UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

Dip.to di Medicina e Scienze della Salute "V. Tiberio"

Dottorato di Ricerca in
MEDICINA TRASLAZIONALE E CLINICA
XXXI CICLO

S.S.D: Area-05-Bio 14 Farmacologia

Tesi di Dottorato

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO MECCANISMO MOLECOLARE E CORRELAZIONI GENOTIPO-FENOTIPO NELLE ENCEFALOPATIE DELLO SVILUPPO ASSOCIATE A VARIANTI NEI GENI *KCNQ2* E *KCNQ3*

Tutor:
Prof. Maurizio Taglialatela

Dottoranda:
Ilaria Mosca

Coordinatore**:**
Prof. Ciro Costagliola

Anno Accademico: 2017/2018

INDICE

ABBREVIAZIONI……..……..3

1. INTRODUZIONE…….....4

Definizione di epilessia e descrizione delle cause……4

Encefalopatia Epilettica……4

I geni *kcnq2* e *kcnq3* codificano per i canali del potassio voltaggio-dipendenti Kv7.2 e Kv7.3……..7

Famiglia dei canali Kv7……8

Struttura della subunità Kv7……...…10

Regolazione della corrente M mediata dal PIP_2 e dalla calmodulina…….16

Ruolo fisiologico della corrente M…….18

Modulazione positiva della corrente M……...……...21

Farmacologia dei canali Kv7……...……...23

Caratteristiche delle mutazioni identificate nei geni *kcnq2 e kcnq3*……..……27

2. SCOPO DELLA RICERCA……...…....31

3. MATERIALI E METODI……...……36

Mutagenesi sito-diretta……...……36

Trasformazione batterica e preparazione del DNA plasmidico……..37

Colture cellulari e trasfezioni con Lipofectamina 2000……...…..38

Registrazioni di elettrofisiologia attraverso la tecnica del *patch-clamp*…….38

Biotinilazione delle proteine di membrana e Western Blotting……...……..…42

Modello Molecolare……...……...…44

Analisi Statistica……...……..44

4. RISULTATI……...45

4.1 STUDIO DELLA MUTAZIONE Kv7.2 R325G……...46

4.1.1 Caratterizzazione biochimica e funzionale dei canali omomerici ed eteromerici incorporanti la mutazione Kv7.2 R325G……...…..46

4.1.2 La mutazione R325G influenza la regolazione PIP_2-dipendente della corrente espressa dai canali Kv7.2 e Kv7.2/Kv7.3…….….52

4.2 STUDIO DELLE MUTAZIONI Kv7.3 V359L E Kv7.3 D542N…….59

4.2.1 Analisi genetica della famiglia……..….59

4.2.2 Caratterizzazione funzionale, biochimica e farmacologica dei canali

omomerci ed eteromerici incorporanti le subunità Kv7.3 mutanti…….....61
4.2.3 Le varianti localizzate al C-terminale della subunità Kv7.3 influenzano la regolazione PIP_2-dipendente……..……....65
4.2.4 Studio delle proprietà funzionali della variante presente a livello dello stesso residuo nei canali Kv7.2 e Kv7.3……..…..69
4.2.5 Recupero farmacologico della funzionalità dei canali Kv7.2 o Kv7.3 incorporanti le varianti associate ad epilessia……..…….75
4.3 STUDIO DELLA MUTAZIONE Kv7.2 G310S……...….77
4.3.1 Caratterizzazione funzionale, biochimica e farmacologica dei canali omomerici ed eteromerici incorporanti la mutazione Kv7.2 G310S…….....77
4.3.2 La mutazione Kv7.2 G310S influenza la regolazione mediata dal PIP_2 e dalla calmodulina……...……...……..83
5. DISCUSSIONE…….87
5.1 Tutte le mutazioni in studio causano effetti di perdita di funzione dei canali Kv7.2 o Kv7.3……...……..90
5.2 La maggior parte delle mutazioni investigate sono localizzate al C-terminale della subunità Kv7……...91
5.3 I canali incorporanti le subunità Kv7.2 o Kv7.3 mutanti mostrano un'alterazione nella regolazione della corrente M mediata dal PIP_2…….……..92
5.4 Alcune delle mutazioni investigate causano anche un'alterazione nella regolazione CaM-dipendente…….……..……94
5.5 La stessa variante nei canali Kv7.2 e Kv7.3 è associata a differenti conseguenze funzionali……..……..95
5.6 La retigabina ripristina la funzionalità dei canali Kv7.2 o Kv7.3 incorporanti le mutazioni causative di EE……...……..…….96
6. BIBLIOGRAFIA……...98
RINGRAZIAMENTI.....112

