione delle correnti espresse dai canali WT o mutanti. A, B) Quantizzazione delle cinetiche FAST e SLOW e rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, per i canali WT (in nero) o incorporanti la variante E180G (in rosso, A) o R312H (in viola, B). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT

Per le cinetiche di deattivazione della variante E180G, la τ_{DEACT} risulta significativamente maggiore nei valori di τ_{FAST} da -120 a -100 mV e 0 mV e minore con valori significativi da -40 a -10 mV, mentre mostra valori di τ_{SLOW} maggiori, con valori significativi a -80 e da -60 a +0 mV; per quanto riguarda il rapporto delle ampiezze, queste risultano significativamente minori da -120 a -80 mV; tali dati indicano una deattivazione nel complesso più lenta rispetto al canale WT (Tabella 13, Figura 54A-B) suggerendo un effetto GoF. Invece, la variante R312H mostra una τ_{DEACT} complessivamente minore rispetto al canale WT per cui si nota una deattivazione più rapida rispetto ad esso, con valori significativi da -120 a 0 mV per la τ_{FAST} e valori significativi da -90 a -20 mV per quanto riguarda la τ_{SLOW} ; il rapporto delle ampiezze, invece, risulta maggiore rispetto al canale WT, con valori significativi a -110, -90, -80, da -50 a 0 mV, con conseguenti effetti LoF (Tabella 13, Figura 54A-C).

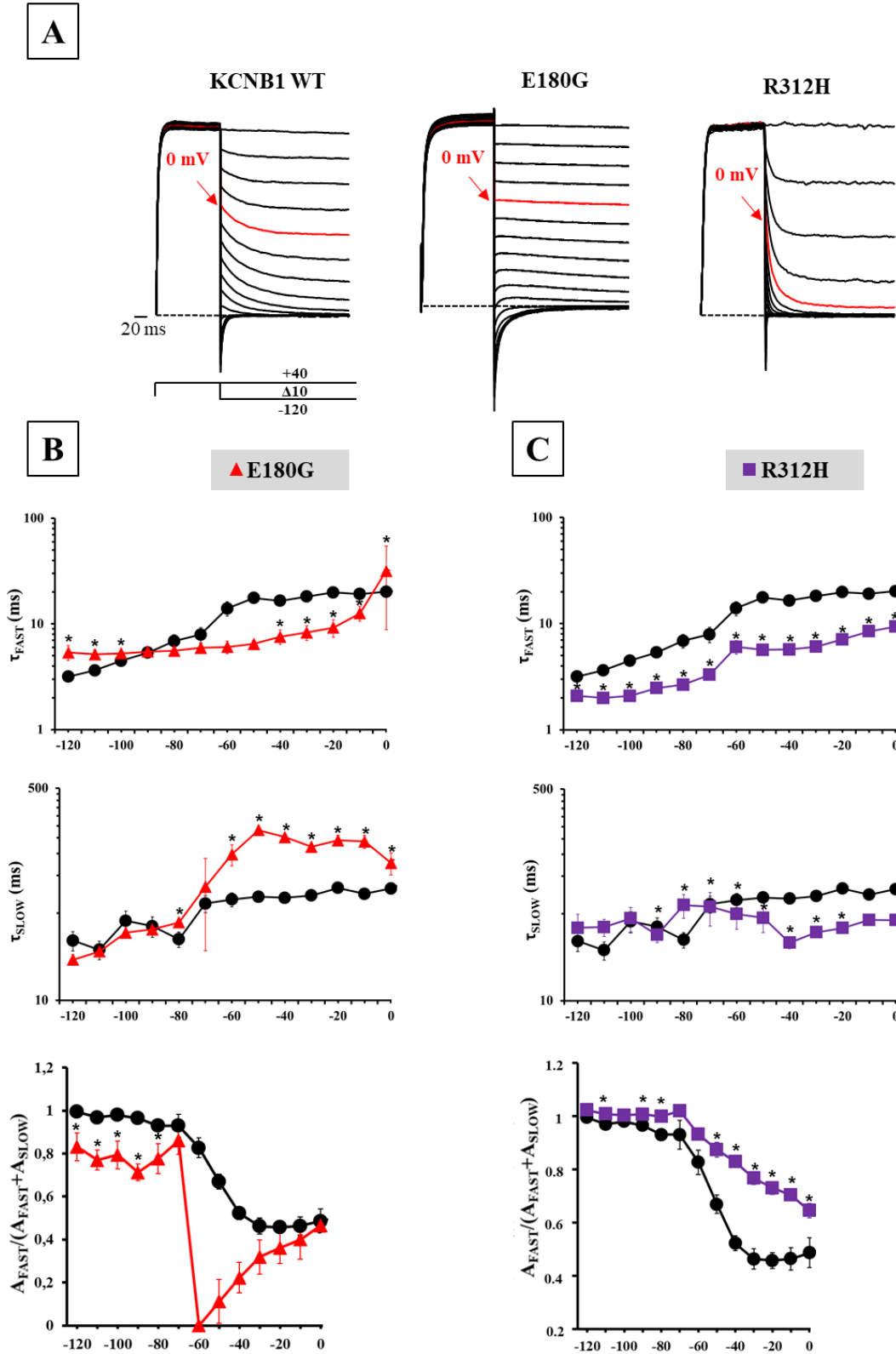


Figura 54. Cinetiche di deattivazione delle correnti espresse dai canali WT o mutanti. A) Tracce di corrente rappresentative misurate in cellule CHO esprimenti i canali indicati in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in figura. B, C) Quantificazione delle cinetiche FAST e SLOW e rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, dei canali WT o incorporanti la variante E180G (B) o R312H (C). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT

Complessivamente considerando tutti i dati funzionali ricavati, questi suggeriscono che la variante E180G induce per lo più effetti di guadagno di funzione (GoF) se comparata al canale WT, sebbene il rallentamento della cinetica di attivazione del canale è indicativo di un effetto di perdita di funzione (LoF). Al contrario, per la variante R312H, tutti i dati funzionali indicano effetti LoF rispetto al canale WT. Le proprietà biofisiche dei canali WT o incorporanti ciascuna delle varianti in studio sono riportati nelle seguenti Tabelle:

Tabella 12. Proprietà allo stato stazionario delle correnti espresse dai canali WT o incorporanti ciascuna variante.

CANALE	n	Densità di corrente a +80 mV (pA/pF)	V _{1/2} (mV)	k (mV/efold)
KCNB1 WT	25	635.9±62.4	-3.1±0.5	14.8±0.4
KCNB1 L35P	8	5.2±1.8*	/	/
KCNB1 E180G	5	856.5±220	-36.3±0.6	8.3±0.5
KCNB1 Ile204Thrfs*38	8	3.1±0.8*	/	/
KCNB1 R306C	10	12.7±4.0*	/	/
KCNB1 R312C	6	7.7±1.4*	/	/
KCNB1 R312H	12	453.7±37.1	33.1±0.8	20.4±0.7
KCNB1 V349F	11	7.5±2.7*	/	/
KCNB1 W369*	7	10.7±0.6*	/	/
KCNB1 Y380C	7	5.3±0.1*	/	/
KCNB1 I412T	8	5.7±1.3*	/	/
* = $p < 0.05$ vs KCNB1 WT				

Tabella 13. Proprietà cinetiche delle correnti espresse dai canali WT o incorporanti ciascuna variante

CANALE	ACTIVATION			DEACTIVATION		
	τ_{FAST} a +10 mV (ms)	τ_{SLOW} a +10 mV (ms)	Ampiezza a +90 mV $A_{\text{FAST}} / (A_{\text{FAST}} + A_{\text{SLOW}})$	τ_{FAST} a 0 mV (ms)	τ_{SLOW} a 0 mV (ms)	Ampiezza a -50 mV A $A_{\text{FAST}} / (A_{\text{FAST}} + A_{\text{SLOW}})$
KCNB1 WT	3.5±0.7	13.7±6.2	0.68±0.14	20.2±1.6	78.8±6.5	0.66±0.03
KCNB1 E180G	7.0±0.8*	43.0±10.6*	0.98±0.01*	9.0±3.2*	133.7±20.9*	0.11±0.10*
KCNB1 R312H	11.0±3.2*	38.8±7.4*	1.04±0.03*	9.4±0.5*	44.4±2*	0.87±0.02*
* = $p < 0.05$ vs KCNB1 WT						

4.2.4 Sensibilità farmacologica dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione omomeric

Alla luce dei risultati funzionali ottenuti, appare chiaro che la variante E180G causa prevalentemente effetti GoF rispetto al canale WT, mentre la variante R312H induce effetti LoF. Pertanto, sono stati condotti esperimenti di sensibilità farmacologica per valutare la possibilità di revertire tali effetti mediante l'esposizione a specifici modulatori. In particolare, per revertire gli effetti GoF, è stato testato come bloccante il farmaco antidepressivo Fluoxetina (50 μ M). Tale farmaco è stato scelto sulla base di alcuni recenti lavori in cui si evidenzia come la Fluoxetina agisca come bloccante su diversi canali del potassio (*Ambrosino et al., 2023; Soldovieri et al., 2023; Cioclu et al., 2023; Trivisano et al., 2025*), tra cui anche KCNB1 WT (*Wang et al., 2020*).

Al contrario, per revertire gli effetti LoF indotti dalla variante R312H, è stato testato il farmaco antidiabetico Metformina (10 μ M); tale farmaco è stato scelto poiché è noto che l'enzima AMP-chinasi, il principale target della metformina, è in grado di aumentare le correnti espresse dai canali KCNB1 (*Ikematsu et al., 2011*).

Come mostrato in figura 55A, l'esposizione a 50 μ M Fluoxetina di cellule esprimenti il canale KCNB1 WT produce un blocco della corrente pari all' 88.2 ± 3.2 % (n=6). Quando esposte a 50 μ M Fluoxetina, anche le cellule esprimenti il mutante E180G subiscono un blocco delle correnti pari a 94.6 ± 1.7 % (n=5), indicando che tale farmaco è efficace nel bloccare le correnti uscenti dei canali KCNB1 WT o incorporanti la variante E180G. Come alternativa alla FLX, si è deciso di testare anche 10 μ M Cannabidiolo (CBD), poiché dalla letteratura (*Sayehmiri et al., 2025*) si evince che sia in grado di bloccare le correnti espresse dai canali KCNB1: quando perfuso in cellule esprimenti KCNB1 WT o E180G si osservava un blocco delle correnti espresse del 94.9 ± 1.7 % (n=8) o dell' 83.2 ± 2.6 (n=4, $p < 0.05$ Figura 55), rispettivamente; tali dati suggeriscono che entrambi i farmaci rappresentano una putativa terapia personalizzata per i pazienti affetti da DEE portatori di tale variante.

In figura 56 si può osservare come invece l'esposizione a 10 μ M metformina induca un aumento delle correnti espresse dai canali KCNB1 WT pari al 17.4 ± 1.4 % (n=15). Questa attivazione delle correnti si osserva anche nelle cellule esprimenti il canale incorporante la variante R312H dopo esposizione alla stessa concentrazione di metformina, ed è pari al 37.8 ± 8.2 % (n=4). Pertanto, la metformina risulta efficace nell'attivare le correnti espresse dai canali KCNB1 WT o R312H, con un effetto maggiore sui canali incorporanti tale variante; dai dati *in vitro* MET sembrerebbe rappresentare una possibile terapia personalizzata per il probando portatore di tale variante.

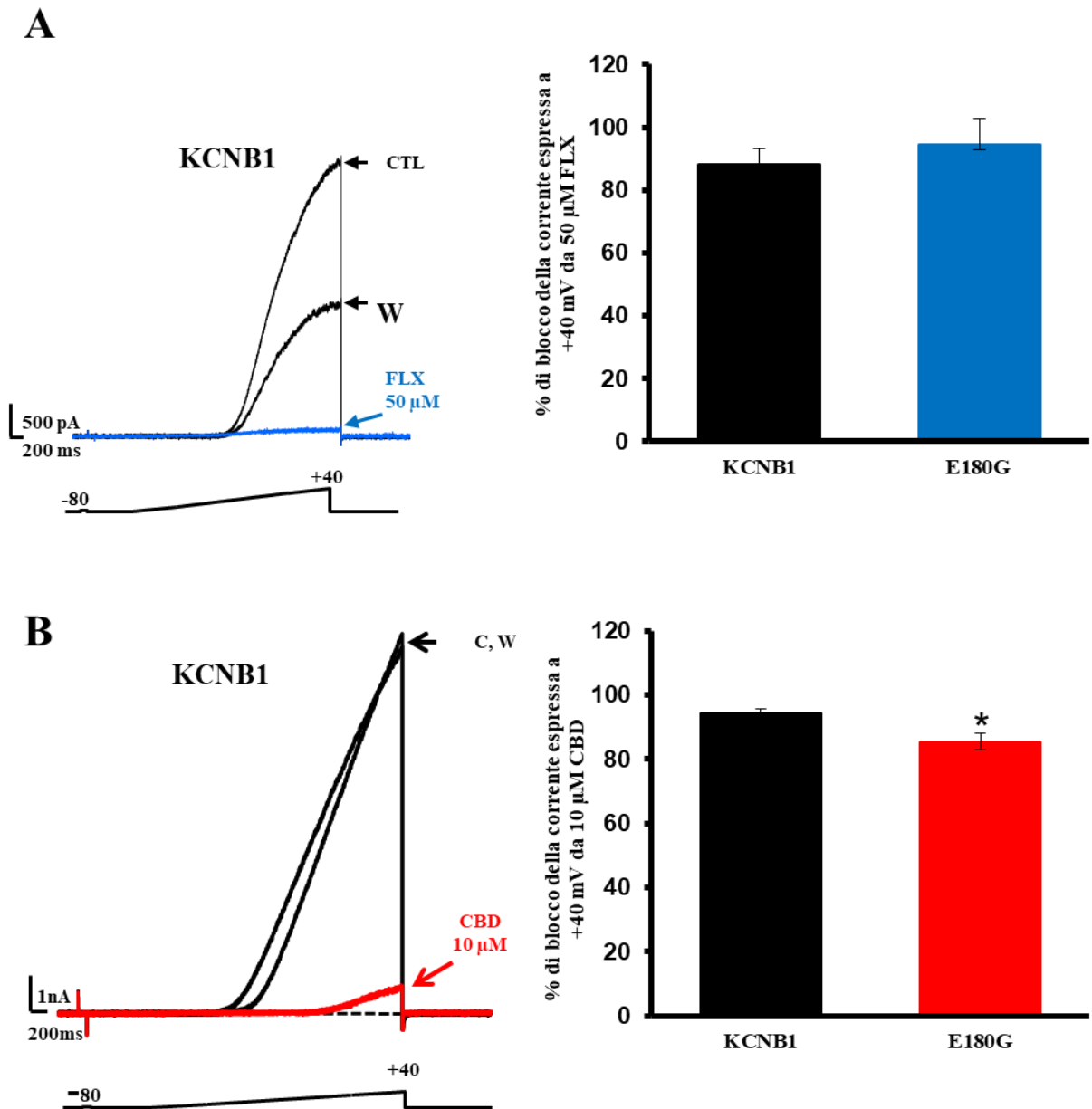


Figura 55. Proprietà farmacologiche dei canali KCNB1 WT o mutanti. A) A sinistra, tracce di corrente espresse dal canale KCNB1 WT in soluzione controllo (CTL), dopo 2'-3' di esposizione a 50 μ M FLX (in blu) o dopo washout (W), a destra percentuale di inibizione della corrente espressa a +40 mV dai canali indicati. B) A sinistra, tracce di corrente espresse dal canale KCNB1 WT in soluzione controllo (C), dopo 2'-3' di esposizione a 10 μ M CBD (in rosso) o dopo washout (W), a destra percentuale di inibizione della corrente espressa a +40 mV dai canali indicati. * = $p < 0.05$ vs KCNT1 WT.

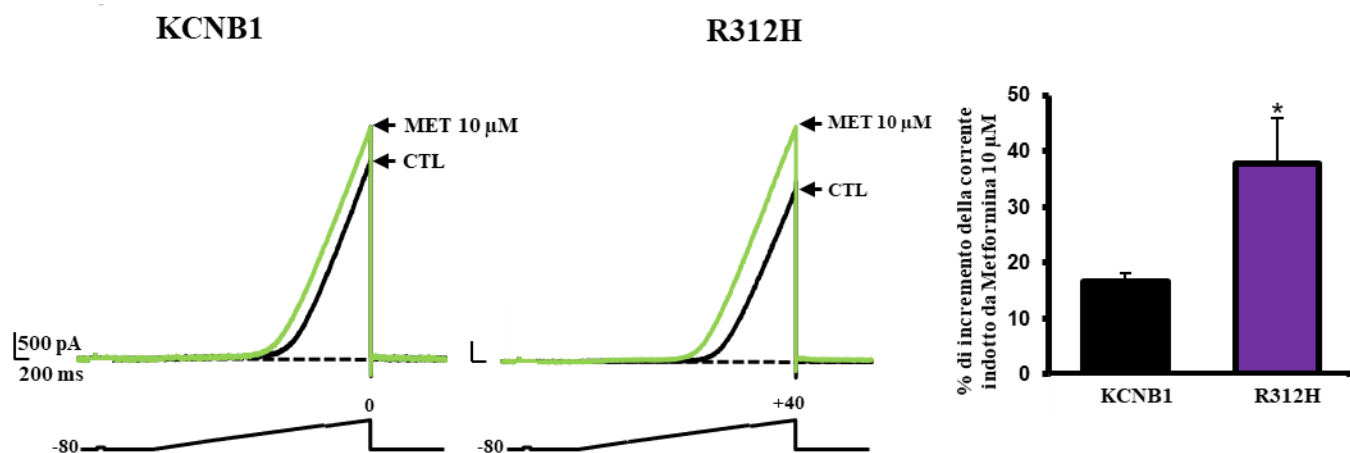


Figura 56. Proprietà farmacologiche dei canali KCNB1 WT o mutanti. A sinistra, tracce di corrente espresse dal canale KCNB1 WT o incorporanti la variante R312H in soluzione controllo (CTL), dopo 2'-3' di esposizione a 10 μM MET (in verde) o dopo washout (W), a destra percentuale di inibizione della corrente espressa a 0 o +40 mV dai canali indicati. * = $p < 0.05$ vs KCNT1 WT.

4.2.5 Identificazione del rapporto di trasfezione appropriato per gli studi funzionali in configurazione eteromera delle varianti LoF identificate nei canali KCNB1

Tutte le varianti in studio sono state identificate nei pazienti in condizioni di eterozigosi pertanto, allo scopo di stabilire se tali varianti LoF avessero anche effetti di dominanza negativa sulla funzionalità delle subunità wild-type, si è proceduto ad esprimere i plasmidi KCNB1 wild-type insieme ad un plasmide vuoto (pcDNA3) a diversi rapporti di trasfezione (riportati nella Tabella 14), in cellule CHO:

Tabella 14. Rapporti di trasfezione per i plasmidi KCNB1 WT+pcDNA3+EGFP

cDNA (rapporti di trasfezione)	μg
KCNB1+pcDNA3 (1:1)+EGFP	1.8+1.8+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:10)+EGFP	0.33+3.27+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:20)+EGFP	0.17+3.43+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:40)+EGFP	0.09+3.51+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:80)+EGFP	0.04+3.56+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:160)+EGFP	0.022+3.57+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:320)+EGFP	0.011+3.59+0.4
KCNB1+pcDNA3 (1:640)+EGFP	0.006+3.59+0.4

Le correnti espresse da CHO trasfettate con diversi rapporti di trasfezione hanno mostrato le densità di corrente (Figura 57) riportate nella seguente tabella:

Tabella 15: Densità di corrente espressa dai canali KCNB1 wild-type co-espressi con pcDNA3 nei rapporti di trasfezione indicati

cDNA (rapporti di trasfezione)	n	Densità di corrente (pA/pF)
KCNB1+pcDNA3 (1:1)+EGFP	22	617.8±68.1
KCNB1+pcDNA3 (1:10)+EGFP	3	545±159.1
KCNB1+pcDNA3 (1:20)+EGFP	3	1184.7±190.4
KCNB1+pcDNA3 (1:40) +EGFP	12	594±148.6
KCNB1+pcDNA3 (1:80)+EGFP	21	373.2±79.3
KCNB1+pcDNA3 (1:160)+EGFP	46	344.4±31.6
KCNB1+pcDNA3 (1:320)+EGFP	37	206.9±31.5*
KCNB1+pcDNA3 (1:640)+EGFP	14	310±82.1
*= $p < 0.05$ vs KCNB1+pcDNA3 (1:160) +EGFP		

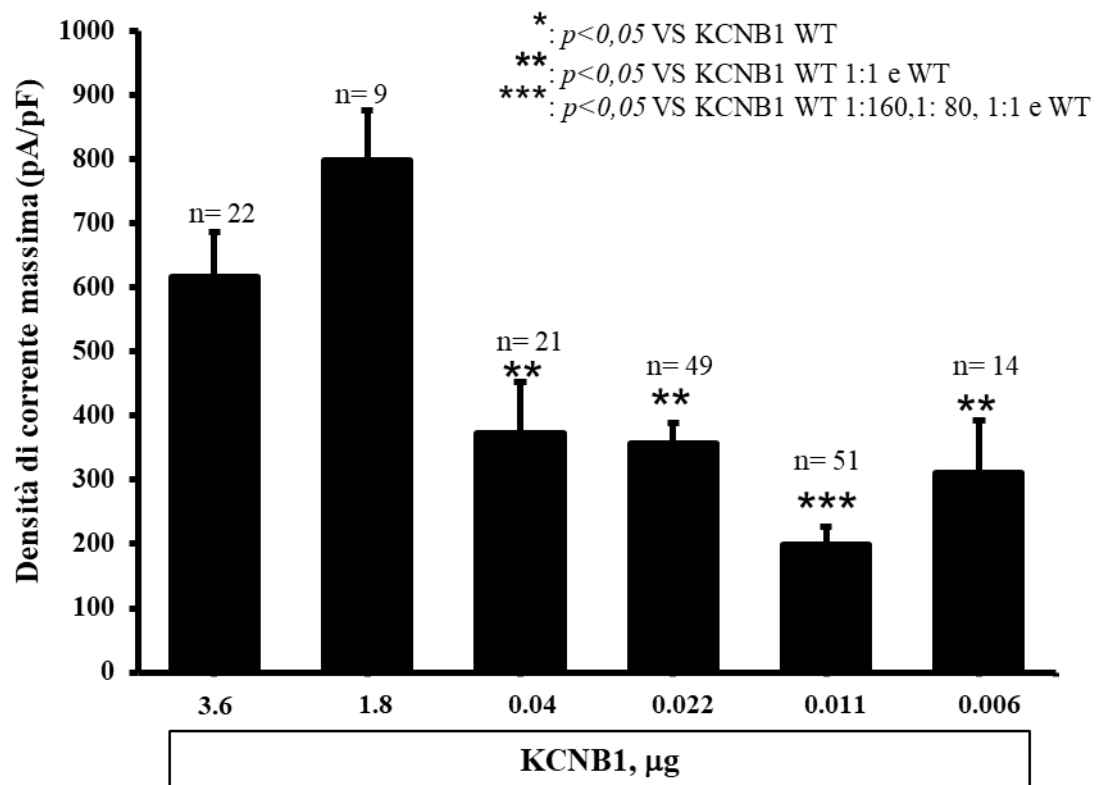


Figura 57. Densità di corrente misurata in cellule trasfettate con diverse quantità del plasmide codificante per i canali KCNB1 wild-type. Quantificazione della densità di corrente espressa dai canali indicati nei rapporti di trasfezione riportati e misurati tramite protocollo di attivazione, riportato nella sezione materiali e metodi, e misurando la densità di corrente come spiegato nella stessa sezione.