ABBREVIAZIONI

ADP: depolarizzazione postuma

AHP: iperpolarizzazione postuma

AIS: segmento iniziale dell'assone

Ank_G: anchirina G

BFNE: convulsioni benigne familiari neonatali

CaM: calmodulina

CDKL5: *cyclin dependent kinase like 5*

CHO: cellule di ovaio di criceto cinese

DAG: diacilglicerolo

DE: encefalopatia dello sviluppo

DEE: encefalopatia dello sviluppo ed epilettica

DFNA2: *Non-Syndromic Hearing Loss*

DNM1: *dynamin 1*

DrVSP: *Danio rerio voltage-sensing phosphatase*

EE: encefalopatia epilettica

EIEE: enecefalopatia epilettica infantile precoce

EME: encefalopatia mioclonica precoce

IP_3: inositolo-1,4,5-trifosfato

KCNQ2: *potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2*

KCNQ3: *potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3*

mAChR: recettori colinergici muscarinici

NGS: *next generation sequencing*

OS: sindrome di Ohtahara

PIP_2: fosfatidilinositolo-(4,5)-bisfosfato

PIP5K: fosfatidilinositolo-4-fosfato 5 chinasi

PKC: protein chinasi C

PLC: fosfolipasi C

RT: temperatura ambiente

RTG: retigabina

SCN1A: *sodium voltage-gated channel alpha subunit 1*

SCN2A: *sodium voltage-gated channel alpha subunit 2*

SLC25A22: *solute carrier family 25 member 22*

STXBP1: *sintaxin binding protein 1*

Syx-1A: sintaxina-1A

TEA: tetraetiliammonio

VSD: dominio del sensore del voltaggio

1. INTRODUZIONE

Definizione di epilessia e descrizione delle cause

L'epilessia è una delle malattie neurologiche più comuni e diffuse al mondo e si stima che ne risultino colpiti circa 65 milioni di individui (Moshè *et al*., 2014). La Lega Internazionale Contro l'Epilessia (ILAE) definisce un attacco epilettico come "una transitoria insorgenza di segni e/o sintomi dovuta ad un'attività neuronale anormale, eccessiva o sincrona a livello cerebrale" (Fisher *et al*., 2017). Concettualmente, l'epilessia è caratterizzata da una persistente predisposizione a sviluppare crisi epilettiche e dalle conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali che ne derivano. Tale patologia è definita da una delle seguenti condizioni: 1) almeno due crisi non provocate (o riflesse) separate da più di 24 ore; 2) una crisi non provocata (o riflessa) e la probabilità di ulteriori crisi simile al rischio generale di recidiva (almeno 60%) dopo due crisi non provocate nei successivi 10 anni; 3) diagnosi di sindrome epilettica (Fisher *et al*., 2014). Le cause sono eterogenee e comprendono alterazioni strutturali a livello cerebrale, ictus, traumi, neoplasie, infezioni, risposte autoimmuni e disordini metabolici. Tuttavia, si sta sempre più considerando l'idea di una causa genetica alla base della patologia (Scheffer *et al*., 2017; Myers *et al*., 2018).

Encefalopatia Epilettica

Fino a un terzo delle forme epilettiche risulta resistente ai trattamenti farmacologici ed un'alta percentuale di questi intrattabili disordini è associata a effetti dannosi a livello delle funzioni cognitive e cerebrali. Tali condizioni vengono definite con il termine di **encefalopatia epilettica (EE)** la cui descrizione è stata riportata da Berg e coll. (2010) e si riferisce ad un grave disordine clinico in cui l'attività epilettica durante lo sviluppo cerebrale rappresenta la principale causa del ritardo cognitivo e del disturbo generale complessivo. Tuttavia, negli ultimi tempi si sta cercando di chiarire la correlazione tra crisi epilettiche ed encefalopatia in quanto in alcuni casi vi è disabilità intellettiva senza il manifestarsi delle convulsioni. Da tempo i clinici hanno constatato che le persone con ritardi cognitivi mostrano un rischio aumentato di manifestare epilessia; tuttavia, questi pazienti possono presentare compromissioni nello sviluppo cerebrale prima del

manifestarsi delle crisi epilettiche o quando le convulsioni sono completamente controllate. In questo specifico caso si parla di "encefalopatia dello sviluppo" (DE); in alternativa, questi soggetti possono manifestare contemporaneamente sia encefalopatia dello sviluppo che encefalopatia epilettica (DEE) (Myers *et al*., 2018).