Come riportato, solo le cellule trasfettate con 0.011 µg di cDNA mostravano una diminuzione lineare della densità di corrente rispetto quelle trasfettate con 0.022 µg di cDNA: pertanto, queste condizioni sperimentali sono state scelte per indagare l'eventuale effetto di dominanza negativa delle varianti LoF sul canale wild-type; pertanto, i plasmidi che codificano per i canali wild-type o mutanti sono stati co-trasfettati (ovvero il cDNA trasfettato era diviso in eguali quantità tra wild-type e mutante) transientemente in cellule CHO usando le seguenti condizioni sperimentali:

Campione	DNA plasmidico (KCNB1*+ EGFP, µg)	Opti- MEM (µl)	Mix Lipo**(µl)	Opti- MEM dopo 30 minuti (ml)
KCNB1 WT + pcDNA3+EGFP	0.011+3.58+0.4	“	“	“
KCNB1WT+KCNB1#+pcDNA3+EGFP	0.011+0.011+3.57+ 0.4	“	“	“
*KCNB1 WT o mutante **La mix Lipo è stata preparata con 5 µl di Lipofectamina + 250 µl di Opti-MEM per ogni campione # mutante				

Per gli esperimenti di elettrofisiologia sui canali eteromerici sono state utilizzate come controllo le cellule trasfettate con 0.011 µg di cDNA codificante per il canale wild-type.

4.2.6 Caratterizzazione funzionale dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione eteromerica

Al fine di riprodurre il bilancio genico dei probandi e di stabilire se le varianti LoF inducano anche dominanza negativa andando ad inficiare la funzionalità dei canali KCNB1 WT, questi ultimi sono stati co-trasfettati con una stessa quantità di canale mutate per ciascuna variante in studio (0.011±0.011) µg.

In tali condizioni sperimentali, i canali KCNB1 wild-type producono correnti uscenti con densità massima a +80 mV pari a 197.8±25.4 pA/pF (n=51; p<0.05 vs KCNB1 3.6 µg). Fittando tali correnti all'equazione di Boltzmann sono stati ricavati i valori di $V_{1/2}$ e la pendenza della curva (k) che misuravano 5.25±0.8 mV e 15.0±0.6 mV/efold, rispettivamente (Tabella 14, Figura 58A-B).

Per quanto riguarda la variante identificata come GoF (E180G), in configurazione eteromerica non mostra differenze significative rispetto al controllo in termini di densità di corrente (Tabella 16, Figura 58) e voltaggio-dipendenza dell'attivazione (Tabella 16, Figura 58). Per le varianti LoF, tre (R306C, R312H e Y380C) hanno mostrato effetti di dominanza negativa quando co-espresse con il canale wild-type, esprimendo correnti significativamente minori rispetto al controllo (Tabella 16, Figura 58); inoltre, mentre due di esse (R306C e Y380C) non mostrano differenze significative nella voltaggio-dipendenza dell'attivazione, la variante R312H mostra un significativo spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più positivi intermedio rispetto a quello prodotto dai canali omomerici (Tabella 16, Figura 59). Per quanto riguarda le altre varianti LoF (L35P, I204Tfs*38, R312C, V349F, W369* e I412T), la loro funzionalità viene parzialmente recuperata quando espresse in configurazione eteromerica con subunità WT, per cui il meccanismo patogenico sembrerebbe essere l'aploinsufficienza (Tabella 16, Figura 58).

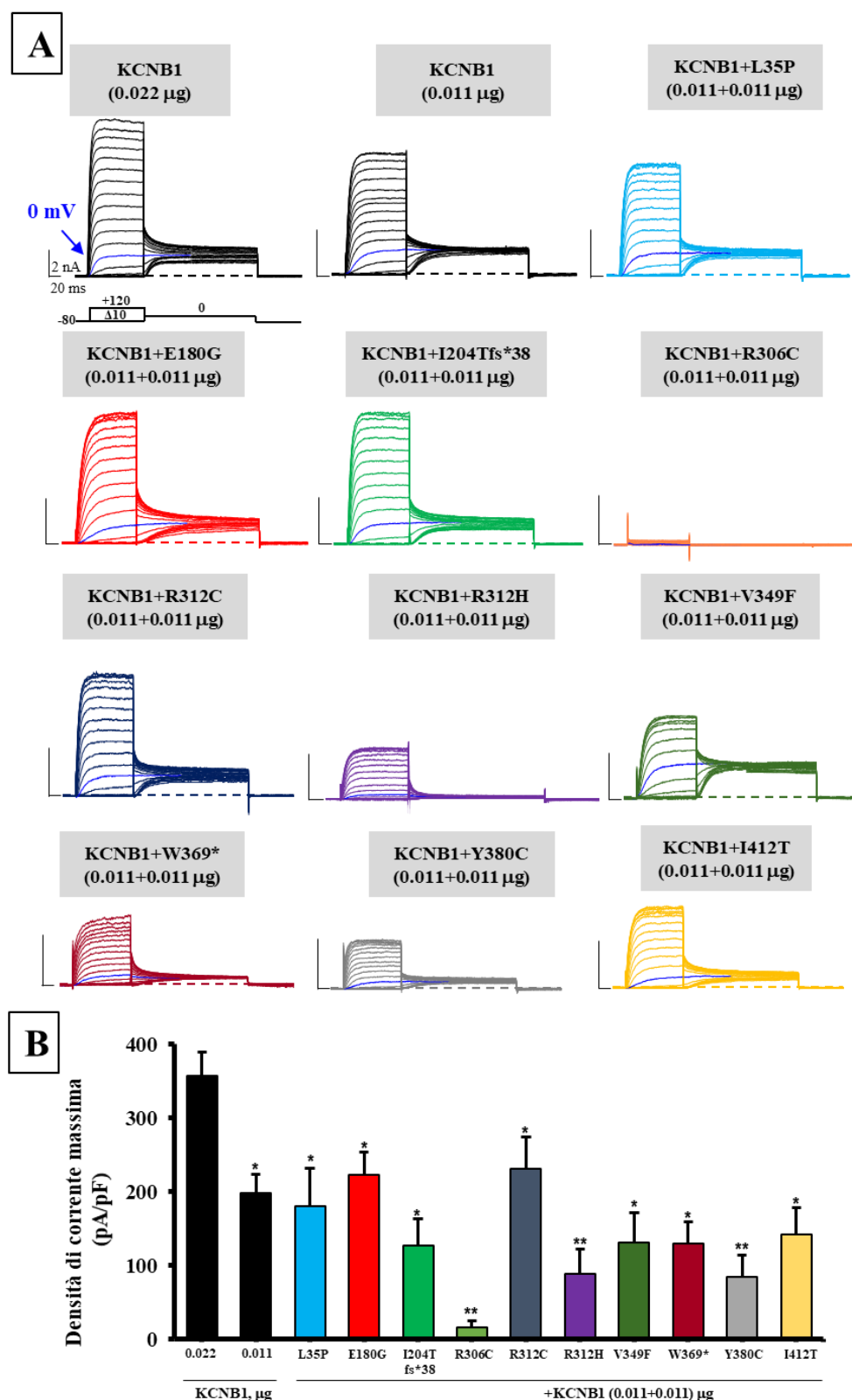


Figura 58. Analisi funzionale dei canali KCNB1 WT o mutanti in configurazione eteromericale.

A) Tracce di corrente rappresentative misurate in cellule CHO incorporanti KCNB1, oppure esprimenti i canali indicati in configurazione eteromericale, in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in figura; la traccia blu indica la corrente espressa a 0 mV. B) Quantificazione della densità di corrente di KCNB1 o dei canali indicati in configurazione eteromericale. * = $p < 0.05$ vs KCNB1 WT 0.022 μg ; ** = $p < 0.05$ vs KCNB1 WT 0.011 μg

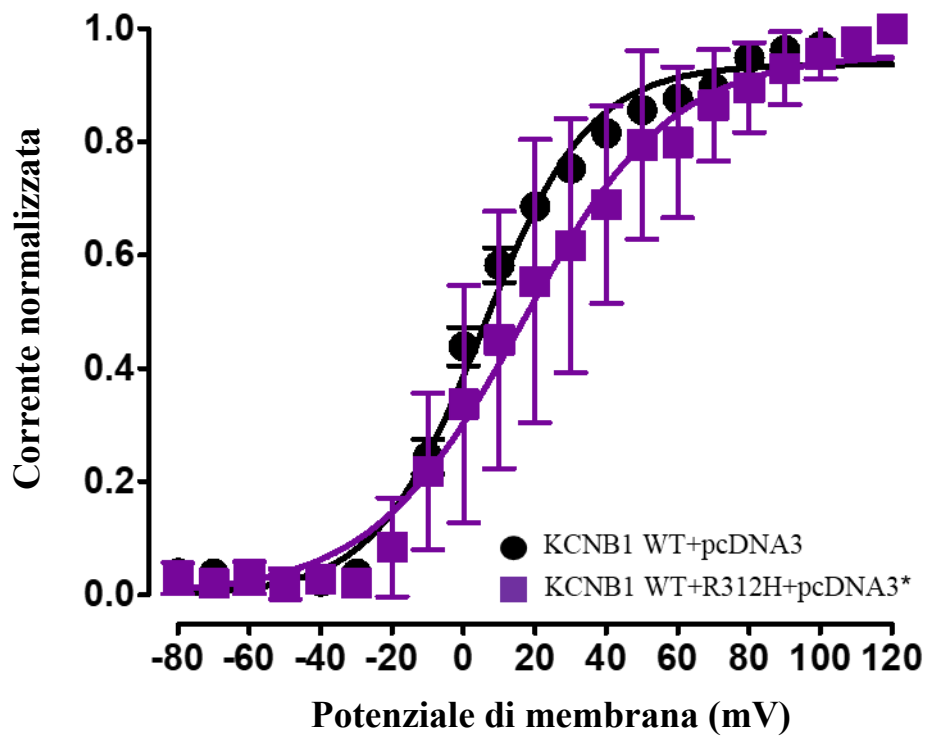


Figura 59. Quantificazione della conduttanza. Confronto tra la voltaggio-dipendenza misurata nei canali indicati. * $p < 0.05$ vs KCNB1 WT+pcDNA3.

Tabella 16. Proprietà biofisiche dei canali WT o incorporanti ciascuna variante in configurazione eteromérica.

CANALE (μg utilizzati)	n	Densità di corrente a +80 mV (pA/pF)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV/efold)
KCNB1 (0.022)	26	356.6 $\pm$ 32.1	-1.07 $\pm$ 0.4	12.1 $\pm$ 0.4
KCNB1 (0.011)	15	197.8 $\pm$ 25.4	5.25 $\pm$ 0.8	15.0 $\pm$ 0.6
KCNB1+L35P (0.011+0.011)	12	180.6 $\pm$ 51.4	-0.8 $\pm$ 0.9	12.7 $\pm$ 0.8
KCNB1+E180G+pcDNA3 (0.011+0.011)	37	222.4 $\pm$ 30.7	7.4 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.5
KCNB1+ Ile204Thrfs*38+ pcDNA3 (0.011+0.011)	9	127.2 $\pm$ 36.3	6.0 $\pm$ 2.0	15.6 $\pm$ 1.7
KCNB1+ R306C+ pcDNA3 (0.011+0.011)	4	16.2 $\pm$ 8.9*	1.8 $\pm$ 1.5	15.6 $\pm$ 1.3
KCNB1+ R312C+ pcDNA3 (0.011+0.011)	19	231.1 $\pm$ 42.8	3.0 $\pm$ 0.7	14.2 $\pm$ 0.6
KCNB1+ R312H+ pcDNA3 (0.011+0.011)	9	88.4 $\pm$ 34.2*	16.2 $\pm$ 2.4*	21.1 $\pm$ 2.1*
KCNB1+ V349F+ pcDNA3 (0.011+0.011)	11	131.5 $\pm$ 40.7	2.4 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.6
KCNB1 +W369*+ pcDNA3 (0.011+0.011)	17	129.8 $\pm$ 29.4	1.0 $\pm$ 0.8	12.9 $\pm$ 0.7
KCNB1+ Y380C+ pcDNA3 (0.011+0.011)	12	84.9 $\pm$ 29.1*	5.9 $\pm$ 0.8	13.21 $\pm$ 0.7
KCNB1+ I412T+ pcDNA3 (0.011+0.011)	15	142.1 $\pm$ 39.7	0.1 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 0.5
*: p<0.05 vs KCNB1 0.011 μg				

Per quanto riguarda le cinetiche di attivazione, si può notare che la variante E180G mostra una τ_{ACT} maggiore nella τ_{FAST} con valori significativi a -20 e da +10 a +30 mV, mentre per la τ_{SLOW} mostra valori maggiori a +20 mV e minori da +70 a +100 mV; per il rapporto delle ampiezze, si può notare che queste non differiscono dal controllo (ad eccezione del valore a +40 mV che risulta maggiore nel mutante rispetto al WT); complessivamente tali dati mostrano che la variante E180G in configurazione eteromerica, ha un'attivazione più lenta rispetto al controllo, indicando effetti LoF (Figura 60), confermando quanto già osservato nelle cinetiche di attivazione dei canali omomerici incorporanti tale variante. Per quanto riguarda la variante R312H, questa mostra valori di τ_{FAST} significativamente minori rispetto al controllo da +50 a +120 mV, e valori di τ_{SLOW} significativamente maggiori rispetto al controllo solo ai potenziali di 0 e +20 mV; poiché i rapporti delle ampiezze, che sono complessivamente maggiori con valori significativi a 0 mV e da +90 a +120 mV, hanno valori intono a 1 indicando una dominanza della cinetica FAST rispetto alla SLOW, tali dati indicano una cinetica di attivazione complessivamente più veloce a partire da +50 mV rispetto ai canali WT (Figura 61), tali dati risultano in contrasto con quanto osservato nei canali omomerici incorporanti tale variante, che mostravano, invece, una cinetica di attivazione significativamente più lenta. Per i canali incorporanti le varianti L35P, I204Tfs*38, W369* e Y380C si osservano nel complesso cinetiche di attivazione maggiori rispetto ai canali WT (con valori significativi a determinati potenziali come mostrato nelle Figure 60-62), indicando un'attivazione più lenta dei canali eteromerici incorporanti tali varianti, confermandone gli effetti LoF. Mentre, per la variante R312C si osservano differenze significative a determinati potenziali nei rapporti delle ampiezze (minori a 0 e 20 mV e maggiori da +90 a +120 mV, Figura 61), indicando una iniziale dominanza della componente SLOW, ovvero un rallentamento della cinetica di attivazione, ed una successiva dominanza della componente FAST (da ~50 mV) indicando un'accelerazione dell'attivazione, tali dati suggeriscono una cinetica di attivazione nel complesso più rapida rispetto ai canali WT. Per la variante V349F, si osserva una τ_{FAST} simile ai canali WT, e una τ_{SLOW} in cui vi è un solo valore maggiore (a +60 mV) rispetto al WT; invece, dai rapporti delle ampiezze si può notare che a +20 e a +30 mV vi sia un contributo maggiore della componente SLOW, poiché tali valori sono significativamente minori rispetto al WT, mentre a +60, +90 e +110 mV vi sia un maggiore contributo della componente FAST, complessivamente si può affermare che per tale variante si osserva una cinetica di attivazione più lenta da 0 a ~ +50 mV e più rapida da ~ +60 a +120 mV (Figura 61). Osservando i dati ottenuti per i canali eteromerici incorporanti la variante I412T, benchè vi sono valori di τ_{SLOW} maggiori rispetto al WT a determinati potenziali (+60 e +70 mV), il rapporto delle ampiezze che è pari a ~1, indica una maggiore contributo della componente FAST rispetto alla SLOW, che però non mostra differenze significative rispetto ai

canali WT, indicando che tale variante ha una cinetica di attivazione simile ai canali WT. Infine, per la variante R306C, che ha mostrato effetti di dominanza negativa rispetto alle subunità WT, non sono state analizzate le cinetiche di attivazione poiché queste non risultavano misurabili in quanto la densità di corrente espressa dai canali eteromerici incorporanti tale variante, si dimostrava estremamente bassa.

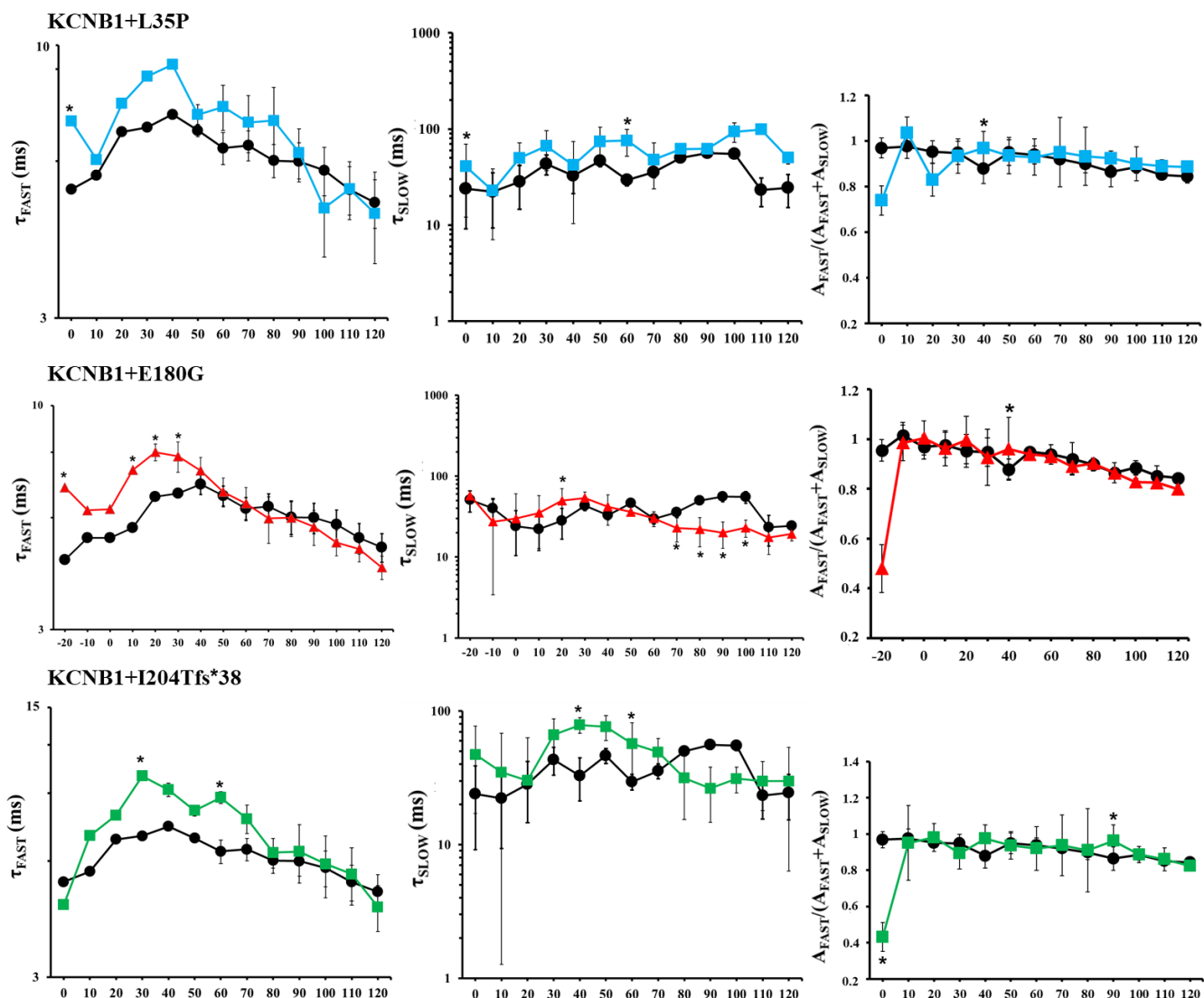


Figura 60. Cinetiche di attivazione dei canali incorporanti le varianti indicate in configurazione eteromerica. A sinistra, quantizzazione della τ_{FAST} , al centro quantizzazione della τ_{SLOW} e a destra il rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, delle τ_{ACT} dei canali KCNB1 WT (0.011 μ g; in nero) o incorporanti le varianti indicate (colorate) co-esprese con KCNB1 WT (0.011 μ g). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT (0.011 μ g).

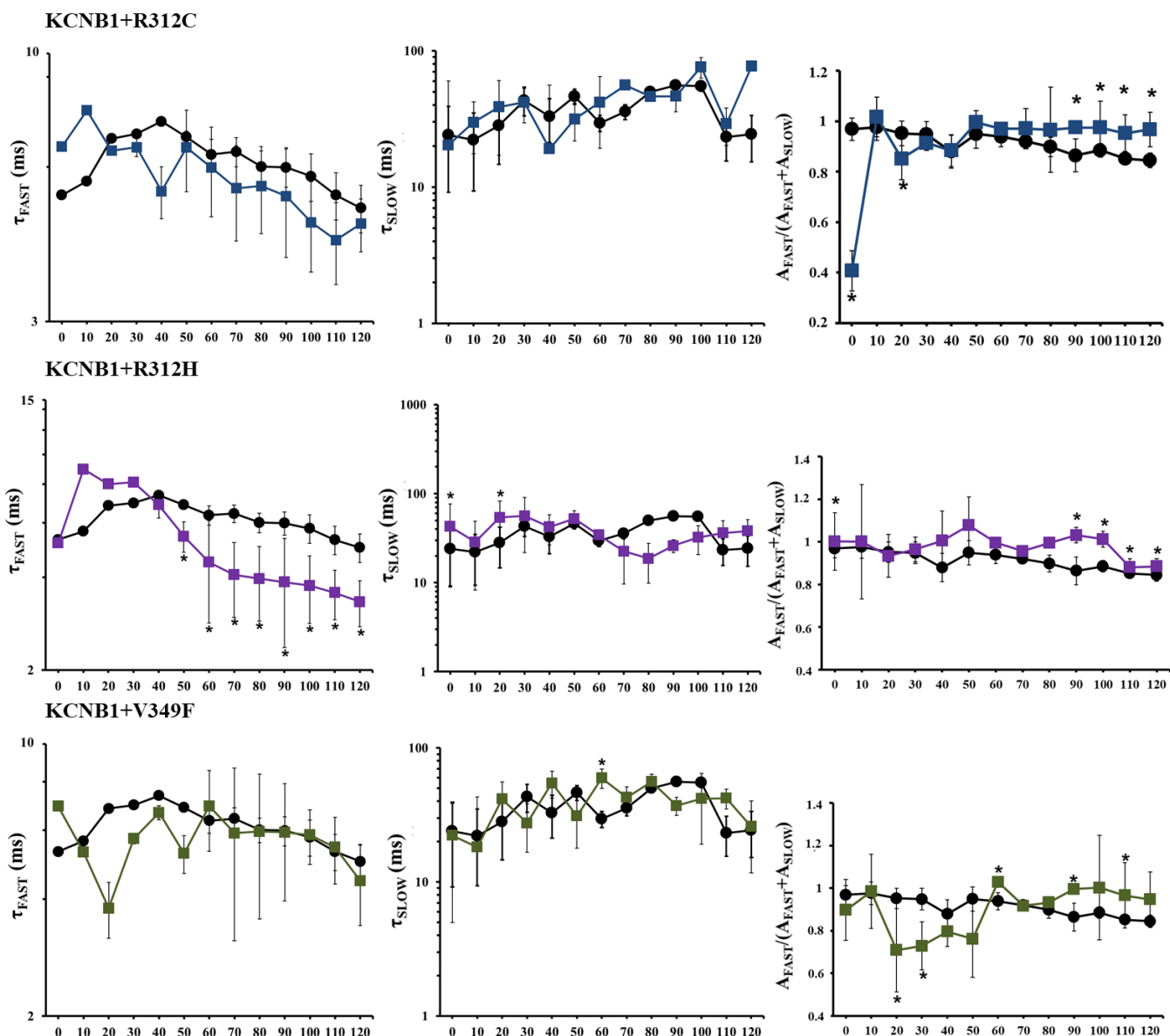


Figura 61. Cinetiche di attivazione dei canali incorporanti le varianti indicate in configurazione eteromeric. A sinistra, quantizzazione della τ_{FAST} , al centro quantizzazione della τ_{SLOW} e a destra il rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, delle τ_{ACT} dei canali KCNB1 WT (0.011 μ g; in nero) o incorporanti le varianti indicate (colorate) co-esprese con KCNB1 WT (0.011 μ g). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT (0.011 μ g).

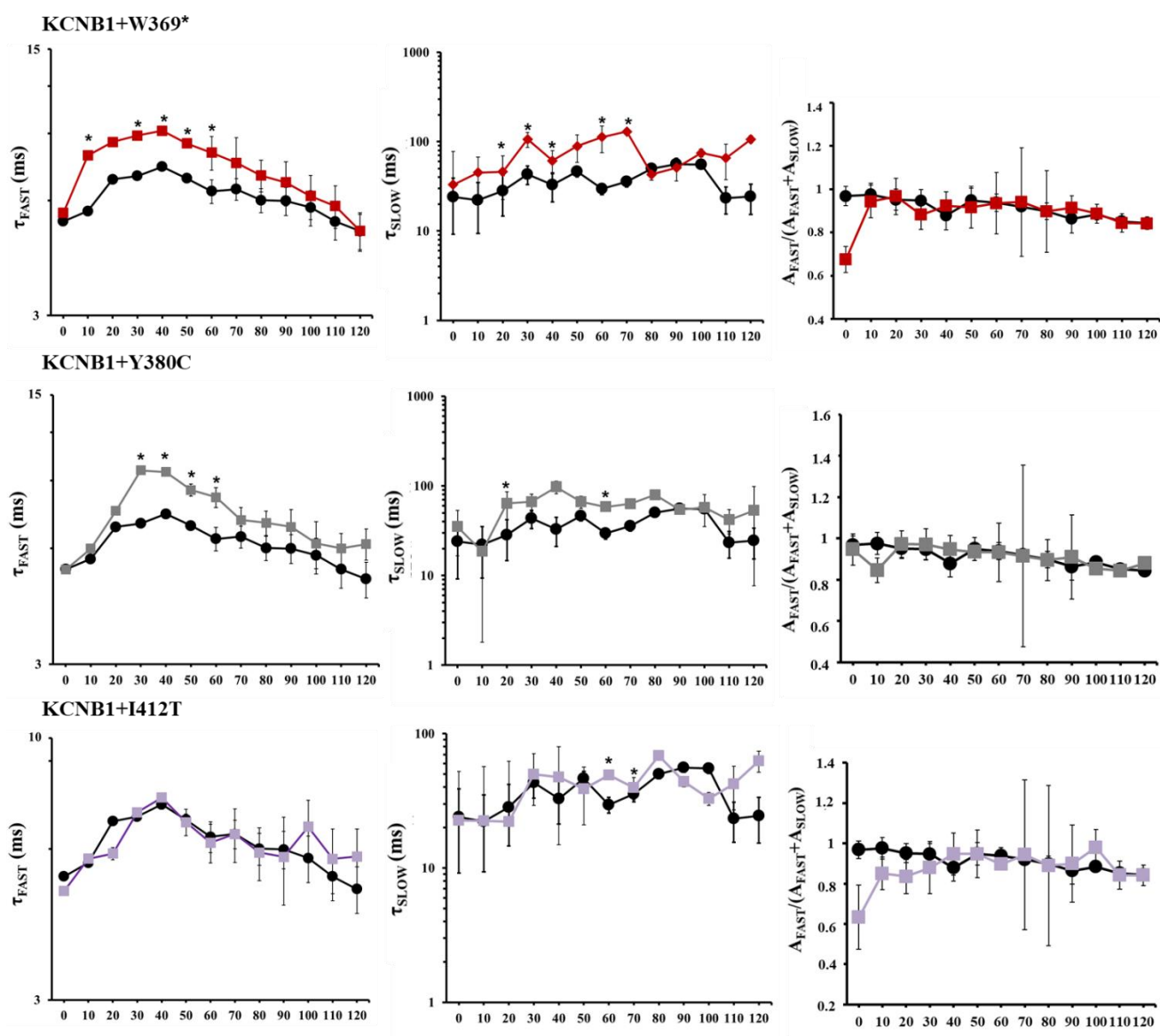


Figura 62. Cinetiche di attivazione dei canali incorporanti le varianti indicate in configurazione eteromerică. A sinistra, quantizzazione della τ_{FAST} , al centro quantizzazione della τ_{SLOW} e a destra il rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, delle τ_{ACT} dei canali KCNB1 WT (0.011 μg ; in nero) o incorporanti le varianti indicate (colorate) co-esprese con KCNB1 WT (0.011 μg). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT (0.011 μg).

Per quanto riguarda le cinetiche di deattivazione, per la variante E180G, in accordo con quanto osservato per i canali omomerici, si osservano valori maggiori di τ_{FAST} a -120 e -110 mV e minori da -30 a 0 mV rispetto al controllo, ma nessuna differenza nella τ_{SLOW} (fatta eccezione per un unico valore a -10 mV che risulta maggiore nel mutante rispetto al WT), mentre nel rapporto delle ampiezze si osservano valori significativamente minori a -90, -80 mV e un valore significativamente maggiore a -20 mV, suggerendo nel complesso effetti GoF/LoF (o mixed; Figura 63, 64). Per quanto riguarda la variante R312H, questa mostra nel complesso una deattivazione più rapida rispetto al controllo poiché mostra valori di τ_{FAST} minori a -60, -50 e 0 mV e dei rapporti delle ampiezze significativamente maggiori a -50 e da -30 a 0 mV indicando una dominanza della componente FAST rispetto alla SLOW, mentre, non si osservano differenze significative nella τ_{SLOW} rispetto al WT; tali dati confermano quanto già osservato nei canali omomerici incorporanti tale variante, ovvero un effetto LoF (Figura 63, 65). Invece, per quanto riguarda le varianti L35P, R312C, V349F, W369* e I412T (Figura 63, 64-66) si osservano cinetiche di deattivazione complessivamente più veloci, con valori significativi a determinati potenziali, sia per le τ_{FAST} (che risultano minori rispetto al WT come mostrato nelle Figure 64-66) che per le τ_{SLOW} (R312C e V349F) e ampiezze, indicando effetti LoF di tali varianti. Mentre per la variante I204Tfs*38 (Figura 63, 64) si osserva a -120 mV un valore di τ_{SLOW} maggiore rispetto al WT, ma nessun'altra differenza significativa per i successivi potenziali e per la τ_{FAST} , invece, si osservano valori significativamente maggiori nei rapporti delle ampiezze da -40 a -20 mV; tali dati indicano nel complesso che tale variante mostra una cinetica di deattivazione più rapida rispetto a quella osservata nei canali WT. Anche la variante Y380C (Figura 63, 66) mostra nel complesso una cinetica di deattivazione più rapida rispetto al WT, poiché si osserva un valore significativamente maggiore a -80 mV nel rapporto delle ampiezze. Per le stesse ragioni già chiarite in precedenza, non sono state misurate le cinetiche di deattivazione per la variante R306C.

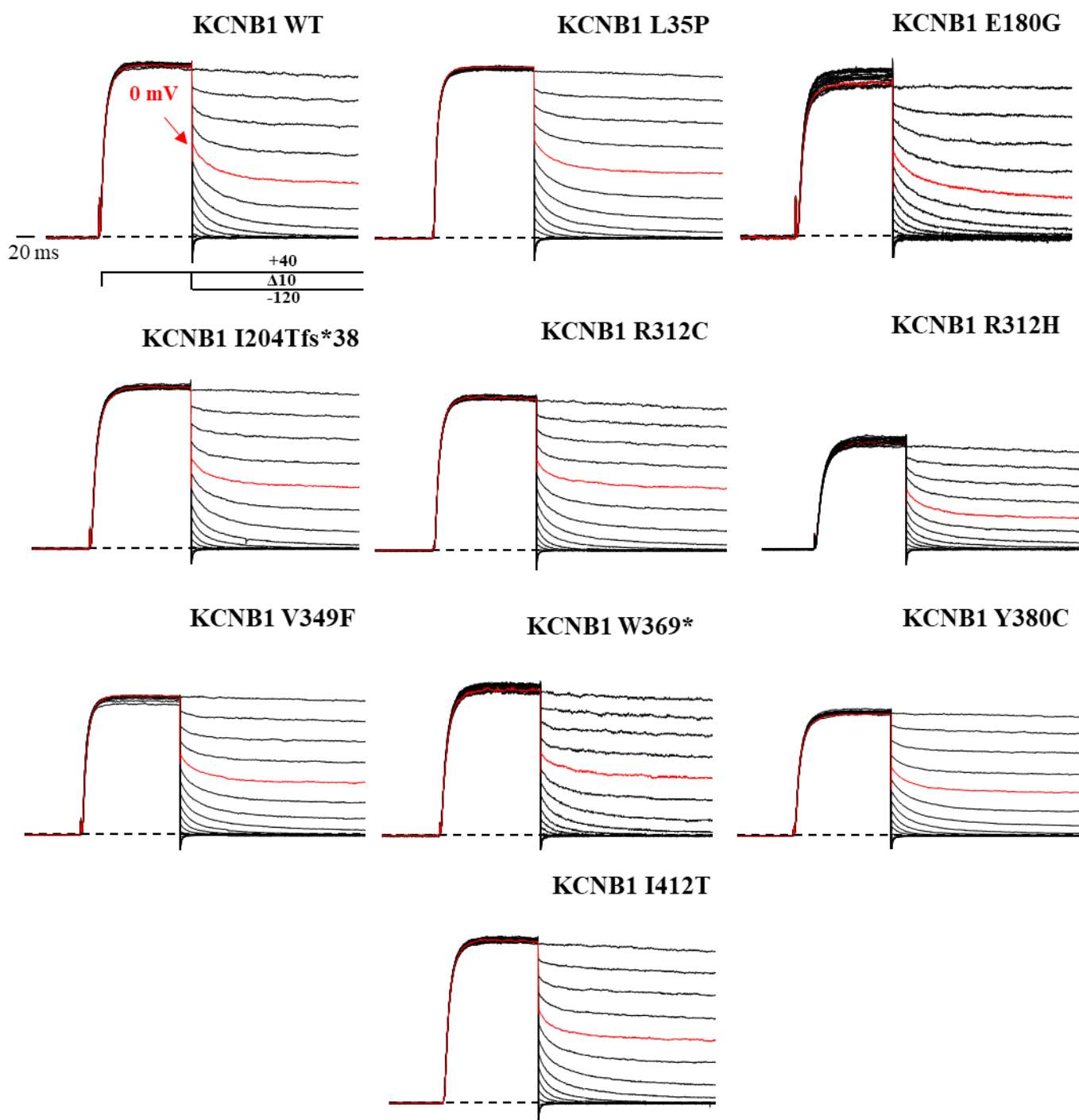


Figura 63. Tracce di corrente rappresentative delle registrazioni utilizzate per l'analisi quantitativa delle cinetiche di deattivazione. Le correnti mostrate sono state registrate in cellule CHO eterologamente esprimenti i canali indicati, in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in figura. In rosso è riportata la traccia di corrente misurata a 0 mV. In figura è mostrata la scala del tempo nel pannello in alto a sinistra; non è mostrata la scala della corrente, in quanto le tracce sono state normalizzate allo stesso valore massimo per confrontare meglio il processo di deattivazione.

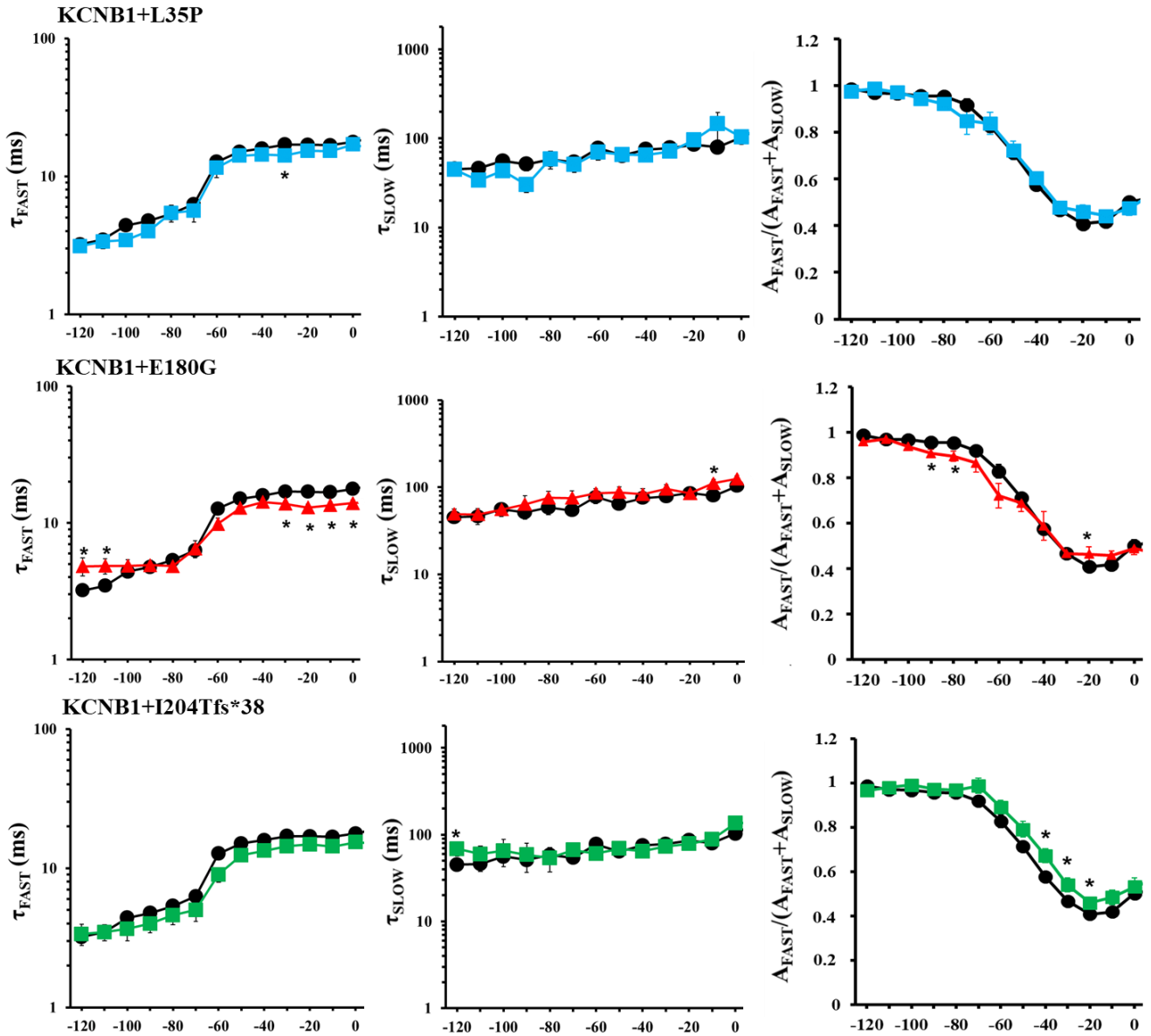


Figura 64. Cinetiche di deattivazione dei canali incorporanti le varianti indicate in configurazione eteromerică. A sinistra, quantizzazione della τ_{FAST} , al centro quantizzazione della τ_{SLOW} e a destra il rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, dei canali KCNB1 WT (0.011 μ g; in nero) o incorporanti le varianti indicate (colorate) co-esprese con KCNB1 WT (0.011 μ g). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT (0.011 μ g).

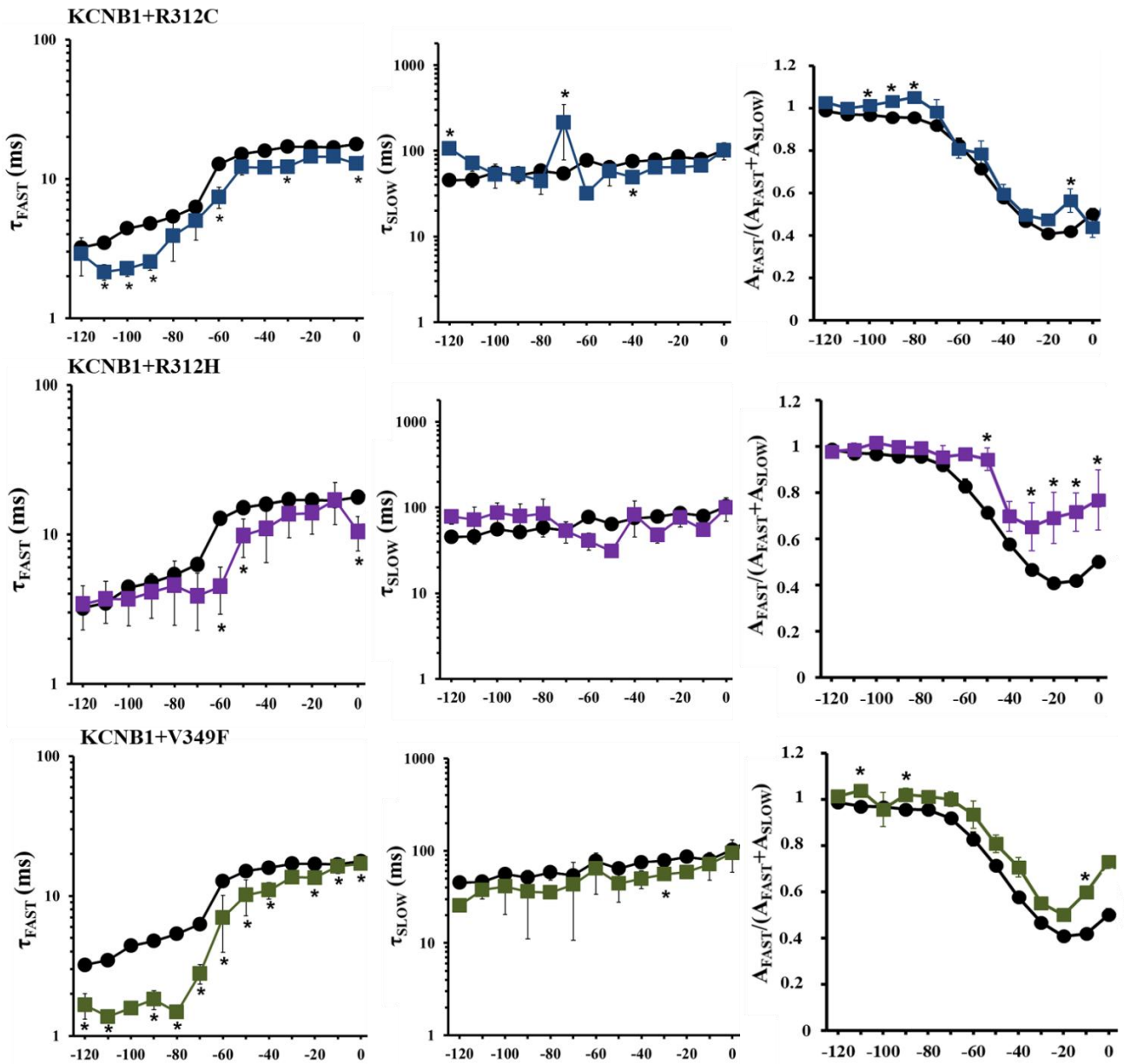


Figura 65. Cinetiche di deattivazione dei canali incorporanti le varianti indicate in configurazione eteromerica. A sinistra, quantizzazione della τ_{FAST} , al centro quantizzazione della τ_{SLOW} e a destra il rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, dei canali KCNB1 WT (0.011 μ g; in nero) o incorporanti le varianti indicate (colorate) co-esprese con KCNB1 WT (0.011 μ g). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT (0.011 μ g).