In generale si può asserire che l'EE comprende un gruppo di devastanti disordini epilettici che si presentano nei primi giorni di vita e sono spesso caratterizzati da un quadro elettroencefalografico compromesso, da ritardo cognitivo e disabilità intellettiva, da convulsioni intrattabili e talora dal verificarsi di morte precoce. Esiste un certo grado di comorbidità associato all'EE che include ritardo globale dello sviluppo, disturbi del movimento, autismo e problemi comportamentali (Myers *et al*., 2018).

La causa dell'EE è spesso genetica e negli ultimi anni, grazie all'avvento delle nuove tecniche di sequenziamento, quali la *Next Generation Sequencing* (NGS), sono stati identificati numerosi geni associati a questa patologia (Fig.1).

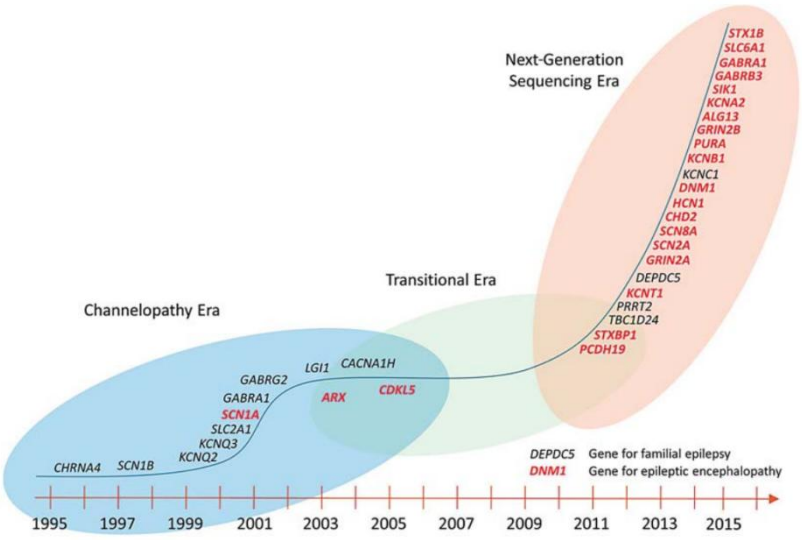

Figura 1. Identificazione di nuovi geni associati ad Encefalopatia Epilettica (Helbig *et al*., 2016).

Sulla base delle caratteristiche cliniche e del quadro elettroencefalografico, le EE possono essere classificate in differenti sindromi, come mostrato in Fig. 2.

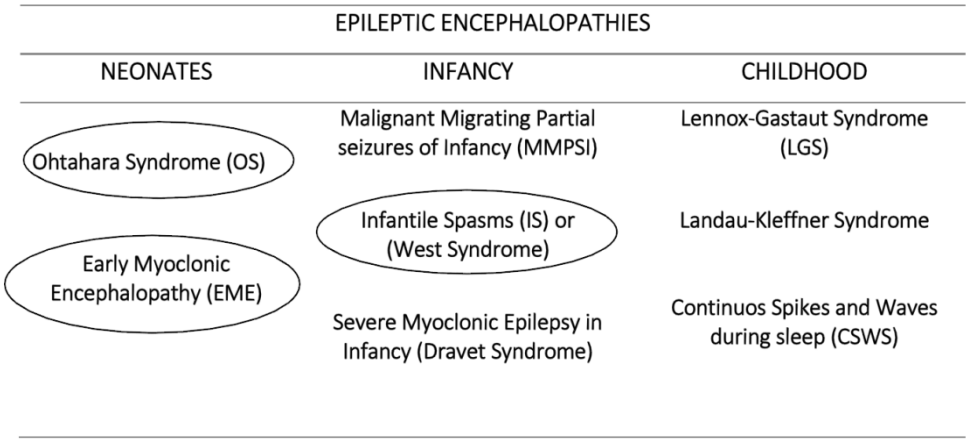

Figura 2. Sindromi cliniche associate ad encefalopatia epilettica e distinte in base al periodo di insorgenza. Le sindromi evidenziate con il cerchio sono associate a mutazioni nel gene *kcnq2* (*classificazione ILAE ; www.ilae.org*).