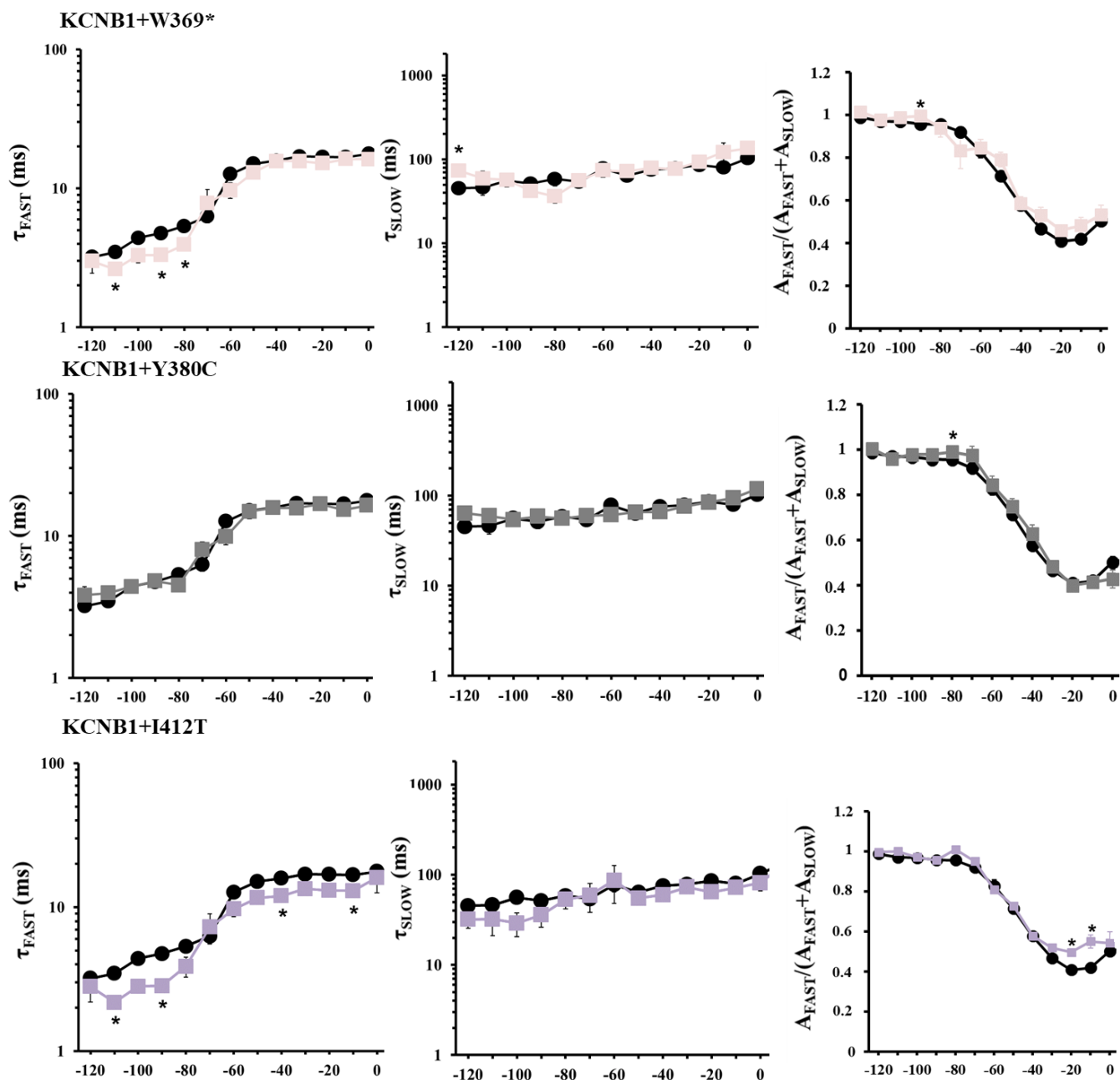


Figura 66. Cinetiche di deattivazione dei canali incorporanti le varianti indicate in configurazione eteromericale. A sinistra, quantizzazione della τ_{FAST} , al centro quantizzazione della τ_{SLOW} e a destra il rapporto delle ampiezze, calcolati a ciascun potenziale mostrato, dei canali KCNB1 WT (0.011 μg ; in nero) o incorporanti le varianti indicate (colorate) co-esprese con KCNB1 WT (0.011 μg). *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT (0.011 μg).

4.2.7 Sensibilità farmacologica dei canali KCNB1 wild-type o incorporanti ciascuna variante in studio in configurazione eteromerica

Considerato che tutte le varianti in studio sono state identificate in eterozigosi nei pazienti e che pertanto la configurazione eteromerica del canale è quella fisiologicamente più attesa, sono stati condotti ulteriori esperimenti di farmacologia per testare gli effetti dei modulatori già individuati negli studi precedenti anche sulle correnti espresse dai canali mutanti in configurazione eteromerica con le subunità wild-type.

Per quanto riguarda l'antidepressivo fluoxetina, come mostrato in Figura 65, l'esposizione a 50 μ M FLX dei canali WT bloccava il $98.6 \pm 0.2\%$ della corrente espressa a +40 mV dai canali KCNB1 wild-type ($n=3$); quando testato sui canali eteromerici KCNB1 WT+KCNB1 E180G, il farmaco ha mostrato un effetto di blocco simile ($97.4 \pm 1.7\%$, $n=6$; $p > 0.05$ vs KCNB1 WT). Inoltre, confrontando le percentuali di inibizione della FLX sui canali WT o mutanti in configurazione omomerica con gli stessi canali in configurazione eteromerica, è emerso che FLX ha un maggiore effetto di blocco delle correnti espresse dai canali incorporanti la variante E180G in configurazione eteromerica rispetto a quelli incorporanti KCNB1 WT in configurazione omomerica.

Per quanto riguarda il CBD, come mostrato in Figura 66, l'esposizione a 10 μ M CBD dei canali WT bloccava il $97.5 \pm 0.2\%$ della corrente espressa a +40 mV dai canali KCNB1 wild-type ($n=4$); quando testato sui canali eteromerici KCNB1 WT+KCNB1 E180G, il farmaco ha mostrato un effetto di blocco significativamente minore ($87.8 \pm 2.2\%$, $n=5$; $p < 0.05$ vs KCNB1 WT), così come era stato osservato per i canali WT o mutanti in configurazione omomerica. I dati ottenuti confermano il possibile impiego terapeutico di entrambi i farmaci in pazienti affetti da DEE portatori della variante E180G.

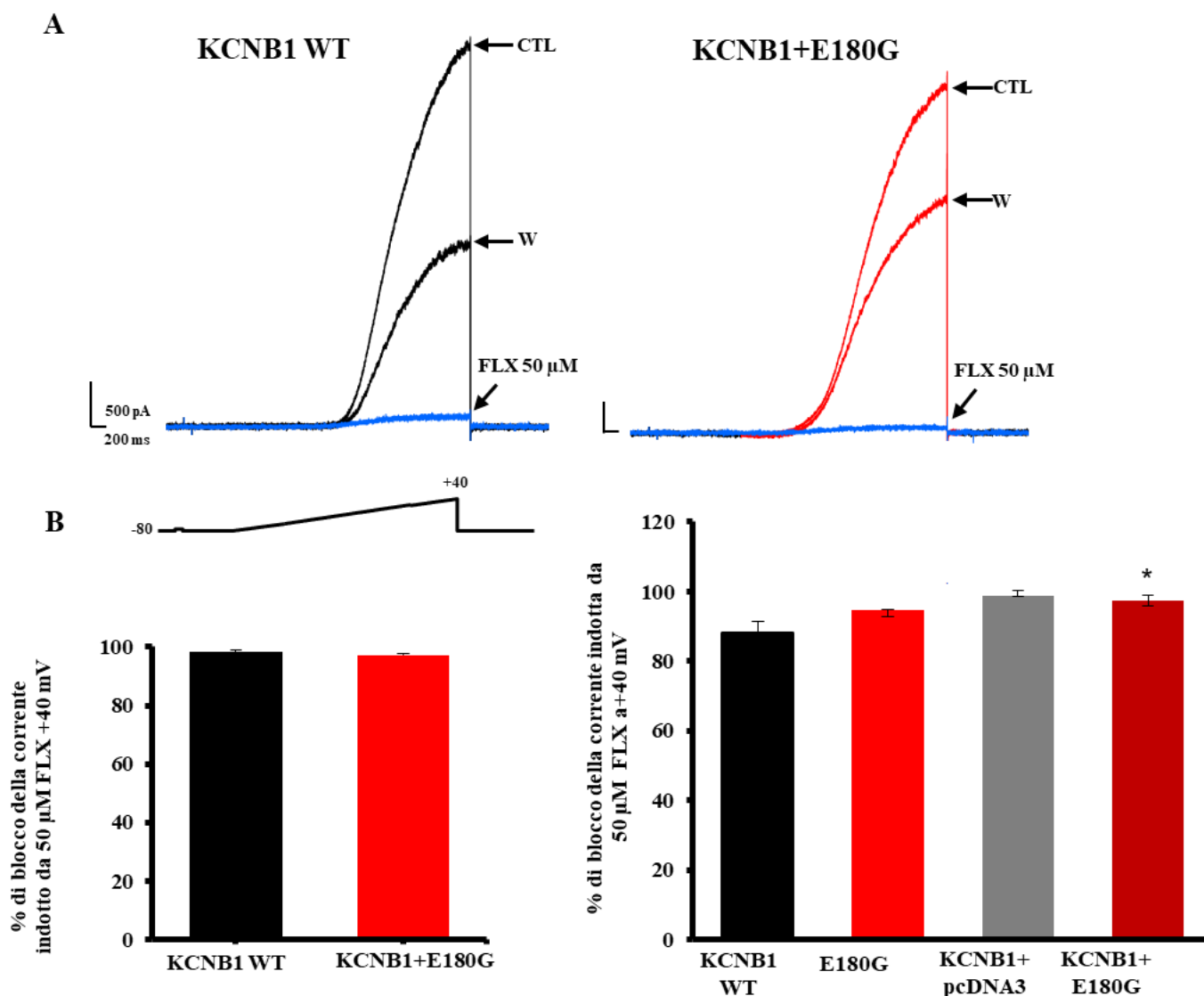


Figura 65. Proprietà farmacologiche dei canali WT o incorporanti la variante E180G in configurazione eteromerica. A) Tracce di corrente espresse dal canale WT (nero) o mutante (rosso) entrambi in configurazione eteromerica, in soluzione controllo (CTL), dopo 2'-3' di esposizione a 50 μ M FLX (blu) o dopo washout (W); B) a sinistra, quantificazione della percentuale di inibizione della corrente espressa a +40 mV dai canali indicati; a destra confronto della percentuale di inibizione della corrente espressa dai canali indicati in configurazione omomerica o eteromerica. *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT

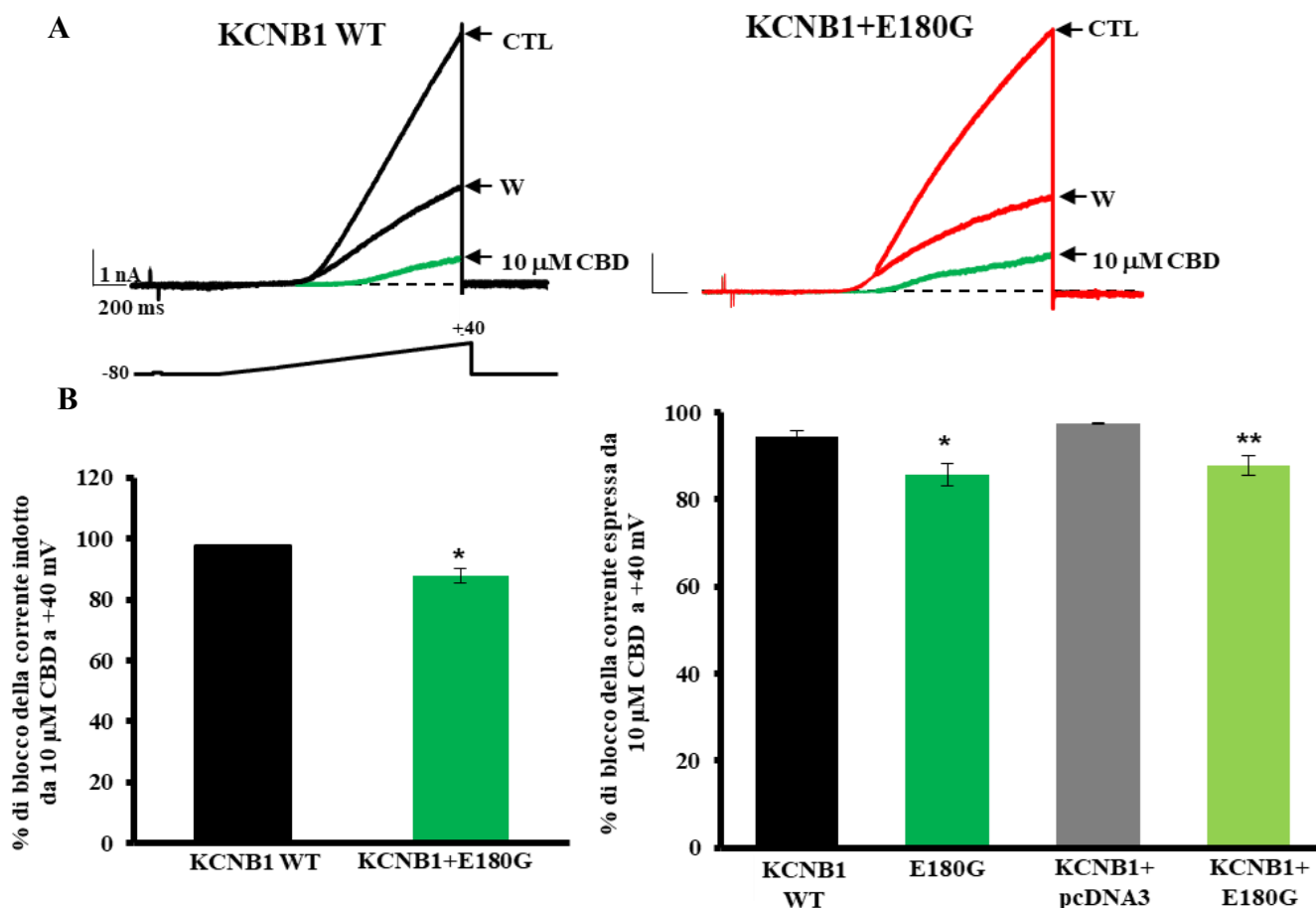


Figura 66. Proprietà farmacologiche dei canali WT o incorporanti la variante E180G in configurazione eteromerica. A) Tracce di corrente espresse dal canale WT (nero) o mutante (rosso) entrambi in configurazione eteromerica, in soluzione controllo (CTL), dopo 2'-3' di esposizione a 10 μM CBD (verde) o dopo washout (W); B) a sinistra, quantificazione della percentuale di inibizione della corrente espressa a +40 mV dai canali indicati; a destra confronto della percentuale di inibizione della corrente espressa dai canali indicati in configurazione omomerica o eteromerica. *: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT, **: $p < 0.05$ vs KCNB1 WT vs KCNB1+pcDNA3.

Per quanto riguarda l'attivatore metformina, dai dati preliminari (non riportati) è emerso che l'attivazione delle correnti espresse dalle cellule incorporanti i canali in configurazione eteromerica KCNB1 WT o incorporanti la variante R312H, è ancora minore rispetto a quella osservata nei canali in configurazione omomerica: questo ci ha portato ad escludere tale farmaco dal possibile utilizzo come terapia personalizzata nei pazienti affetti da DEE portatori di tale variante o di altre varianti LoF. Ulteriori studi sono in corso per individuare farmaci in grado di potenziare maggiormente le correnti espresse dal canale KCNB1.

5. DISCUSSIONE

L'epilessia rappresenta un disturbo neurologico ad eziologia eterogenea ed in parte non nota; tuttavia, negli ultimi decenni l'avvento delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha rivoluzionato la nostra comprensione della sua eziologia (*Vetri et al., 2024*), in particolare delle Encefalopatie Epiletiche e dello Sviluppo (DEE), ossia severe forme di epilessia ad esordio precoce spesso non responsive ai tradizionali trattamenti antiepilettici (*Vasquez et al., 2025*), rivelando come una porzione significativa di queste forme gravi di epilessia sia riconducibile a mutazioni a carico di canali ionici; tra questi, numerose mutazioni sono state identificate nei geni che codificano per canali del K^+ (*Zheng et al., 2024*). Come analizzato in questo studio, mutazioni a carico di geni codificanti per i canali KCNT1 o KCNB1 possono portare ad alterazioni funzionali di queste proteine, sia attraverso effetti di perdita di funzione (*Loss-of-Function*, LoF) sia di guadagno di funzione (*Gain-of-Function*, GoF). Il meccanismo secondo il quale mutazioni con effetti opposti a carico dello stesso gene possano portare spesso allo stesso fenotipo rimane ancora oggetto di studio (*Niday et al., 2018*); tuttavia, una possibile spiegazione risiede nel fatto che in entrambi i casi si giunge ad un aumento del *firing* neuronale o attraverso l'impedimento della corretta ripolarizzazione neuronale di neuroni eccitatori, o attraverso un'eccessiva iperpolarizzazione di neuroni inibitori (*Niday et al., 2018*).

Il problema maggiore per i pazienti affetti da DEE ad eziologia genetica è legato all'inefficacia e tossicità dei trattamenti convenzionali (*Vasquez et al., 2025*); pertanto, la necessità di nuovi trattamenti per tali pazienti risulta essere un'emergenza clinica. Lo scopo di questo lavoro di Ricerca è stato quello di caratterizzare gli effetti funzionali di diverse varianti riscontrate in pazienti affetti da DEE nei geni KCNT1 o KCNB1 e di individuare modulatori di tali canali che potessero essere putativi nuovi trattamenti per tali pazienti sulla base della specifica mutazione riscontrata e dei suoi effetti funzionali. Tali modulatori sono stati selezionati secondo il *drug repurposing*, ovvero proponendo l'utilizzo di farmaci già approvati in altre patologie. Questa strategia offre diversi vantaggi rispetto alla sperimentazione di nuovi farmaci, in quanto riduce drasticamente i tempi e i costi dello sviluppo, considerato che tutte le informazioni relative alla farmacocinetica, sicurezza e tossicità sono già disponibili; in tal modo, tale approccio, permette di accelerare l'accesso a terapie efficaci per patologie severe come le DEE consentendo di valutare rapidamente l'efficacia di modulatori già clinicamente utilizzati, minimizzando i rischi per i pazienti (*Pushpakom et al., 2019*).

5.1 KCNT1

I canali del potassio KCNT1 sono ampiamente espressi nel SNC, in particolare risultano essere molto presenti nel bulbo olfattivo, nel mesencefalo e nel tronco encefalico (*Bhattacharjee et al., 2002*), dove svolgono un ruolo cruciale nella regolazione dell'eccitabilità neuronale, modulando la ripolarizzazione e la frequenza di scarica dei neuroni, in particolare in quelli inibitori (*Gertler et al., 2022*). Mutazioni riscontrate nei canali KCNT1 sono state associate all'insorgenza delle Encefalopatie Epilettiche e dello Sviluppo (DEE; *Bonardi et al., 2021*), una grave forma di epilessia caratterizzata da esordio precoce, abbondante attività epilettica, disabilità intellettiva e spesso resistenza ai farmaci antiepilettici tradizionali. Quest'ultima caratteristica manifestata dai pazienti portatori di varianti nel gene KCNT1 rende l'individuazione di modulatori specifici un'urgenza clinica. Poiché la quasi totalità delle varianti ad oggi caratterizzate funzionalmente per i canali KCNT1 è associata ad effetti GoF (*Duan et al., 2025*), la ricerca di modulatori potenzialmente efficaci in tali pazienti si è focalizzata sull'identificazione di molecole capaci di inibire efficacemente tali canali, quali ad esempio gli antiaritmici chinidina e bepridil (*Yang et al., 2006*). La **chinidina**, proposta come prima strategia di medicina di precisione per le epilessie correlate a KCNT1 (*Bearden et al., 2014*), è stata oggetto di un'ampia analisi retrospettiva condotta da *Fitzgerald e coll. (2019)* su una coorte di 43 pazienti: da tale studio, si evince che, nonostante le premesse teoriche che indicano la capacità del farmaco di contrastare *in vitro* gli effetti prodotti da diverse varianti identificate in KCNT1, l'efficacia clinica è estremamente eterogenea: infatti, su 20 pazienti trattati solo una minoranza ha riportato benefici significativi con 6 pazienti che mostravano una riduzione delle crisi <50%, 2 con riduzione >50%, 2 con riduzione iniziale seguita da *seizure-freedom* e 1 con assenza totale di crisi per oltre tre mesi. È degno di nota come tutti i soggetti che hanno raggiunto la completa remissione delle crisi, seppur transitoria, fossero portatori di mutazioni localizzate nel dominio RCK2: tale evidenza suggerisce che l'efficacia della chinidina possa dipendere, non solo dagli effetti funzionali indotti dalla specifica mutazione, ma anche dalla sua localizzazione all'interno della proteina. Nonostante il suo accreditamento come alternativa terapeutica per forme refrattarie di epilessia, l'uso della chinidina è severamente limitato da criticità farmacocinetiche e di sicurezza: tra queste, in primo luogo il suo effetto cardiotossico, che può indurre un prolungamento dell'intervallo QT, esponendo i pazienti al rischio di aritmie potenzialmente fatali, come la torsione di punta (*Tsai et al., 2005*); in secondo luogo, la letteratura evidenzia un'efficacia età-dipendente, in quanto il trattamento è correlato con una migliore risposta clinica ed un recupero delle funzioni cognitive se iniziato prima dei 4 anni, mentre nei pazienti più grandi (>4 anni) l'efficacia decade drasticamente, verosimilmente a causa dell'instaurarsi di un danno encefalico irreversibile (*Abdelnour et al., 2018*).

Inoltre, anche nei casi di risposta positiva, il beneficio appare spesso parziale, transitorio e privo di un impatto determinante sul recupero dello sviluppo psicomotorio. Un ulteriore limite nell'uso clinico del farmaco è rappresentato dall'elevato tasso di efflusso della chinidina attraverso la barriera ematoencefalica (*Kusuhara et al., 1997; Suzuki et al., 2007*), che spesso impedisce il raggiungimento di concentrazioni terapeutiche cerebrali adeguate prima dell'insorgenza di tossicità. In questo scenario, il **bepridil** è emerso come un'alternativa promettente, avendo dimostrato una potenza inibitoria *in vitro* 10 volte maggiore rispetto alla chinidina (*Yang et al., 2006*): studi *in vitro* condotti da *Rizzo e coll.* (2016) sulle varianti GoF KCNT1-G288S e KCNT1-M516V, riscontrate in pazienti epilettici, hanno confermato la capacità del bepridil di bloccare le correnti dei canali wild-type e mutanti a concentrazioni minori rispetto a quelle di chinidina, con un effetto maggiore sui canali mutanti rispetto ai wild-type. Tuttavia, oltre al suo profilo non selettivo sui canali ionici (*Gill et al., 1992*), il bepridil è stato associato al prolungamento del QT cardiaco (*Gaita et al., 2001*): questo rischio, combinato con la disponibilità di alternative terapeutiche più sicure, ha reso il profilo rischio-beneficio del bepridil sfavorevole, per cui molti Paesi hanno proceduto al ritiro dal commercio di questo farmaco. Parallelamente, il **clofilium** è stato identificato come un efficace inibitore dei canali KCNT1 e dell'omologo KCNT2, sebbene con una potenza sovrapponibile a quella della chinidina (~100 μ M), ma è estremamente più potente nell'inibizione dei canali cardiaci hERG (IC_{50} ~2.5 nM) e presenta anche una struttura molecolare e un profilo farmacocinetico inadatti a un farmaco per il SNC (*de los Angeles Tejada et al., 2012; Di Matteo et al., 2024*); inoltre, ad oggi non risultano studi che riportino l'utilizzo del clofilium nel trattamento di pazienti epilettici. Un ulteriore farmaco testato come bloccante dei canali KCNT è il **carvedilolo**, utilizzato per patologie del sistema cardiovascolare per le sue azioni antagoniste sui recettori β -adrenergici (β_1 e β_2) e α_1 -adrenergici, determinando una riduzione della frequenza cardiaca, della contrattilità miocardica e vasodilatazione periferica. Questo farmaco mostra anche un'azione neuroprotettiva grazie alle sue proprietà antiossidanti che contribuiscono alla protezione contro danni neuronali, apoptosi e infiammazione (*Yue et al., 1992*). Uno studio pubblicato nel 2024 ha identificato il carvedilolo come modulatore farmacologico del canale KCNT1: in questo studio tale farmaco si è dimostrato in grado di revertire gli effetti di guadagno di funzione indotti dalla variante M267T testati in diversi modelli di espressione cellulare (in oociti di *Xenopus laevis*, cellule HEK293T o in neuroni ippocampali murini), mostrando una maggiore potenza rispetto alla chinidina. Inoltre, nel modello di epilessia indotta da kainato il carvedilolo ha dimostrato effetti anticonvulsivanti, suggerendo un potenziale beneficio funzionale *in vivo* (*Di et al., 2024*). Questo farmaco quindi agisce come modulatore dei canali ionici, con possibili applicazioni terapeutiche in ambito cardiaco e neurologico (*Cheng et al., 2019*); tuttavia, la sua azione non selettiva su diversi canali del potassio, nonché effetti collaterali come bradicardia,

ipotensione e rischio di broncospasmo rendono complesso il riposizionamento del farmaco per pazienti con DEE. Un ulteriore modulatore ad azione bloccante che è stato ampiamente studiato negli ultimi anni ed approvato come trattamento alternativo per alcune tipologie di epilessie refrattarie (Sindrome di Dravet, Sindrome di Lennox-Gastaut e Complesso della sclerosi tuberosa; *Silvinato et al., 2022*) è il **cannabidiolo** (CBD), un fitocannabinoide non psicoattivo derivato dalla *Cannabis sativa* (*Devinsky et al., 2014; Devinsky et al., 2017*). In un recente lavoro, è stato dimostrato che il CBD inibisce in modo diretto le correnti espresse dai canali KCNT1, mostrando un'IC₅₀ pari a 5.6 µM per i canali wild-type ed una potenza significativamente maggiore sulle varianti GoF associate a epilessia R398Q e R928C (IC₅₀ ≈ 0.4–0.5 µM). Gli stessi autori hanno esteso l'analisi a un modello animale di epilessia correlata a KCNT1 in *Drosophila*, in cui l'espressione neuronale di varianti patogeniche in KCNT1 induce un marcato fenotipo convulsivo. In questo contesto, la somministrazione di CBD ha determinato una significativa riduzione della suscettibilità alle crisi, mentre diversi farmaci antiepilettici tradizionali non risultavano efficaci, rafforzando l'ipotesi che l'inibizione funzionale di KCNT1 tramite CBD rappresenti un meccanismo anticonvulsivante rilevante *in vivo* (*Hussain et al., 2024*). Infine, il CBD è stato somministrato anche a pazienti affetti da EIMFS portatori di varianti in KCNT1, con risposta clinica eterogenea: infatti, alcuni pazienti mostrano una riduzione della severità o della frequenza delle crisi, mentre in altri il beneficio è limitato o assente. Sebbene questi dati non consentano ancora di stabilire un'efficacia clinica definitiva del CBD nelle epilessie correlate a KCNT1, essi risultano coerenti con le evidenze *in vitro* (*Poisson et al., 2020*). Recentemente, anche il farmaco antidepressivo **fluoxetina** (FLX) ha mostrato effetti bloccanti sia sulle correnti espresse dai canali KCNT1 (*Mosca et al., 2024; Trivisano et al., 2024*) sia su quelle dei canali KCNT2 (*Cioclu et al., 2023*), oltretutto su altri canali del potassio come KCNA3 (Kv1.3, *Soldovieri et al., 2024*) e KCNC1 (Kv3.1, *Ambrosino et al., 2023*). Tale farmaco è un antidepressivo appartenente alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) ed è ampiamente utilizzata nel trattamento della depressione maggiore: grazie al suo profilo di efficacia e tollerabilità, rappresenta tuttora uno degli SSRI più prescritti a livello mondiale (*Wong et al., 1995; Stahl, 2013*). Dal punto di vista farmacologico, la fluoxetina agisce principalmente inibendo il trasportatore della serotonina (SERT) a livello della membrana presinaptica, determinando un aumento delle concentrazioni di serotonina nello spazio sinaptico e un potenziamento quindi della trasmissione serotoninergica (*Owens et al., 2001*). Sebbene ben tollerata, la fluoxetina può indurre effetti avversi, sia più frequenti e lievi (nausea, insonnia, cefalea, agitazione, ecc.) che più gravi, come la sindrome serotoninergica o tendenze suicide (*Stahl, 2013*). Inoltre, già nel 1999 *Yeung e coll.* dimostrarono che la fluoxetina era in grado di inibire in maniera significativa le correnti dei canali del K⁺ voltaggio-dipendenti (Kv) neuronali, rappresentando uno studio pionieristico che ha esteso

l'analisi a diversi sottotipi di canali come KCNT1. In questo contesto, un recente *case report* ha descritto un marcato miglioramento riscontrato in un paziente affetto da epilessia focale farmaco-resistente associata ad una variante GoF in KCNT1 (S937G), in seguito a trattamento con fluoxetina rivelatosi efficace *in vitro* nel contrastare l'effetto GoF indotto da tale variante e supportando, quindi, la rilevanza clinica di tale farmaco (Mosca *et al.*, 2024). Analoghi risultati sono stati ottenuti in altri 3 pazienti affetti da DEE e portatori di altre 3 diverse varianti (R356W, R398Q e R474H) in KCNT1 (Trivisano *et al.*, 2024); due di tali varianti (R356W e R398Q), in parallelo ad una successiva (R428Q), sono state funzionalmente caratterizzate mostrando tutti effetti GoF (in termini di significativo aumento della densità di corrente e della componente istantanea, ed uno spostamento significativo della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più negativi). Tali varianti risultavano localizzate nel dominio C-terminale del canale e, in particolare, due di esse ricadono nel dominio RCK1 (*Regulator of K⁺ Conductance*), noto per mediare la sensibilità del canale agli ioni intracellulari, in particolare al sodio, e a cofattori come il NAD⁺ e il PIP₂, regolando quindi la probabilità di apertura e la cinetica di attivazione del canale. Pertanto, gli effetti GoF osservati per le 3 varianti in studio potrebbero essere verosimilmente indotti dalla stabilizzazione del canale nello stato aperto e dalla riduzione della soglia di attivazione dovuta ad un aumento della sensibilità al sodio o ai cofattori che ne mediano l'attivazione. Inoltre, considerando che il C-terminale è coinvolto in molte interazioni proteiche e regolazioni post-traduzionali, come fosforilazione (che stabilizza KCNT1 nello stato aperto; Santi *et al.*, 2006), il legame alla proteina FMRP (che attiva le correnti espresse da KCNT1; Brown *et al.*, 2010) e Phactr1 (che recluta PP1 e promuove la defosforilazione del canale riducendo la corrente espressa; Fleming *et al.*, 2016), è plausibile ipotizzare che mutazioni in questo dominio potrebbero alterare simultaneamente più pathway di modulazione, amplificando l'effetto GoF e spiegando la severità fenotipica osservata nei pazienti. Alla luce del fatto che tutte le varianti in studio hanno mostrato effetti GoF rispetto al canale wild-type, si è deciso di condurre degli esperimenti di sensibilità farmacologica utilizzando come farmaco bloccante la fluoxetina. Da tali esperimenti è emerso che tale farmaco è in grado di bloccare di ~ il 75% le correnti espresse dai canali KCNT1 sia WT che incorporanti ciascuna delle varianti in studio, mostrando un'azione di blocco anche maggiore sui canali incorporanti le varianti (in particolare la R356W) rispetto ai canali WT. Questo fenomeno potrebbe riflettere una preferenza del farmaco per lo stato aperto dei canali o una maggiore accessibilità dei siti di legame indotta dalle mutazioni, che stabilizzano il canale in conformazioni più suscettibili all'inibizione. Tale osservazione suggerisce un meccanismo parzialmente selettivo che potrebbe essere sfruttato in un contesto di medicina personalizzata, orientando il trattamento sulla base del genotipo del paziente e dell'effetto funzionale della mutazione. Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, la fluoxetina è stata aggiunta alla terapia utilizzata

nei due pazienti portatori delle varianti R356W e R398Q, riscontrando un'efficacia elevata, seppur variabile: in particolare, il paziente con la variante R398Q, trattato all'età di 1.5 anni, ha mostrato la risposta clinica migliore, con riduzione significativa delle crisi ($>75\%$) e un miglioramento generale a livello cognitivo, di umore e comportamento, mentre per il paziente portatore della variante R356W, trattato all'età di 14 anni, la riduzione della frequenza delle crisi è stata più modesta ($>50\%$; *Trivisano et al., 2025*); pertanto, è ipotizzabile una correlazione tra l'età di inizio del trattamento e la maggiore efficacia *in vivo* della fluoxetina probabilmente perché in pazienti con età maggiore il danno neuronale, indotto dall'iperattività di KCNT1, è in parte già consolidato al momento dell'inizio della terapia, che non è in grado di per sé di recuperare tale danno. Oltre alla differenza tra i due pazienti nell'età di inizio del trattamento, è da sottolineare che la variante R356W induce effetti GoF maggiori rispetto all'altra variante (R398Q) in termini di spostamento verso sinistra della voltaggio-dipendenza dell'attivazione e di aumento della componente istantanea: pertanto, si può ipotizzare che, sebbene il blocco *in vitro* da parte della fluoxetina risulti percentualmente simile per tutti i mutanti, il farmaco ha una maggiore probabilità di ripristinare efficacemente la funzionalità dei canali incorporanti la variante R398Q *in vivo* poiché tale variante induce effetti GoF più lievi. Il farmaco è risultato generalmente ben tollerato, con effetti avversi lievi e transitori, come vomito e distonia reversibili, probabilmente correlata ai livelli ematici elevati di fluoxetina, che sono regrediti con la riduzione della dose. Infatti, i livelli plasmatici di fluoxetina, così come quelli dei concomitanti farmaci antiepilettici, sono stati monitorati periodicamente, mostrando una corrispondenza con le concentrazioni testate *in vitro*: infatti, i livelli plasmatici risultavano pari a ~ 310 ng/ml per il paziente portatore delle varianti R356W e ~ 360 ng/ml per il paziente portatore della variante R398Q, corrispondente a concentrazioni pari a ~ 1.0 μM , un valore che rientra nel range delle concentrazioni efficaci *in vitro* nel bloccare le correnti KCNT1-mediate. Poiché è noto che la fluoxetina raggiunge una concentrazione ~ 10 volte maggiore nel SNC rispetto a quella rilevata a livello ematico (*Altamura et al., 1994*), i dati ottenuti confermano che il miglioramento clinico osservato nei pazienti in seguito al trattamento farmacologico sia in parte legato all'azione del farmaco sulle correnti KCNT1-mediate. Tuttavia, è ipotizzabile che gli effetti clinici osservati con l'uso del farmaco siano dovuti anche alla sua capacità di bloccare anche altri canali del potassio (*Wang et al., 2020; Ambrosino et al., 2023; Soldovieri et al., 2023; Cioclu et al., 2023*) e/o ai suoi effetti sulla trasmissione serotoninergica: infatti, è noto che la fluoxetina può esercitare effetti antiepilettici indiretti tramite l'inibizione della ricaptazione della serotonina, aumentando quindi la concentrazione sinaptica di questo neurotrasmettitore che, agendo su diversi recettori, modula l'eccitabilità neuronale (*Bagdy et al., 2007*). In accordo, studi su modelli animali hanno dimostrato che i farmaci inibitori del re-uptake

della serotonina e agonisti diretti dei recettori della serotonina riducono la frequenza delle crisi nello stato epilettico indotto da pilocarpina o da kainato (*Vermoesen et al., 2012; Hernandez et al., 2002*).

Oltre ai farmaci menzionati, in un recente lavoro di *Ricos e coll. (2025)* gli autori hanno attuato un altro approccio di *drug repurposing* basato sullo *screening in silico* di farmaci già in uso clinico potenzialmente capaci di legare KCNT1 nel dominio del poro; tra i farmaci più promettenti sono emersi: l'**antrafenina** (un antinfiammatorio non steroideo, FANS), il **nelfinavir mesilato** (un antiretrovirale utilizzato per il trattamento dell'HIV-1), l'**atorvastatina** (una statina utilizzata per il trattamento dell'ipercolesterolemia e per la prevenzione cardiovascolare) ed il **regorafenib** (farmaco impiegato come antineoplastico). Tali farmaci sono stati testati *in vitro* sia sui canali KCNT1 wild-type, sia incorporanti alcune varianti GoF ricorrenti, quali G288S, R398Q e R928C, mostrandosi in grado di bloccare le correnti espresse sia dai canali wild-type che mutanti, con maggiore potenza per antrafenina ($IC_{50} \sim 12-30$ nM) e nelfinavir mesilato ($IC_{50} \sim 8-14$ nM) rispetto agli altri farmaci. Tali farmaci, sono stati successivamente testati in un modello di epilessia KCNT1-correlata in *Drosophila melanogaster*, dove sia antrafenina (10 - 50 μ M) che nelfinavir (5- 25 μ M) hanno determinato una significativa diminuzione delle crisi convulsive, con effetti dose-dipendenti; gli altri composti, al contrario, non hanno prodotto miglioramenti significativi *in vivo*. Questo studio conferma che la combinazione di studi *in silico*, esperimenti *in vitro* e in modelli animali possa portare alla scoperta di nuovi possibili trattamenti per le epilessie KCNT1-correlate; tuttavia, sebbene *Drosophila* rappresenti un modello rapido ed economico oltretutto già utilizzato come modello per l'epilessia (*Fischer et al., 2023*), non può riprodurre la complessità del SNC umano. Inoltre, tali farmaci non sono stati testati in pazienti epilettici, per cui non sono note informazioni circa la sicurezza e le concentrazioni necessarie per ottenere efficacia anche nell'uomo.

Per superare i limiti legati agli effetti collaterali mostrati da tutti i farmaci usati nella strategia del *drug repurposing*, si rende necessario sviluppare nuove molecole con un profilo farmacologico più selettivo e sicuro. A tale proposito, la ricerca si sta sempre più orientando verso la progettazione *de novo* di inibitori selettivi per i canali KCNT1 (*Cole et al., 2021*), capaci di interagire in modo più mirato sul canale, superando così la scarsa selettività che caratterizza i composti tradizionali (*Qunies et al., 2023*). In questo contesto, il recente lavoro di *Iraci e coll. (2024)* vede la coniugazione dello screening virtuale *in silico* con la sintesi chimica per identificare nuovi inibitori dei canali KCNT, sfruttando la struttura della chinidina come “modello”, riuscendo ad individuare nuovi inibitori molto più potenti della chinidina: in particolare, uno dei composti (CPK20) mostra elevata selettività, scarsa azione sui canali hERG, buon profilo metabolico e capacità di bloccare anche varianti GoF patologiche di KCNT1, rendendolo un promettente candidato preclinico per epilessie KCNT1-correlate.

Nonostante i progressi effettuati nella progettazione di nuovi composti, il *drug discovery* rimane un processo lungo e complesso, con numerose sfide nella traduzione dei risultati ottenuti *in vitro* in trattamenti clinicamente efficaci e sicuri, soprattutto per pazienti pediatrici con epilessie refrattarie. Oltre alla ricerca di nuovi composti in grado di produrre effetti terapeutici mediante un'azione diretta sui canali KCNT1, ulteriori studi potrebbero individuare nuovi composti in grado di modulare l'attività di tali canali in maniera indiretta, ad esempio mediante la modulazione operata dal PIP₂ (De los Angeles Tejada et al., 2012): infatti, quando tale molecola veniva perfusa in oociti esprimenti tale canale, si osservava un aumento delle correnti KCNT1-mediate, dato poi confermato dalle registrazioni su singolo canale che hanno mostrato un aumento della probabilità di apertura dei canali KCNT1 in presenza di PIP₂. Sembrerebbe, inoltre, che il PIP₂ diminuisca la concentrazione di Na⁺ necessaria ad attivare le correnti KCNT1-mediate (De los Angeles Tejada et al., 2012). In tale lavoro è stato anche comprovato che la sensibilità al PIP₂ è dovuta all'interazione di quest'ultimo con il dominio C-terminale del canale: infatti, in presenza delle varianti KCNT1-R337A o K339A si osservava una riduzione della sensibilità a tale lipide (De los Angeles Tejada et al., 2012). In tale contesto, nel presente lavoro di Ricerca sono stati condotti esperimenti sui canali KCNT1 incorporanti la variante R356W (corrispondente alla suddetta variante R337A), riscontrata in un paziente con DEE, in co-espressione con il recettore M1R utilizzato come modulatore dei livelli di PIP₂ endogeni: quando tale recettore veniva stimolato dall'esposizione all'agonista Oxotremorina-M (Oxo-M), si osservava una riduzione delle correnti espresse dai canali wild-type o mutanti in maniera dose-dipendente, con minore efficacia sui canali mutanti rispetto al wild-type, suggerendo che l'inibizione delle correnti KCNT1-mediate indotta dall'attivazione del recettore M1 sia significativamente compromessa in presenza della variante R356W e confermando quindi il ruolo di tale residuo nella regolazione delle correnti del canale da parte del PIP₂. Tuttavia, tale dato risulta in contrasto con quanto già riportato in altri studi della letteratura sugli effetti prodotti dall'esposizione dei canali KCNT1 all'Oxo-M, che sembra invece comportarsi da attivatore (Santi et al., 2006): è da sottolineare che in tale lavoro le condizioni sperimentali usate risultavano diverse in termini di modello cellulare usato (oociti o HEK-293 nei precedenti studi, CHO nel presente studio), soluzioni utilizzate per gli esperimenti di elettrofisiologia (K-gluconato nella soluzione intracellulare negli studi precedenti, KCl nel presente studio, oltreché piccole variazioni nella concentrazione dei sali nella soluzione extracellulare) e tecnica elettrofisiologica utilizzata (configurazione *perforated-patch* nei precedenti studi, *whole-cell* nel presente studio), così come risulta diversa la variante del canale utilizzata (isoforma A umana nel presente studio, isoforma B di ratto negli studi precedenti). Pertanto, per studiare più in dettaglio tale modulazione, sarà necessario condurre ulteriori esperimenti per verificare se l'inibizione delle correnti KCNT1 da noi osservata in seguito all'esposizione a Oxo-M sia dovuta

direttamente alla deplezione di PIP₂ indotto dalla stimolazione del recettore M1, piuttosto che all'azione di molecole reclutate più a valle, quali la proteina AKAP. Tali ipotesi saranno verificate attraverso altri metodi di modulazione dei livelli di PIP₂, come l'utilizzo di chinasi quali la PIP5K (in grado di aumentare i livelli intracellulari di PIP₂) o fosfatasi quali la DrVSP (in grado di diminuire i livelli intracellulari di PIP₂), oppure con esperimenti di immunoprecipitazione, western blot o elettrofisiologia su cellule co-esprimenti AKAP con i canali KCNT1 WT o mutante.