Per quanto riguarda il presente lavoro di Tesi, i geni di interesse sono *kcnq2* e *kcnq*3. Seguirà una breve descrizione delle principali sindromi di EE associate a questi geni:

Sindrome di Ohtahara (OS): tale sindrome è conosciuta anche con il nome di encefalopatia epilettica infantile precoce (EIEE). Solitamente si manifesta nei primi 3 mesi di vita e la principale caratteristica clinica è la presenza di frequenti spasmi tonici e di un quadro elettroencefalografico caratterizzato da "*suppression-burst*" sia in veglia che durante il sonno. L'*imaging* cerebrale di solito evidenzia anomalie strutturali e possono manifestarsi anche crisi motorie parziali. In alcuni casi, i sintomi sono peggiorati dalla coesistenza di disordini metabolici. Il decorso della malattia è grave e si osserva un marcato ritardo psicomotorio e, in alcuni casi, si può verificare morte prematura. Le convulsioni sono spesso resistenti ai tradizionali farmaci antiepilettici e possono evolvere nella sindrome di West o di Lennox-Gastaut (Ohtahara *et al*., 2013). La patologia è solitamente associata a mutazioni a livello dei geni *STXBP1(sintaxin binding protein 1), KCNQ2* (*potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2*) e *SCN2A (sodium voltage-gated channel alpha subunit 2)* (Nieh *et al*., 2014; von Deimling *et al*., 2017).

Encefalopatia mioclonica precoce (EME): sindrome caratterizzata da aspetti clinici che si sovrappongono a quelli identificati per la sindrome di Ohtahara, quali l'insorgenza nel periodo neonatale, un quadro di "*suppression-burst*" all'EEG (anche se più evidente durante lo stato di sonno) ed una prognosi sfavorevole. La principale caratteristica clinica è l'insorgenza di mioclonie frammentarie, ma si possono

manifestare anche crisi motorie parziali e spasmi tonici. Inoltre, si osserva una progressiva e diffusa atrofia cerebrale. Non è disponibile un trattamento farmacologico efficace, pertanto, i bambini colpiti da questa malattia sopravvivono in uno stato vegetativo persistente, oppure muoiono nel primo o nel secondo anno di vita. Sono state descritte mutazioni nel gene *SLC25A22* (*solute carrier family 25 member 22*) causative di questa sindrome (Nieh *et al*., 2014).

Sindrome di West o Spasmi Infantili: è la forma di encefalopatia epilettica più diffusa. È caratterizzata dalla famosa triade che consiste in un'attività cerebrale anomala nota con il termine di ipsaritmia, spasmi muscolari e ritardo nello sviluppo psicomotorio. Solitamente gli spasmi coinvolgono il tronco, il collo e le estremità degli arti. L'ipsaritmia si riferisce ad un'alterazione del tracciato elettroencefalografico caratterizzato da onde asincrone ampie e lente e da picchi multifocali. I principali geni associati a tale malattia sono *SCN1A (sodium voltage-gated channel alpha subunit 1)*, *SCN2A*, *STXBP1*, *DNM1* (*dynamin 1*) e *CDKL5 (cyclin dependent kinase like 5)*(von Deimling *et al*., 2017).