5.2 KCNB1

I canali KCNB1 (Kv2.1) sono canali del potassio voltaggio-dipendenti ampiamente espressi nel Sistema Nervoso Centrale, in particolare nei neuroni glutamatergici della corteccia e dell'ippocampo (*Trimmer, 2015*), dove svolgono un ruolo chiave nel controllo dell'eccitabilità neuronale e nella propagazione dei potenziali d'azione, contribuendo alla soppressione dell'attività neuronale intrinseca durante stimolazioni ripetitive ad alta frequenza. Tali canali sono anche espressi in altri tessuti, dove svolgono ruoli fisiologici cruciali, ad esempio intervenendo nella morte neuronale programmata e controllano il rilascio di insulina nelle cellule β -pancreatiche (*Roe et al., 1996; Pal et al., 2003*). Come già detto mutazioni in KCNB1 sono associate a DEE. La maggior parte delle varianti identificate in tale canale e funzionalmente caratterizzate mostra effetti di perdita di funzione (LoF), con riduzione della densità di corrente, spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più positivi e/o alterato *trafficking* del canale (*Torkamani et al., 2014; Saitsu et al., 2015; de Kyovel et al., 2017; Calhoun et al., 2017; Kang et al., 2019; Xiong et al., 2022*). Fenotipi più severi sono generalmente legati a mutazioni localizzate nel VSD o nel poro, mentre varianti tronche nel C-terminale risultano associate a forme più lievi. L'unica variante sinora caratterizzata come GoF (P17T; *Veale et al., 2022*) risulta localizzata all'N-terminale del canale ed è stata identificata in un paziente che non presenta epilessia. Nel presente studio, sono state individuate dieci varianti (L35P, E180G, I204Tfs*38, R306C, R312C, R312H, V349F, W369*, Y380C e I412T) in dodici pazienti affetti da DEE, di cui due localizzate all'N-terminale (L35P e E180G), quattro nel VSD (I204Tfs*38, R306C, R312C e R312H) e le restanti nella regione del poro (V349F, W369*, Y380C e I412T). Questa localizzazione conferma largamente quanto riportato in letteratura per altre varianti, ossia l'occorrenza di fenotipi severi in pazienti portatori di varianti localizzate principalmente nel VSD o nel poro del canale. Inoltre, dagli esperimenti funzionali è emerso che la maggior parte delle varianti mostra effetti LoF con parziale (R312H) o totale (L35P, I204Tfs*38, R306C, R312H, V349F, W369*, Y380C e I412T) perdita di funzionalità del canale nello stato omomeroico. Inoltre, per riprodurre il bilancio genico eterozigote dei pazienti portatori di varianti nei canali KCNB1 e allo scopo di verificare se le varianti LoF inducessero anche effetti di dominanza negativa rispetto al canale WT, i canali mutanti sono stati co-espressi con una stessa quantità di canali WT in una condizione sperimentale che permettesse una riduzione della corrente espressa in maniera lineare rispetto alla diminuzione della quantità di DNA trasfettato. In tale condizione sperimentale, solo tre varianti hanno mostrato effetti di dominanza negativa (R306C, R312H e Y380C); tra queste, solo la variante R312H ha mostrato uno spostamento significativo della voltaggio-dipendenza verso valori più positivi, mostrando valori di $V_{1/2}$ intermedi nella configurazione eteromeroica così come atteso;

inoltre, tale variante ha mostrato un comportamento particolarmente interessante: l'osservazione di una cinetica di attivazione più veloce rispetto al WT nei canali eteromerici rispetto a quanto osservato nei canali mutanti omomerici, suggerendo che le subunità incorporanti tale variante contribuiscano attivamente a rimodulare la dinamica di *gating* del canale. In particolare, è ipotizzabile che la coesistenza di subunità con proprietà di *gating* differenti (WT e incorporanti la variante R312H) possa alterare la coordinazione tra le subunità nel determinare l'apertura del canale favorendo un'attivazione più rapida, ovvero una predominanza della componente FAST e quindi un'accelerazione dell'attivazione rispetto al WT, osservabile esclusivamente in condizioni eteromeriche. Al contrario, per le altre varianti (L35P, I204Tfs*38, R312C, V349F, W369* e I412T), la cui funzionalità viene parzialmente recuperata quando co-espressa con subunità WT, il meccanismo patogenico risulta essere l'aploinsufficienza.

Gli effetti funzionali indotti dalle varianti in studio sembrano correlati alla loro localizzazione all'interno del canale: infatti, la presenza della variante E180G, localizzata nel dominio N-terminale, ha indotto effetti misti con prevalenti effetti GoF, analogamente all'altra variante GoF riportata in letteratura (*Veale et al., 2022*), anche questa localizzata nello stesso dominio. Tuttavia, anche la variante L35P (che mostra invece effetti LoF), caratterizzata in questo studio, è localizzata all'N-terminale, per cui è plausibile ipotizzare che varianti localizzate in tale dominio possano determinare effetti funzionali opposti (LoF o GoF), per la natura multifunzionale di questa regione, coinvolta ad esempio nell'assemblaggio delle subunità in tetrameri funzionali sia con subunità uguali che silenti (KvS: Kv5, Kv6, Kv8 e Kv9), nonché per la regolazione di meccanismi di fosforilazione/defosforilazione (*Bocksteins et al., 2016*): quindi, una mutazione che rafforza l'assemblaggio o stabilizza la conformazione attiva del tetramero potrebbe aumentare la probabilità di apertura del canale, traducendosi in un effetto GoF; al contrario, varianti che compromettano l'assemblaggio corretto o favoriscano la formazione di complessi instabili, potrebbero ridurre l'espressione funzionale in membrana determinando un effetto LoF. Un ulteriore livello di complessità deriva dal fatto che il dominio N-terminale è anche coinvolto nelle interazioni con proteine regolatorie che modulano la localizzazione e lo stato funzionale del canale (*Mohapatra et al., 2008*): pertanto, mutazioni in tale dominio potrebbero alterare tali meccanismi di regolazione post-traduzionale, ad esempio favorendo uno stato ipo- o iperfosforilato del canale, con effetti opposti sul *gating*. Infine, l'N-terminale contribuisce indirettamente all'accoppiamento funzionale tra il VSD e il poro, attraverso reti di interazioni intra-subunità e inter-subunità (*Mohapatra et al., 2008*): pertanto, varianti che irrigidiscano queste interazioni potrebbero stabilizzare lo stato aperto (GoF), mentre mutazioni che ne aumentino la flessibilità o introducano disaccoppiamento potrebbero rendere l'apertura meno efficiente o favorire stati inattivi (LoF). È inoltre da sottolineare che la variante

E180G mostra effetti GoF quando espressa in canali omomerici, mentre quando co-espressa con i canali WT, mostrava caratteristiche funzionali molto diverse: in particolare, la voltaggio-dipendenza dell'attivazione, fortemente spostata a sinistra nei canali omomerici, risultava non distinguibile da quella misurata nei canali WT. Tale risultato potrebbe essere spiegato considerando che tali canali formano dei cluster somato-dendritici in cui gran parte dei canali KCNB1 si trovano nello stato inattivo o chiuso, permettendo di avere una "riserva" di canali pronta ad attivarsi durante depolarizzazioni prolungate o stimolazioni ad alta frequenza, e limitando così un eccessivo *firing* neuronale (Misonou et al., 2004). L'apertura dei canali, quindi, potrebbe indurre una declusterizzazione temporanea che permette ai canali di distribuirsi più uniformemente sulla membrana, evitando che la corrente sia concentrata in pochi microdomini (Misonou et al., 2004). Pertanto, è possibile ipotizzare che varianti GoF tendano ad aumentare la probabilità di apertura dei canali e/o la corrente massima elicitata dai canali KCNB1, causando una maggiore propensione a declusterizzarsi, come osservato in studi sperimentali (Misonou et al., 2004; King et al., 2020). Al contrario, quando tali subunità mutanti sono espresse in configurazione eteromericale, la presenza di subunità WT potrebbe ridurre la probabilità di apertura, mantenendo una maggiore concentrazione di cluster e contrastando quindi l'effetto. È ipotizzabile, inoltre, che in condizioni più fisiologiche, rispetto alle condizioni sperimentali utilizzate, una piccola frazione di canali mutanti all'interno di un cluster possa avere un impatto locale significativo sull'eccitabilità neuronale, generando microdomini ipereccitabili.

Per quanto riguarda gli effetti LoF osservati per le quattro varianti localizzate nel VSD (I204Tfs*38, R306C, R312 e R312H), si può ipotizzare che questo, in analogia a quanto osservato in altri canali, sia legato al fatto che alterazioni aminoacidiche nei segmenti S₁–S₄, particolarmente sui residui di arginina (come si verifica per tre di tali varianti), possano compromettere la stabilità conformazionale del sensore, riducendo l'ampiezza o la coordinazione del movimento dello stesso in risposta a stimoli depolarizzanti. Inoltre, mutazioni nel VSD potrebbero "indebolire" l'accoppiamento elettromeccanico tra il movimento del sensore ed il poro, generando un disaccoppiamento funzionale per cui il canale, pur espresso in membrana, mostrerà una ridotta probabilità di apertura.

Infine, anche le mutazioni in studio, localizzate nel poro, sono state associate ad effetti LoF: questo può essere spiegato considerando il ruolo cruciale di questa regione nella conduzione ionica, ipotizzando che tali mutazioni possano compromettere direttamente la permeazione del potassio o alterare la stabilità del poro riducendo così la densità di corrente misurabile e/o modificandone la cinetica di attivazione. In accordo, studi funzionali in letteratura condotti su altre varianti patogene in KCNB1, localizzate nel poro, sono associate a riduzione della corrente massima, evidenziando

come il mantenimento dell'integrità strutturale di questa regione sia essenziale per la normale funzionalità del canale (Klemic et al., 1998; de Kovel et al., 2017; Xiong et al., 2022).

Considerati gli effetti opposti indotti da specifiche varianti sulla funzionalità dei canali KCNB1, la ricerca farmacologica si è concentrata sull'identificazione di modulatori in grado di ripristinare la normale funzionalità del canale nelle epilessie correlate a varianti patogeniche in KCNB1. Ad oggi, tra i principali modulatori conosciuti vi sono diversi acidi grassi polinsaturi (PUFA), sia della serie omega-6 che omega-3. Tra questi, **l'acido linoleico** (AL), un acido grasso polinsaturo appartenente alla famiglia degli omega-6, ha mostrato effetti funzionalmente distinti sul canale, quali un'accelerazione della cinetica di attivazione in modo dose-dipendente, spostamento verso potenziali più negativi della curva di attivazione e inibizione della corrente in maniera dose-dipendente, ma voltaggio-indipendente, suggerendo un meccanismo di blocco diretto del poro. Questi effetti opposti sono mediati dal legame dell'AL a due siti distinti sul canale, con diversa affinità per la sostanza, mostrando una maggiore affinità per il sito responsabile del blocco della corrente che potrebbe essere determinata dalla natura idrofobica dell'AL, la capacità di inserirsi nel doppio strato lipidico e di accedere più stabilmente a regioni del poro o a tasche lipidiche esposte del canale; inoltre, lo stato conformazionale del canale (aperto o inattivo) potrebbe favorire selettivamente il legame dell'AL al sito di blocco, stabilizzando una conformazione non conduttiva; al contrario, il sito responsabile dell'effetto di attivazione potrebbe presentare un'affinità inferiore (McKay et al., 2001).

Oltre all'AL, tra i PUFA ad azione sui canali KCNB1 rientrano **l'acido arachidonico** (AA), **l'acido docosaesaenoico** (DHA) e **l'acido eicosapentaenoico** (EPA, Elinder & Liin, 2017). Un meccanismo comune a molti PUFA è lo spostamento della voltaggio-dipendenza dell'attivazione verso potenziali più negativi, effetto attribuito all'interazione elettrostatica tra il gruppo carbossilico carico negativamente del PUFA e le cariche positive localizzate nel VSD dei canali Kv. Questo fenomeno è stato descritto per DHA ed EPA su diversi sottotipi di Kv, inclusi Kv1, Kv2 e Kv7, ed è coerente con l'effetto di accelerazione dell'attivazione osservato per l'AL su KCNB1 (Börjesson & Elinder, 2011; Moreno et al., 2012; McKay et al., 2001). La comprensione dettagliata dei meccanismi molecolari di interazione tra modulatori lipidici e KCNB1 è di grande rilevanza farmacologica, poiché consente di identificare regioni del canale suscettibili a modulazione selettiva. Questo approccio potrebbe permettere lo sviluppo razionale di nuove molecole in grado di produrre un effetto "puro" di attivazione delle correnti mediate dai canali KCNB1. Nonostante il potenziale interesse fisiologico e terapeutico dell'AL o di altri PUFA, ad oggi non esistono evidenze di studi *in vivo* che abbiano valutato l'effetto di tali modulatori in pazienti epilettici portatori di varianti in KCNB1. I dati disponibili derivano esclusivamente da studi *in vitro* e non consentono di trarre conclusioni sull'efficacia o sulla sicurezza dell'AL in ambito clinico in questo specifico contesto. Come strategia

alternativa, è emerso un crescente interesse per il farmaco antidiabetico **Metformina** (MET), selezionato come potenziale attivatore delle correnti KCNB1-mediate attraverso un meccanismo indiretto AMPK-dipendente: infatti, l'attivazione di questo enzima promuove la fosforilazione dei canali KCNB1, con un conseguente aumento della loro funzionalità (*Ikematsu et al., 2011*). Tuttavia, analogamente a quanto osservato per i PUFA, le evidenze disponibili sull'azione della Metformina derivano prevalentemente da studi *in vitro* e ad oggi mancano dati clinici o studi *in vivo* che ne supportino l'efficacia e la sicurezza per l'utilizzo di tale farmaco in pazienti epilettici portatori di varianti in KCNB1.

Invece, tra i modulatori ad azione bloccante vi è il **carvedilolo** che, come precedentemente descritto, è un antagonista non selettivo dei recettori α_1 - β -adrenergici utilizzato nel trattamento di diverse patologie cardiovascolari. Tale farmaco si è dimostrato efficace nell'inibire le correnti di KCNB1 in maniera dose-dipendente ($IC_{50} = 5.1 \mu M$) e reversibilmente, attraverso un aumento dell'inattivazione dei canali. È stato inoltre riscontrato che mutazioni dei residui K356 e Y380, che si trovano esternamente al poro, riducono in modo significativo l'azione di blocco del carvedilolo, suggerendo che questi residui costituiscono parte del sito di legame funzionale di tale farmaco (*Kim et al., 2019*) e che verosimilmente mutazioni di tale residuo (come ad esempio la variante Y380C analizzata nel presente studio) possano determinare una perdita di sensibilità del canale al farmaco.

Come precedentemente riportato, la **FLX** è un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina (SSRI) ed è ampiamente utilizzata nel trattamento della depressione. Questo farmaco agisce da inibitore di diversi canali ionici (*Cioclu et al., 2023; Ambrosino et al., 2023; Soldovieri et al., 2024*), tra cui anche i canali KCNB1. L'inibizione di questi canali avviene in maniera concentrazione e voltaggio-dipendente andando ad accelerare l'inattivazione e ritardando il recupero dall'inattivazione (*Wang et al., 2020*). Inoltre, la fluoxetina è in grado di oltrepassare facilmente la barriera ematoencefalica, raggiungendo concentrazioni ~10 volte maggiori nel liquor rispetto al plasma (*Altamura et al., 1994*), rendendo questo farmaco un putativo candidato per il trattamento anche delle epilessie genetiche KCNB1-correlate.

Anche il **CBD** inibisce le correnti espresse dai canali KCNB1 in cellule neuronali, infatti, l'applicazione in acuto di CBD (5–10 μM) inibisce le correnti espresse dai canali KCNB1 del 40–60%, senza modificare le cinetiche di attivazione, suggerendo un effetto prevalente sulla conduttanza del canale. È stato anche dimostrato che tale inibizione avviene in maniera indipendente dai recettori dei cannabinoidi, indicando che il CBD induca un effetto di blocco diretto sul canale (*Sayehmiri et al., 2025*). Ad oggi, non esistono evidenze cliniche sull'uso del CBD in pazienti affetti da epilessie dovute a varianti in KCNB1; tuttavia, considerando i benefici osservati in pazienti con epilessie causate da varianti in altri canali del potassio voltaggio-dipendenti (*Poisson et al., 2020*), il CBD

emerge come una potenziale terapia alternativa per forme di epilessia farmacoresistente dovuta a mutazioni a carico dei canali KCNB1.

Nonostante queste evidenze, va sottolineato che la maggior parte dei dati disponibili proviene da studi *in vitro*, mentre esistono pochissime evidenze cliniche sull'efficacia di tali molecole in pazienti con varianti in KCNB1, indicando la necessità di ulteriori studi per sviluppare approcci terapeutici mirati e sicuri. In particolare, come precedentemente detto, quasi la totalità delle varianti in KCNB1 finora caratterizzate funzionalmente e riportate in letteratura risulta indurre effetti LoF, per cui si evidenzia in particolare la necessità di individuare nuovi modulatori capaci di attivare le correnti di questi canali. Tra i modulatori descritti dei canali KCNB1, sono stati testati tre modulatori allo scopo di revertire i diversi effetti funzionali osservati per le varianti oggetto del presente studio: in particolare, Fluoxetina e Cannabidiolo sono stati testati per inibire le correnti espresse dalla variante GoF, mentre la metformina è stata scelta per revertire gli effetti delle varianti LoF. Dai nostri studi è emerso che la fluoxetina è in grado di bloccare le correnti espresse dai canali omomerici WT o incorporanti la variante E180G in maniera simile (>90 %); il CBD ha mostrato un'inibizione maggiore del 90% sulle correnti espresse dai canali WT, ma una minore efficacia nel bloccare le correnti espresse dai canali mutanti. Entrambi i farmaci sono stati testati anche sui canali eteromerici incorporanti la variante E180G: in tali condizioni, la fluoxetina ha mostrato una maggiore capacità di inibizione sul canale eteromerico KCNB1WT+E180G rispetto al canale WT omomerico, mentre il CBD ha mostrato un blocco efficace anche sui canali mutanti in configurazione eteromerica, mostrando, come per l'omomero, un minor effetto di blocco sui canali eteromerici incorporanti la variante E180G, confermando che la mutazione di tale residuo rende il canale meno sensibile al farmaco. Tali differenze suggeriscono che il residuo E180 potrebbe essere coinvolto nel sito di legame di tali farmaci, rendendo l'inibizione più o meno efficace: tuttavia, la notevole efficacia osservata per entrambi i farmaci, li rende comunque entrambi delle razionali scelte terapeutiche in pazienti affetti da DEE e portatori di tale variante.

In parallelo, quando MET (10 μ M) è stata testata sui canali KCNB1 WT o R312H, è stato osservato un significativo potenziamento delle correnti, maggiore sul mutante rispetto al controllo (~38% o ~17%, rispettivamente). Tale effetto modesto potrebbe essere correlato a diversi fattori: ad esempio, il meccanismo non è in grado di potenziare fortemente tali correnti, oppure l'enzima potrebbe essere scarsamente presente nelle cellule utilizzate e per tali ragioni il farmaco non è stato ulteriormente testato sulle altre varianti LoF descritte nel presente studio. Sarebbe utile testare l'effetto del farmaco in entrambe le configurazioni anche a concentrazioni più elevate, anche se è da tenere conto che diversi pazienti affetti da DEE seguono a supporto della terapia farmacologica una dieta chetogenica (Borowicz-Reutt *et al.*, 2024), per cui l'assunzione concomitante di un antidiabetico potrebbe causare

crisi ipoglicemiche. Una possibile alternativa che potrebbe essere testata in futuro è rappresentata dalla Berberina, un alcaloide naturale comunemente utilizzato per il controllo della glicemia, che ha mostrato effetti anticonvulsivanti e neuroprotettivi (*Gao et al., 2014; Sedaghat et al., 2017*): la sua azione sui canali KCNB1 potrebbe essere espletata attraverso meccanismi simili a quelli della metformina, poiché tale farmaco è un noto attivatore dell'AMPK (*Yin et al., 2012*).

5.3 Conclusioni

Le DEE di origine genetica rappresentano una forma di epilessia grave caratterizzata da esordio precoce, numerose crisi epilettiche, ritardi intellettivi e motori e presentano spesso farmacoresistenza verso i tradizionali farmaci antiepilettici. Da qui, nasce l'urgenza medica di individuare nuovi possibili trattamenti per questi pazienti. Da questo progetto di ricerca emerge che l'antidepressivo Fluoxetina possa rappresentare un trattamento promettente per pazienti affetti da DEE farmacoresistenti, portatori delle varianti genetiche caratterizzate, dovute a mutazioni GoF nei canali KCNT1 o KCNB1. I dati ottenuti indicano che la Fluoxetina è in grado di modulare efficacemente l'attività dei canali; tuttavia, appare evidente la non selettività del farmaco, che agisce su diversi canali del potassio, sottolineando la necessità di *studi in silico* per identificare i siti di legame specifici e i meccanismi molecolari alla base della sua attività di modulazione. Inoltre, queste informazioni potrebbero consentire lo sviluppo di molecole derivate dalla Fluoxetina, mantenendo l'efficacia terapeutica, ma migliorandone la specificità.

Parallelamente, il cannabidiolo ha mostrato un potenziale simile come modulatore dei canali KCNB1, con capacità di inibire le correnti espresse sia dai canali wild-type sia incorporanti la variante GoF E180G. Dai dati raccolti, emerge che il residuo E180 potrebbe essere coinvolto nel legame del CBD al canale, rendendo il mutante meno sensibile al farmaco, aprendo la strada a studi *in vitro* più mirati per valutare effetti mutazione-specifici del CBD e ottimizzare il trattamento in relazione al genotipo del paziente.

Il punto di forza principale di questo studio risiede nell'approccio integrato e traslazionale adottato: infatti, partendo dalla caratterizzazione funzionale di varianti identificate in pazienti, è stato possibile selezionare modulatori farmacologici tra farmaci già in uso clinico (*drug repurposing*) con un razionale genetico e funzionale. Questo approccio consente di ridurre significativamente i tempi e i costi rispetto allo sviluppo di nuovi farmaci, rappresentando una strategia particolarmente efficace per patologie rare, severe e farmacoresistenti come le DEE. Inoltre, l'integrazione di dati clinici, genetici e funzionali conferisce al lavoro un'importante valenza di medicina personalizzata, orientando la scelta terapeutica sulla base dell'assetto genico e dell'effetto funzionale della variante in ciascun paziente.

L'innovazione scientifica del lavoro risiede anche nell'identificazione di possibili correlazioni tra mutazioni specifiche e risposta farmacologica, evidenziando come differenze strutturali anche minime, come la variante E180G, possano influenzare la sensibilità ai farmaci. Questo apre la strada a futuri studi mirati su farmaci mutazione-specifici, con l'obiettivo di sviluppare terapie più efficaci e selettive. Tuttavia, se per i canali KCNT1 le varianti fino ad ora caratterizzate sono risultate essere

quasi tutte GoF, per KCNB1 le varianti GoF risultano molto rare, per cui la necessità è quella di individuare principalmente degli attivatori di tali canali che risultino efficaci nel revertire gli effetti delle varianti LoF.

In conclusione, questo studio conferma che approcci traslazionali e personalizzati possono rappresentare un importante progresso nella gestione delle DEE genetiche: selezionare modulatori farmacologici in base al genotipo e all'alterazione funzionale dei canali offre, non solo un potenziale miglioramento della riduzione delle crisi epilettiche, ma anche un impatto diretto sulla qualità della vita dei pazienti e delle loro famiglie. La combinazione di caratterizzazione funzionale delle varianti, riproposta di farmaci clinicamente approvati e approccio di medicina personalizzata costituisce, pertanto, un contributo innovativo ed efficace per la ricerca sulle epilessie farmacoresistenti.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 Libri di testo

1. Clementi F, Fumagalli G. Farmacologia generale e molecolare. Edra IV edizione.
2. Katzung BG, Trevor AJ. Farmacologia generale e clinica. Piccin, X edizione.
3. Silverthorn DU. Fisiologia umana. Pearson VI edizione a cura di Sacchi AF.
4. Stahl, S.M. (2013), *Stahl's Essential Psychopharmacology*. Cambridge University Press.

6.2 Referenze

1. Abdelnour E, Gallentine W, McDonald M, Sachdev M, Jiang YH, Mikati MA (2018). Does age affect response to quinidine in patients with KCNT1 mutations? Report of three new cases and review of the literature. *Seizure* 55:1-3. doi: 10.1016/j.seizure.2017.11.017.
2. Ali SR, Malone TJ, Zhang Y, Prechova M, Kaczmarek LK (2020). Phactr1 regulates Slack (KCNT1) channels via protein phosphatase 1 (PP1). *FASEB J* 34 (1):1591-1601. doi: 10.1096/fj.201902366R.
3. Allen PB, Greenfield AT, Svenningsson P, Haspeslagh DC, Greengard P (2004). Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (18):7187-92. doi: 10.1073/pnas.0401673101.
4. Altamura AC, Moro AR, Percudani M (1994). Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin Pharmacokinet* 26 (3):201-14. doi: 10.2165/00003088-199426030-00004.
5. Ambrosino P, Ragona F, Mosca I, Vannicola C, Canafoglia L, Solazzi R, Rivolta I, Freri E, Granata T, Messina G, Castellotti B, Gellera C, Soldovieri MV, DiFrancesco JC, Taglialetela M (2023). A novel KCNC1 gain-of-function variant causing developmental and epileptic encephalopathy: "Precision medicine" approach with fluoxetine. *Epilepsia* 64 (7): e148-e155. doi: 10.1111/epi.17656.
6. Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R (2007). Serotonin and epilepsy. *J Neurochem* 100 (4):857-73. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04277. x.
7. Bailey CS, Moldenhauer HJ, Park SM, Keros S, Meredith AL (2019). *KCNMA1*-linked channelopathy. *J Gen Physiol*; 151(10):1173-1189. doi: 10.1085/jgp.201912457.
8. Bar C, Barcia G, Jennesson M, Le Guyader G, Schneider A, Mignot C, Lesca G, Breuillard D, Montomoli M, Keren B, Doummar D, Billette de Villemeur T, Afenjar A, Marey I, Gerard M, Isnard H, Poisson A, Dupont S, Berquin P, Meyer P, Genevieve D, De Saint Martin A, El Chehadeh S, Chelly J, Guët A, Scalais E, Dorison N, Myers CT, Mefford HC, Howell KB, Marini C, Freeman JL, Nica A, Terrone G, Sekhara T, Lebre AS, Odent S, Sadleir LG, Munnich A, Guerrini R, Scheffer IE, Kabashi E, Nabbout R (2020). Expanding the genetic and phenotypic relevance of KCNB1 variants in developmental and epileptic encephalopathies: 27 new patients and overview of the literature. *Hum Mutat* 41 (1):69-80. doi: 10.1002/humu.23915.
9. Bar C, Kuchenbuch M, Barcia G, Schneider A, Jennesson M, Le Guyader G, Lesca G, Mignot C, Montomoli M, Parrini E, Isnard H, Rolland A, Keren B, Afenjar A, Dorison N, Sadleir LG, Breuillard D, Levy R, Rio M, Dupont S, Negrin S, Danieli A, Scalais E, De Saint Martin A, El Chehadeh S, Chelly J, Poisson A, Lebre AS, Nica A, Odent S, Sekhara T, Brankovic V, Goldenberg A, Vrielynck P, Lederer D, Maurey H, Terrone G, Besmond C, Hubert L, Berquin P, Billette de Villemeur T, Isidor B, Freeman JL, Mefford HC, Myers CT, Howell KB, Rodríguez-Sacristán Cascajo A, Meyer P, Genevieve D, Guët A,

- Doummar D, Durigneux J, van Dooren MF, de Wit MCY, Gerard M, Marey I, Munnich A, Guerrini R, Scheffer IE, Kabashi E, Nabbout R (2020). Developmental and epilepsy spectrum of KCNB1 encephalopathy with long-term outcome. *Epilepsia* **61** (11):2461-2473. doi: 10.1111/epi.16679.
10. Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula VR, Brown MR, Langouet M, Chen H, Kronengold J, Abhyankar A, Cilio R, Nitschke P, Kaminska A, Boddaert N, Casanova JL, Desguerre I, Munnich A, Dulac O, Kaczmarek LK, Colleaux L, Nabbout R (2012). De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet* **44** (11):1255-9. doi: 10.1038/ng.2441.
 11. Bhattacharjee A, Joiner WJ, Wu M, Yang Y, Sigworth FJ, Kaczmarek LK (2003). Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J Neurosci* **23** (37):11681-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-37-11681.2003.
 12. Bearden D, Strong A, Ehnot J, DiGiovine M, Dlugos D, Goldberg EM (2014). Targeted treatment of migrating partial seizures of infancy with quinidine. *Ann Neurol* **76** (3):457-61. doi: 10.1002/ana.24229.
 13. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé 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** (4):676-85. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.
 14. Bernard S, Chang M.D., and Daniel H. Lowenstein, M.D. (2003). Mechanisms of disease Epilepsy. *N Engl J Med* 349:1257-66.
 15. Bernard G, Shevell MI (2008). Channelopathies: a review. *Pediatr Neurol* **38** (2):73-85. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.09.007.
 16. Bialer M, White HS (2010). Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov* **9** (1):68-82. doi: 10.1038/nrd2997.
 17. Biton B, Sethuramanujam S, Picchione KE, Bhattacharjee A, Khessibi N, Chesney F, Lanneau C, Curet O, Avenet P. (2012). The antipsychotic drug loxapine is an opener of the sodium-activated potassium channel slack (Slo2.2). *J Pharmacol Exp Ther* **340** (3):706-15. doi: 10.1124/jpet.111.184622. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22171093.
 18. Bocksteins E (2016). Kv5, Kv6, Kv8, and Kv9 subunits: No simple silent bystanders. *J Gen Physiol* **147** (2):105-25. doi: 10.1085/jgp.201511507.
 19. Bonardi CM, Heyne HO, Fiannacca M, Fitzgerald MP, Gardella E, Gunning B, Olofsson K, Lesca G, Verbeek N, Stamberger H, Striano P, Zara F, Mancardi MM, Nava C, Syrbe S, Buono S, Baulac S, Coppola A, Weckhuysen S, Schoonjans AS, Ceulemans B, Sarret C, Baumgartner T, Muhle H, Portes VD, Toulouse J, Nougues MC, Rossi M, Demarquay G, Ville D, Hirsch E, Maurey H, Willems M, de Bellescize J, Altuzarra CD, Villeneuve N, Bartolomei F, Picard F, Hornemann F, Koolen DA, Kroes HY, Reale C, Fenger CD, Tan WH, Dibbens L, Bearden DR, Möller RS, Rubboli G (2021). KCNT1-related epilepsies and epileptic encephalopathies: phenotypic and mutational spectrum. *Brain* **144** (12):3635-3650. doi: 10.1093/brain/awab219.
 20. Börjesson SI, Elinder F. (2011). An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition. *J Gen Physiol* **137**(6):563-77. doi: 10.1085/jgp.201110599.
 21. Borowicz-Reutt K, Krawczyk M, Czernia J. (2024). Ketogenic Diet in the Treatment of Epilepsy. *Nutrients* **16** (9):1258. doi: 10.3390/nu16091258.
 22. Brown MR, Kronengold J, Gazula VR, Chen Y, Strumbos JG, Sigworth FJ, Navaratnam D, Kaczmarek LK (2010). Fragile X mental retardation protein controls gating of the

- sodium-activated potassium channel Slack. *Nat Neurosci* **1** 3(7):819-21. doi: 10.1038/nn.2563.
23. Brown MR, Kronengold J, Gazula VR, Spilianakis CG, Flavell RA, von Hehn CAA, Bhattacharjee A, and Kaczmarek LK (2008). Aminoterminal isoforms of the Slack K⁺ channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation. *J. Physiol* **586**, 5161-5179.
 24. Calhoun JD, Vanoye CG, Kok F, George AL Jr, Kearney JA (2017). Characterization of a *KCNB1* variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. *Neurol Genet* **3** (6): e198. doi: 10.1212/NXG.0000000000000198.
 25. Chen H, Kronengold J, Yan Y, Gazula VR, Brown MR, Ma L, Ferreira G, Yang Y, Bhattacharjee A, Sigworth FJ, Salkoff L, Kaczmarek LK (2009). The N-terminal domain of Slack determines the formation and trafficking of Slick/Slack heteromeric sodium-activated potassium channels. *J Neurosci* **29** (17):5654-65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5978-08.2009.
 26. Cheng N, Ren S, Yang JF, Liu XM, Li XT (2019). Carvedilol blockage of delayed rectifier Kv2.1 channels and its molecular basis. *Eur J Pharmacol* (855):50-55. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.05.006.
 27. Cioclu MC, Mosca I, Ambrosino P, Puzo D, Bayat A, Wortmann SB, Koch J, Strehlow V, Shirai K, Matsumoto N, Sanders SJ, Michaud V, Legendre M, Riva A, Striano P, Muhle H, Pendziwiat M, Lesca G, Mangano GD, Nardello R; KCNT2-study group; Lemke JR, Möller RS, Soldovieri MV, Rubboli G, Tagliatela M (2023). KCNT2-Related Disorders: Phenotypes, Functional, and Pharmacological Properties. *Ann Neurol* **94** (2):332-349. doi: 10.1002/ana.26662.
 28. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* **68**:1327-32.
 29. Cole BA, Clapcote SJ, Muench SP, Lippiat JD (2021). Targeting K_{Na}1.1 channels in KCNT1-associated epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* **42** (8):700-713. doi: 10.1016/j.tips.2021.05.003.
 30. Cooper EC. Potassium Channels (including KCNQ) and Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Figure 1, Structural features and evolutionary relationships among major groups of K⁺, Na⁺, and Ca²⁺ channels.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98164/figure/cooper.fl/>
 31. Coppola G, Plouin P, Chiron C, Robain O, Dulac O (1995). Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest. *Epilepsia* **36** (10):1017-24. doi: 10.1111/j.1528-1157.1995.tb00961.
 32. Dai S, Hall DD, Hell JW (2009). Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* **89** (2):411-52. doi: 10.1152/physrev.00029.2007.
 33. Dai L, Garg V, Sanguinetti MC (2010). Activation of Slo2.1 channels by niflumic acid. *J Gen Physiol* **135** (3):275-95. doi: 10.1085/jgp.200910316.
 34. de los Angeles Tejada M, Jensen LJ, Klaerke DA (2012). PIP₂ modulation of Slick and Slack K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* **424** (2):208-13. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.038.
 35. de Los Angeles Tejada M, Stolpe K, Meinild AK, Klaerke DA (2012). Clofilium inhibits Slick and Slack potassium channels. *Biologics* **6**:465-70. doi: 10.2147/BTT.S33827.

36. Delgado-Ramírez M, De Jesús-Pérez JJ, Aréchiga-Figueroa IA, Arreola J, Adney SK, Villalba-Galea CA, Logothetis DE, Rodríguez-Menchaca AA (2018). Regulation of Kv2.1 channel inactivation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Scientific Reports* **8** (1):1769. doi:10.1038/s41598-018-20280-w.
37. 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):275-6. doi: 10.1038/81566.
38. de Kovel CGF, Syrbe S, Brilstra EH, Verbeek N, Kerr B, Dubbs H, Bayat A, Desai S, Naidu S, Srivastava S, Cagaylan H, Yis U, Saunders C, Rook M, Plugge S, Muhle H, Afawi Z, Klein KM, Jayaraman V, Rajagopalan R, Goldberg E, Marsh E, Kessler S, Bergqvist C, Conlin LK, Krok BL, Thiffault I, Pendziwiat M, Helbig I, Polster T, Borggraefe I, Lemke JR, van den Boogaardt MJ, Møller RS, Koeleman BPC (2017). Neurodevelopmental Disorders Caused by De Novo Variants in KCNB1 Genotypes and Phenotypes. *JAMA Neurol* **74** (10):1228-1236. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.1714.
39. Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, Katz R, Di Marzo V, Jutras-Aswad D, Notcutt WG, Martinez-Orgado J, Robson PJ, Rohrback BG, Thiele E, Whalley B, Friedman D (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* **55** (6):791-802. doi: 10.1111/epi.12631.
40. Devinsky O, Cross JH, Laux L, Marsh E, Miller I, Nabbout R, Scheffer IE, Thiele EA, Wright S (2017). Cannabidiol in Dravet Syndrome Study Group. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N Engl J Med* **376** (21):2011-2020. doi: 10.1056/NEJMoa1611618.
41. Di C, Wu T, Gao K, Li N, Song H, Wang L, Sun H, Yi J, Zhang X, Chen J, Shah M, Jiang Y, Huang Z (2025). Carvedilol inhibits neuronal hyperexcitability caused by epilepsy-associated KCNT1 mutations. *Br J Pharmacol* **182** (1):162-180. doi: 10.1111/bph.17360.
42. Di Matteo F, Mancuso F, Turcio R, Ciaglia T, Stagno C, Di Chio C, Campiglia P, Bertamino A, Giofrè SV, Ostacolo C, Iraci N (2024). KCNT1 Channel Blockers: A Medicinal Chemistry Perspective. *Molecules* **29** (12):2940. doi: 10.3390/molecules29122940.
43. 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):733-8. doi: 10.1038/ng1585. Epub 2005 Jun 5. PMID: 15937479.
44. Duan YZ, Yao TT, Shao YT, Liu LM, Zhou H, Cheng Y (2025). KCNT1 gene variant-associated epilepsy: genetic insights, functional mechanisms, and emerging therapies. *J Neurol* **272** (7):472. doi: 10.1007/s00415-025-13207-9.
45. Elinder F, Liin SI (2017). Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front Physiol* **43**:6-8. doi: 10.3389/fphys.2017.00043.
46. Fernández-Mariño AI, Tan XF, Bae C, Huffer K, Jiang J, Swartz KJ (2023). Inactivation of the Kv2.1 channel through electromechanical coupling. *Nature* **622** (7982):410-417. doi: 10.1038/s41586-023-06582-8.
47. Fischer FP, Karge RA, Weber YG, Koch H, Wolking S, Voigt A (2023). *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism to study genetic epilepsies: An overview. *Front Mol Neurosci* **16**:1116000. doi: 10.3389/fnmol.2023.1116000.

48. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55** (4):475-82. doi: 10.1111/epi.12550.
49. Fleming MR, Brown MR, Kronengold J, Zhang Y, Jenkins DP, Barcia G, Nabbout R, Bausch AE, Ruth P, Lukowski R, Navaratnam DS, Kaczmarek LK (2016). Stimulation of Slack K(+) Channels Alters Mass at the Plasma Membrane by Triggering Dissociation of a Phosphatase-Regulatory Complex. *Cell Rep* **16** (9):2281-8. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.024.
50. Fukai R, Saitsu H, Tsurusaki Y, Sakai Y, Haginoya K, Takahashi K, Hubshman MW, Okamoto N, Nakashima M, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N (2016). De novo KCNH1 mutations in four patients with syndromic developmental delay, hypotonia and seizures. *J Hum Genet* **61** (5):381-7. doi: 10.1038/jhg.2016.1.
51. Gaita F, Giustetto C, Bianchi F (2001). Bepridil-induced QT prolongation and torsade de pointes: a clinical study. *J Am Coll Cardiol* **37** (4):1097-1102. doi:10.1016/S0735-1097(01)01111-1.
52. Gao F, Gao Y, Liu YF, Wang L, Li YJ (2014). Berberine exerts an anticonvulsant effect and ameliorates memory impairment and oxidative stress in a pilocarpine-induced epilepsy model in the rat. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10:2139-45. doi: 10.2147/NDT.S73210.
53. Gertler TS, Cherian S, DeKeyser JM, Kearney JA, George AL Jr (2022). K_{Na}1.1 gain-of-function preferentially dampens excitability of murine parvalbumin-positive interneurons. *Neurobiol Dis* 168:105713. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105713.
54. Gill A, Flaim SF, Damiano BP, Sit SP, Brannan MD (1992). Pharmacology of bepridil. *Am J Cardiol* **69** (11):11D-16D. doi: 10.1016/0002-9149(92)90953-v.
55. Gobbi G, Sarajlija J, Leonardi S, Di Pietro E, Zara F, & Striano P (2014). La genetica delle epilessie e le epilessie genetiche. *Neurologia Pediatrica* **44** (176), 226–239.
56. Goldin AL (1993). Accessory subunits and sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* **3** (3):272-7. doi: 10.1016/0959-4388(93)90117-h.
57. Gong P, Jiao X, Yu D, Yang Z (2021). Case Report: Causative *De novo* Variants of *KCNT2* for Developmental and Epileptic Encephalopathy. *Front Genet* 12:649556. doi: 10.3389/fgene.2021.649556.
58. Gras M, Bearden D, West J, Nabbout R (2024). Efficacy of anti-seizure medications and alternative therapies (ketogenic diet, CBD, and quinidine) in KCNT1-related epilepsy: A systematic review. *Epilepsia Open* **9** (4):1176-1191. doi: 10.1002/epi4.12975.
59. Grider MH, Jessu R, Kabir R (2023). Physiology, Action Potential. [Updated 2023 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. [Figure, A neuronal action potential. The...] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538143/figure/article-17127.image.fl/>
60. Guichard M, Thomine S, Frachisse JM (2022). Mechanotransduction in the spotlight of mechano-sensitive channels. *Curr Opin Plant Biol* 68:102252. doi: 10.1016/j.pbi.2022.102252.
61. Hernandez EJ, Williams PA, Dudek FE (2002). Effects of fluoxetine and TFMPP on spontaneous seizures in rats with pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsia* **43** (11):1337–45.
62. Heron SE, Smith KR, Bahlo M, Nobili L, Kahana E, Licchetta L, Oliver KL, Mazarib A, Afawi Z, Korczyn A, Plazzi G, Petrou S, Berkovic SF, Scheffer IE, Dibbens LM (2012).

- Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* **44** (11):1188-90. doi: 10.1038/ng.2440.
63. Hussain R, Lim CX, Shaukat Z, Islam A, Caseley EA, Lippiat JD, Rychkov GY, Ricos MG, Dibbens LM (2024). Drosophila expressing mutant human KCNT1 transgenes make an effective tool for targeted drug screening in a whole animal model of KCNT1-epilepsy. *Sci Rep* **14** (1):3357. doi: 10.1038/s41598-024-53588-x.
 64. Ikematsu N, Dallas ML, Ross FA, Lewis RW, Rafferty JN, David JA, Suman R, Peers C, Hardie DG, Evans AM (2011). Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (44):18132-7. doi: 10.1073/pnas.1106201108
 65. Iraci N, Carotenuto L, Ciaglia T, Belperio G, Di Matteo F, Mosca I, Carleo G, Giovanna Basilicata M, Ambrosino P, Turcio R, Puzo D, Pepe G, Gomez-Monterrey I, Soldovieri MV, Di Sarno V, Campiglia P, Miceli F, Bertamino A, Ostacolo C, Tagliatela M (2024). *In Silico* Assisted Identification, Synthesis, and *In Vitro* Pharmacological Characterization of Potent and Selective Blockers of the Epilepsy-Associated KCNT1 Channel. *J Med Chem* **67** (11):9124-9149. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c00268.
 66. Jan LY, & Jan YN (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *The Journal of Physiology* **590** (11), 2591–2599.
 67. Jędrychowska J, Korzh V (2019). Kv2.1 voltage-gated potassium channels in developmental perspective. *Dev Dyn* **248** (12):1180-1194. doi: 10.1002/dvdy.114.
 68. Ju M, Stevens L, Leadbitter E, Wray D (2003). The Roles of N- and C-terminal determinants in the activation of the Kv2.1 potassium channel. *J Biol Chem* **278** (15):12769-78. doi: 10.1074/jbc.M212973200.
 69. Kang SK, Vanoye CG, Misra SN, Echevarria DM, Calhoun JD, O'Connor JB, Fabre KL, McKnight D, Demmer L, Goldenberg P, Grote LE, Thiffault I, Saunders C, Strauss KA, Torkamani A, van der Smagt J, van Gassen K, Carson RP, Diaz J, Leon E, Jacher JE, Hannibal MC, Litwin J, Friedman NR, Schreiber A, Lynch B, Poduri A, Marsh ED, Goldberg EM, Millichap JJ, George AL Jr, Kearney JA (2019). Spectrum of Kv 2.1 Dysfunction in KCNB1-Associated Neurodevelopmental Disorders. *Ann Neurol* **86** (6):899-912. doi: 10.1002/ana.25607.
 70. Kass RS (2005). The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Invest* **115** (8):1986-9. doi: 10.1172/JCI26011.
 71. Kim JB (2014). Channelopathies. *Korean J Pediatr* **57** (1):1-18. doi: 10.3345/kjp.2014.57.1.1.
 72. Kim DM, Nimigeon CM (2016). Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8** (5):a029231. doi: 10.1101/cshperspect.a029231.
 73. Klemic KG, Shieh CC, Kirsch GE, Jones SW (1998). Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophys J* **74** (4):1779-89. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77888-9.
 74. Kortüm F, Caputo V, Bauer CK, Stella L, Ciolfi A, Alawi M, Bocchinfuso G, Flex E, Paolacci S, Dentici ML, Grammatico P, Korenke GC, Leuzzi V, Mowat D, Nair LD, Nguyen TT, Thierry P, White SM, Dallapiccola B, Pizzuti A, Campeau PM, Tartaglia M, Kutsche K (2015). Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet* **47** (6):661-7. doi: 10.1038/ng.3282.

75. Kusuvara H, Suzuki H, Terasaki T, Kakee A, Lemaire M, Sugiyama Y (1997). P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **283** (2):574-80.
76. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J (2010). Definition of drug-resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* **51** (6):1069-77. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02397.
77. Lim ST, Antonucci DE, Scannevin RH, Trimmer JS (2000). A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K⁺ channel in hippocampal neurons. *Neuron* **25** (2):385-97. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80902-2.
78. Löscher W, Schmidt D (2011). Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* **52** (4):657-78. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03024.
79. Löscher W, Potschka H, Sisodiya SM, Vezzani A (2020). Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacol Rev* **72** (3):606-638. doi: 10.1124/pr.120.019539.
80. MacDonald PE, Wheeler MB (2003). Voltage-dependent K⁽⁺⁾ channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* **46** (8):1046-62. doi: 10.1007/s00125-003-1159-8.
81. Malone TJ, Wu J, Zhang Y, Licznarski P, Chen R, Nahyan S, Pedram M, Jonas EA, Kaczmarek LK (2024). Neuronal potassium channel activity triggers initiation of mRNA translation through binding of translation regulators. *bioRxiv* 7:2024.02.07.579306. doi: 10.1101/2024.02.07.579306.
82. Marini C, Romoli M, Parrini E, Costa C, Mei D, Mari F, Parmeggiani L, Procopio E, Metitieri T, Cellini E, Virdò S, De Vita D, Gentile M, Prontera P, Calabresi P, Guerrini R (2017). Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo *KCNB1* gene mutations. *Neurol Genet* **3** (6): e206. doi: 10.1212/NXG.0000000000000206.
83. Martin HC, Kim GE, Pagnamenta AT, Murakami Y, Carvill GL, Meyer E, Copley RR, Rimmer A, Barcia G, Fleming MR, Kronengold J, Brown MR, Hudspeth KA, Broxholme J, Kanapin A, Cazier J-B, Kinoshita T, Nabbout R, The WGS500 Consortium, Bentley D, McVean G, Heavin S, Zaiwalla Z, McShane T, Mefford HC, Shears D, Stewart H, Kurian MA, Scheffer IE, Blair E, Donnelly P, Kaczmarek LK, Taylor JC (2014). Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Hum Mol Genet* **23**:3200–11.
84. McLennan Y, Polussa J, Tassone F, Hagerman R (2011). Fragile x syndrome. *Curr Genomics* **12** (3):216-24. doi: 10.2174/138920211795677886.
85. McKay MC, Worley JF 3rd (2001). Linoleic acid both enhances activation and blocks Kv1.5 and Kv2.1 channels by two separate mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* **281** (4):C1277-84. doi: 10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1277.
86. Melis R, Stauffer D, Zhao X, Zhu XL, Albrecht B, Pongs O, Brothman A, Leppert M (1995). Physical and genetic localization of a Shab subfamily potassium channel (*KCNB1*) gene to chromosomal region 20q13.2. *Genomics* **25** (1):285-7. doi: 10.1016/0888-7543(95)80138-c.
87. Mikati MA, Jiang Y, Carboni M, Shashi V, Petrovski S, Spillmann R, Milligan CJ, Li M, Grefe A, McConkie A, Berkovic S, Scheffer I, Mullen S, Bonner M, Petrou S, Goldstein D (2015). Quinidine in the Treatment of KCNT1-Positive Epilepsies. *Ann Neurol* **78**:995–9.

88. Misonou, H., Mohapatra, D. P., Park, E. W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., ... Trimmer, J. S. (2004). Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nature Neuroscience* **7** (7), 711–718. doi:10.1038/nn1260
89. Misonou H, Mohapatra DP, Trimmer JS (2005). Kv2.1: a voltage-gated k⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology* **26** (5):743-52. doi: 10.1016/j.neuro.2005.02.003.
90. Møller RS, Heron SE, Larsen LH, Lim CX, Ricos MG, Bayly MA, van Kempen MJ, Klinkenberg S, Andrews I, Kelley K, Ronen GM, Callen D, McMahon JM, Yendle SC, Carvill GL, Mefford HC, Nabbout R, Poduri A, Striano P, Baglietto MG, Zara F, Smith NJ, Pridmore C, Gardella E, Nikanorova M, Dahl HA, Gellert P, Scheffer IE, Gunning B, Kragh-Olsen B, Dibbens LM (2015). Mutations in KCNT1 cause a spectrum of focal epilepsies. *Epilepsia* **56** (9): e114-20. doi: 10.1111/epi.13071.
91. Mohapatra DP, Siino DF, Trimmer JS (2008). Interdomain cytoplasmic interactions govern the intracellular trafficking, gating, and modulation of the Kv2.1 channel. *J Neurosci* **28** (19):4982-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0186-08.2008.
92. Moreno C, Macias A, Prieto A, De La Cruz A, Valenzuela C (2012). Polyunsaturated Fatty acids modify the gating of kv channels. *Front Pharmacol* **3**:163. doi: 10.3389/fphar.2012.00163.
93. Muona M, Berkovic SF, Dibbens LM, Oliver KL, Maljevic S, Bayly MA, Joensuu T, Canafoglia L, Franceschetti S, Michelucci R, Markkinen S, Heron SE, Hildebrand MS, Andermann E, Andermann F, Gambardella A, Tinuper P, Licchetta L, Scheffer IE, Criscuolo C, Filla A, Ferlazzo E, Ahmad J, Ahmad A, Baykan B, Said E, Topcu M, Riguzzi P, King MD, Ozkara C, Andrade DM, Engelsens BA, Crespel A, Lindenau M, Lohmann E, Saletti V, Massano J, Privitera M, Espay AJ, Kauffmann B, Duchowny M, Møller RS, Straussberg R, Afawi Z, Ben-Zeev B, Samocha KE, Daly MJ, Petrou S, Lerche H, Palotie A, Lehesjoki AE (2015). A recurrent de novo mutation in KCNC1 causes progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet.* **47** (1):39-46. doi: 10.1038/ng.3144.
94. Nicholson DA, Leach JP, Cross JH, Nash KB, et al (2018). Early treatment with quinidine in two patients with epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS) due to gain-of-function KCNT1 mutations: functional studies, clinical responses and critical issues for personalized therapy. *Neurotherapeutics* **15** (3):860–873. doi: 10.1007/s13311-018-0632-9.
95. Niday Z, Tzingounis AV (2018). Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. *Neuroscientist* **24** (4):368-380. doi: 10.1177/1073858418763752.
96. O'Connell KM, Loftus R, Tamkun MM (2010). Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (27):12351-6. doi: 10.1073/pnas.1003028107.
97. O'Connell KM, Rolig AS, Whitesell JD, Tamkun MM (2006). Kv2.1 potassium channels are retained within dynamic cell surface microdomains that are defined by a perimeter fence. *J Neurosci* **26**(38):9609-18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1825-06.2006.
98. Ohba C, Kato M, Takahashi N, Osaka H, Shiihara T, Tohyama J, Nabatame S, Azuma J, Fujii Y, Hara M, Tsurusawa R, Inoue T, Ogata R, Watanabe Y, Togashi N, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N (2015). De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* **56**: e121–8.
99. Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, Nemeroff CB (1997). Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* **283** (3):1305-22.

100. Oyler J, Maljevic S, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S, Reid CA (2017). Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacol Rev*; **70** (1):142-173. doi: 10.1124/pr.117.014456.
101. Pal S, Hartnett KA, Nerbonne JM, Levitan ES, Aizenman E (2003). Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *J Neurosci* **23** (12):4798-802. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-12-04798.2003.
102. Park KS, Mohapatra DP, Misonou H, Trimmer JS (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science* **313** (5789):976-9. doi: 10.1126/science.1124254.
103. Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, van Rijn CM (2002). The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia* **43** (4):365-85. doi: 10.1046/j.1528-1157.2002.13001.
104. Patsalos PN, Perucca E (2003). Clinically important drug interactions in epilepsy: interactions between antiepileptic drugs and other drugs. *Lancet Neurol* **2** (8):473-81. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00483-6.
105. Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA (2013). Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* **341** (6141):1237758. doi: 10.1126/science.1237758.
106. Poisson K, Wong M, Lee C, Cilio MR (2020). Response to cannabidiol in epilepsy of infancy with migrating focal seizures associated with KCNT1 mutations: An open-label, prospective, interventional study. *Eur J Paediatr Neurol* **25**:77-81. doi: 10.1016/j.ejpn.2019.12.024.
107. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Figure 3.12, [Action potential conduction requires both...]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11107/figure/A200/>
108. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* **18** (1):41-58. doi: 10.1038/nrd.2018.168.
109. Qunies AM, Spitznagel BD, Du Y, David Weaver C, Emmitte KA (2023). Design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of 1,2,4-oxadiazole inhibitors of SLACK potassium channels: Identification of in vitro tool VU0935685. *Bioorg Med Chem* **95**:117487. doi: 10.1016/j.bmc.2023.117487.
110. Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, Sterner C, Tegtmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie AJ, Kleta R, Bockenhauer D, Warth R (2010). KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (32):14490-5. doi: 10.1073/pnas.1003072107.
111. Ricos MG, Cole BA, Hussain R, Rychkov GY, Shaikat Z, Pilati N, Muench SP, Simmons KJ, Dibbens LM, Lippiat JD (2025). Identification of New KCNT1-Epilepsy Drugs by In Silico, Cell, and Drosophila Modeling. *Ann Neurol* **98** (6):1261-1274. doi: 10.1002/ana.78031.
112. Rizzi S, Knaus HG, Schwarzer C (2016). Differential distribution of the sodium-activated potassium channels slick and slack in mouse brain. *J Comp Neurol* **524** (10):2093-116. doi: 10.1002/cne.23934.
113. Robert S. Fisher, J. Helen Cr, Jacqueline A. French, Norimichi H, Edouard H, Floor EJ, Lieven L, Solomon LM, Jukka P, Eliane RP, Ingrid ES, Sameer MZ (2014).

- Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **55** (4):475–82, 2014 doi: 10.1111/epi.12550.
114. Roe MW, Worley JF 3rd, Mittal AA, Kuznetsov A, DasGupta S, Mertz RJ, Witherspoon SM 3rd, Blair N, Lancaster ME, McIntyre MS, Shehee WR, Dukes ID, Philipson LH (1996). Expression and function of pancreatic beta-cell delayed rectifier K⁺ channels. Role in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* **271** (50):32241-6. doi: 10.1074/jbc.271.50.32241.
 115. Rogawski MA, Löscher W (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* **5** (7):553-64. doi: 10.1038/nrn1430.
 116. Saitsu H, Akita T, Tohyama J, Goldberg-Stern H, Kobayashi Y, Cohen R, Kato M, Ohba C, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N (2015). De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Sci Rep* **5**:15199. doi: 10.1038/srep15199.
 117. Sancho M, Kyle BD (2021). The Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel: A Big Key Regulator of Cell Physiology. *Front Physiol* **12**:750615. doi: 10.3389/fphys.2021.750615.
 118. Santi CM, Ferreira G, Yang B, Gazula VR, Butler A, Wei A, Kaczmarek LK, Salkoff L (2006). Opposite regulation of Slick and Slack K⁺ channels by neuromodulators. *J Neurosci* **26** (19):5059-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3372-05.2006.
 119. Sayehmiri F, Ilkhanizadeh-Qomi M, Naderi N, Monteil A, Sayyah M, Hasanzadeh L, Golkar M, Pourbadie HG (2025). Cannabidiol Enhances Stress-Induced Cellular Damage: Potential Contribution of Kv2.1 Inhibition. *J Mol Neurosci* **75** (3):107. doi: 10.1007/s12031-025-02396-7.
 120. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **58** (4):512-521. doi: 10.1111/epi.13709.
 121. Sedaghat R, Taab Y, Kiasalari Z, Afshin-Majd S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M (2017). Berberine ameliorates intrahippocampal kainate-induced status epilepticus and consequent epileptogenic process in the rat: Underlying mechanisms. *Biomed Pharmacother* **87**:200-208. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.109.
 122. Siddoway B, Hou H, Yang J, Sun L, Yang H, Wang GY, Xia H (2014). Potassium channel Kv2.1 is regulated through protein phosphatase-1 in response to increases in synaptic activity. *Neurosci Lett* **583**:142-7. doi: 10.1016/j.neulet.2014.08.051.
 123. Silvinato A, Floriano I, Bernardo WM (2022). Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: Lennox-Gastaut syndrome, Dravet syndrome, and tuberous sclerosis complex. *Rev Assoc Med Bras* **68** (10):1345-1357. doi: 10.1590/1806-9282.2022D689.
 124. Simons C, Rash LD, Crawford J, Ma L, Cristofori-Armstrong B, Miller D, Ru K, Baillie GJ, Alanay Y, Jacquinet A, Debray FG, Verloes A, Shen J, Yesil G, Guler S, Yuksel A, Cleary JG, Grimmond SM, McGaughan J, King GF, Gabbett MT, Taft RJ (2015). Mutations in the voltage-gated potassium channel gene KCNH1 cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nat Genet* **47** (1):73-7. doi: 10.1038/ng.3153. Epub 2014 Nov 24.
 125. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson

- VE, Leppert M (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* **18** (1):25-9. doi: 10.1038/ng0198-25.
126. Soldovieri MV, Ambrosino P, Mosca I, Servettini I, Pietrunti F, Belperio G; KCNA3 study group; Syrbe S, Taglialatela M, Lemke JR (2024). De novo variants in KCNA3 cause developmental and epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* **95** (2):365-376. doi: 10.1002/ana.26826.
 127. Suzuki T, Zaima C, Moriki Y, Fukami T, Tomono K (2007). P-glycoprotein mediates brain-to-blood efflux transport of buprenorphine across the blood-brain barrier. *J Drug Target* **15** (1):67-74. doi: 10.1080/10611860601141606.
 128. Syrbe S, Hedrich UBS, Riesch E, Djémié T, Müller S, Möller RS, Maher B, Hernandez-Hernandez L, Synofzik M, Caglayan HS, Arslan M, Serratosa JM, Nothnagel M, May P, Krause R, Löffler H, Detert K, Dorn T, Vogt H, Krämer G, Schöls L, Mullis PE, Linnankivi T, Lehesjoki AE, Sterbova K, Craiu DC, Hoffman-Zacharska D, Korff CM, Weber YG, Steinlin M, Gallati S, Bertsche A, Bernhard MK, Merckenschlager A, Kiess W; EuroEPINOMICS RES consortium; Gonzalez M, Züchner S, Palotie A, Suls A, De Jonghe P, Helbig I, Biskup S, Wolff M, Maljevic S, Schüle R, Sisodiya SM, Weckhuysen S, Lerche H, Lemke JR (2015). De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet*; **47** (4):393-399. doi: 10.1038/ng.3239.
 129. Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY (2006). How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020404.145837.
 130. Tomson T, Marson A, Boon P, Canevini MP, Covanis A, Gaily E, Kälviäinen R, Trinka E (2015). Valproate in the treatment of epilepsy in girls and women of childbearing potential. *Epilepsia* **56** (7):1006-19. doi: 10.1111/epi.13021.
 131. Torkamani A, Bersell K, Jorge BS, Bjork RL Jr, Friedman JR, Bloss CS, Cohen J, Gupta S, Naidu S, Vanoye CG, George AL Jr, Kearney JA (2014). De novo KCNB1 mutations in epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* **76** (4):529-540. doi: 10.1002/ana.24263.
 132. Trimmer JS (1991). Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K⁺ channel polypeptide in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10764–10768.
 133. Trimmer JS (2015). Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity. *Neuron* **85** (2):238-56. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.042.
 134. Trivisano M, Mosca I, Salimbene L, De Dominicis A, Ambrosino P, Puzo D, Servettini I, Correale C, Falamesca C, Filosomi C, Goffredo B, Soldovieri MV, Taglialatela M, Specchio N (2025). Fluoxetine Treatment in Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures Due to KCNT1 Variants: An Open Label Study. *Ann Neurol* **98** (1):48-61. doi: 10.1002/ana.27213. Epub 2025 Feb 21.
 135. Tsai CL (2005). Quinidine cardiotoxicity. *J Emerg Med* **28** (4):463-5. doi: 10.1016/j.jemermed.2004.10.019.
 136. Vadlamudi L, Dibbens LM, Lawrence KM, Iona X, McMahon JM, Murrell W, Mackay-Sim A, Scheffer IE, Berkovic SF (2010). Timing of de novo mutagenesis--a twin study of sodium-channel mutations. *N Engl J Med* **363** (14):1335-40. doi: 10.1056/NEJMoa0910752.
 137. Vasquez A, Fine AL (2025). Management of Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Semin Neurol* **45** (2):206-220. doi: 10.1055/a-2534-3267.

138. Veale EL, Golluscio A, Grand K, Graham JM Jr, Mathie A (2022). A *KCNB1* gain of function variant causes developmental delay and speech apraxia but not seizures. *Front Pharmacol* 13:1093313. doi: 10.3389/fphar.2022.1093313.
139. Vermoesen K, Massie A, Smolders I, et al (2012). The antidepressants citalopram and reboxetine reduce seizure frequency in rats with chronic epilepsy. *Epilepsia* 53 (5):870–8.
140. Vetri L, Calì F, Saccone S, Vinci M, Chiavetta NV, Carotenuto M, Roccella M, Costanza C, Elia M (2024). Whole Exome Sequencing as a First-Line Molecular Genetic Test in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Int J Mol Sci* 25 (2):1146. doi: 10.3390/ijms25021146.
141. Wang W, Yin H, Feng N, Wang L, Wang X (2020). Inhibitory effects of antidepressant fluoxetine on cloned Kv2.1 potassium channel expressed in HEK293 cells. *Eur J Pharmacol* 878:173097. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173097.
142. Wechsler RT, Burdette DE, Gidal BE, Hyslop A, McGoldrick PE, Thiele EA, Valeriano J (2024). Consensus panel recommendations for the optimization of EPIDIOLEX® treatment for seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome, Dravet syndrome, and tuberous sclerosis complex. *Epilepsia Open* 9 (5):1632-1642. doi: 10.1002/epi4.12956.
143. Wei F, Yan LM, Su T, He N, Lin ZJ, Wang J, Shi YW, Yi YH, Liao WP (2017). Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy. *Neurosci Bull* 33 (4):455-477. doi: 10.1007/s12264-017-0134-1.
144. Wei Y, Shin MR, Sesti F (2018). Oxidation of KCNB1 channels in the human brain and in mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* 9 (8):820. doi: 10.1038/s41419-018-0886-1.
145. Weiss, L., Escayg, A., Kearney, J. et al (2003). Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Mol Psychiatry* 8, 186–194.
146. Wiezlak M, Diring J, Abella J, Moulleron S, Way M, McDonald NQ, Treisman R (2012). G-actin regulates the shuttling and PP1 binding of the RPEL protein Phactr1 to control actomyosin assembly. *J Cell Sci* 125 (Pt 23):5860-72. doi: 10.1242/jcs.112078..
147. Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 57 (5):411-41. doi: 10.1016/0024-3205(95)00209-o.
148. Xiong J, Liu Z, Chen S, Kessi M, Chen B, Duan H, Deng X, Yang L, Peng J, Yin F (2022). Correlation Analyses of Clinical Manifestations and Variant Effects in *KCNB1*-Related Neurodevelopmental Disorder. *Front Pediatr* 9:755344. doi: 10.3389/fped.2021.755344.
149. Yang B, Gribkoff VK, Pan J, Damagnez V, Dworetzky SI, Boissard CG, Bhattacharjee A, Yan Y, Sigworth FJ, Kaczmarek LK (2006). Pharmacological activation and inhibition of Slack (Slo2.2) channels. *Neuropharmacology* 51 (4):896-906. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.06.003.
150. Yang Y, Wu J, Qin G, et al (2020). Structure-Based Identification and Characterization of Inhibitors of the Epilepsy-Associated KNa1.1 (KCNT1) Potassium Channel. *Cell Reports* 30 (1):107–118.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.030.
151. Yin J, Ye J, Jia W (2012). Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.003>
152. Yuan A, Santi CM, Wei A, Wang ZW, Pollak K, Nonet M, Kaczmarek L, Crowder CM, Salkoff L (2003). The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* 37 (5):765-73. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00096-5.

153. Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, McKenna PJ, Feuerstein R, Gu JL, Lysko KA, Davis LL, Feuerstein G (1992). Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* **263** (1):92-8.
154. Zhan X, Drummond-Main C, Greening D, Yao J, Chen SWR, Appendino JP, Au PYB, Turner RW (2022). Cannabidiol counters the effects of a dominant-negative pathogenic Kv7.2 variant. *iScience* **25** (10):105092. doi: 10.1016/j.isci.2022.105092.
155. Zhang Z, Rosenhouse-Dantsker A, Tang QY, Noskov S, Logothetis DE (2010). The RCK2 domain uses a coordination site present in Kir channels to confer sodium sensitivity to Slo2.2 channels. *J Neurosci* **30** (22):7554-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0525-10.2010.
156. Zhang YX, Liu Y, Dong J, Wang YX, Wang J, Zhuang GQ, Han SJ, Guo QQ, Luo YX, Zhang J, Peng XX, Zhang L, Yan YX, Yang XH, Wang H, Han X, Liu GX, Kang YH, Liu YQ, Weng SF, Zhang H, Zhang XQ, Jia KB, Wang L, Zhao L, Xiao ZX, Zhang SH, Wu HH, Lai QX, Qi N, Wang W, Gaisano H, Liu F, He Y (2013). An exploratory study of the association between KCNB1 rs1051295 and type 2 diabetes and its related traits in Chinese Han population. *PLoS One* **8** (2): e56365. doi: 10.1371/journal.pone.0056365.
157. Zhang Q, Liu Y, Xu J, Teng Y, Zhang Z (2021). The Functional Properties, Physiological Roles, Channelopathy and Pharmacological Characteristics of the Slack (KCNT1) Channel. *Adv Exp Med Bio* 1349:387-400. doi: 10.1007/978-981-16-4254-8_18.
158. Zhang J, Liu S, Fan J, Yan R, Huang B, Zhou F, Yuan T, Gong J, Huang Z, Jiang D (2023). Structural basis of human Slo2.2 channel gating and modulation. *Cell Rep* **42** (8):112858. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112858.
159. Zheng Y, Chen J (2024). Voltage-gated potassium channels and genetic epilepsy. *Front Neurol* 15:1466075. doi: 10.3389/fneur.2024.1466075.
160. Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399** (6732):159-62. doi: 10.1038/20200.