I geni *kcnq2* e *kcnq3* codificano per i canali del potassio voltaggio-dipendenti Kv7.2 e Kv7.3

Il gene *kcnq2* è localizzato sul cromosoma 20 in posizione 13.3 (20q13.3) e codifica per il canale del potassio voltaggio-dipendente chiamato Kv7.2. Questo gene può produrre 5 differenti trascritti, definiti da *a* ad *e*, sebbene il ruolo biologico di ciascuna isoforma ancora non sia stato completamente chiarito. La regione del trascritto codificante per il dominio transmembrana risulta conservato tra le diverse varianti, al contrario ciò che cambia è la regione codificante per la prima metà del dominio intracellulare C-terminale. Il gene *kcnq3* è localizzato sul cromosoma 8 in posizione 24 (8q24) e codifica per un'unica isoforma del canale del potassio voltaggio-dipendente detto Kv7.3, che insieme all'omologo Kv7.2, appartiene alla famiglia dei canali del potassio Kv7.

Famiglia dei canali Kv7

I canali Kv7 erano inizialmente conosciuti con la sigla "KCNQ" dove "K" indica gli ioni potassio K^+, "CN" si riferisce al canale e "Q" corrisponde alla sindrome QT associata al gene *kcnq1* che è stato il primo della famiglia ad essere stato identificato e le cui mutazioni sono una causa nota dell'insorgenza della sindrome del QT lungo. La famiglia dei canali Kv7 comprende cinque membri, classificati da Kv7.1 a Kv7.5, e ciascun membro ha una peculiare distribuzione tissutale, rilevanza fisiologica e farmacologica.

Kv7.1: è stata la prima isoforma identificata. I canali Kv7.1 si assemblano con le subunità β KCNE1 per formare i canali eteromerici, conosciuti anche come minK o IsK, che sottendono la componente lenta della corrente ripolarizzante ventricolare (I_{Ks}) coinvolta nella fase tardiva di ripolarizzazione del potenziale di azione cardiaco (Sanguinetti *et al.*, 1996). I canali Kv7.1/KCNE1 sono principalmente espressi nel cuore, ma si trovano anche nell'orecchio interno, ghiandola tiroidea, polmoni, tratto gastrointestinale, piccolo intestino, pancreas, cervello e ovaio (Maljevic *et al.*, 2010). Mutazioni a carico di questi canali sono responsabili della sindrome del QT lungo, un disordine aritmico caratterizzato da un allungamento dell'intervallo di ripolarizzazione (QT) all'ecocardiogramma che predispone all'insorgenza di aritmie ventricolari polimorfe denominate "torsioni di punta". Mutazioni a carico di Kv7.1 e KCNE1 sono state associate anche a forme di fibrillazione atriale familiare o di sindrome del QT corto. La sindrome del QT lungo è causata da mutazioni con effetto di perdita di funzione e quindi da una riduzione della corrente I_{Ks}, al contrario mutazioni con effetto di guadagno di funzione sono responsabili della fibrillazione atriale familiare o della sindrome del QT corto (Soldovieri *et al.*, 2011).

Kv7.2 e Kv7.3: le subunità Kv7.2 e Kv7.3 sono ampiamente espresse a livello del sistema nervoso centrale e periferico dove possono associarsi sia in forma omomerica che eteromerica. I canali Kv7.2 di tipo omomerico sottendono una corrente del K^+ che si attiva intorno a valori di -40/-50 mV di potenziale di membrana. In sistemi eterologhi, le correnti espresse dal canale omomerico Kv7.3 hanno un'ampiezza ridotta rispetto a quelle dei canali Kv7.2 e sono attivate da potenziali significativamente più negativi (intorno a -60 mV). La co-espressione delle subunità Kv7.2 e Kv7.3 nella medesima cellula genera correnti che si caratterizzano per un'ampiezza di gran lunga maggiore

rispetto a quella che si ottiene dalla semplice somma delle correnti prodotte dai canali omomerici.

In effetti, l'assemblaggio di tipo eteromerico delle subunità Kv7.2 e Kv7.3 è responsabile della formazione di canali che sottendono una corrente ripolarizzante detta "corrente M" (I_{KM}), una corrente di K^+ a lenta attivazione e deattivazione, non inattivante, regolata da recettori accoppiati a proteine $G_{q/11}$. In particolare tale corrente è inibita dall'attivazione dei recettori muscarinici, da cui prende il nome. La corrente I_{KM} regola l'eccitabilità della membrana mantenendola in un intervallo al di sotto della soglia per la generazione del potenziale d'azione: questa corrente, infatti, contribuisce alla ripolarizzazione della membrana in seguito a lunghe depolarizzazioni limitando così la scarica ripetitiva nei neuroni (Soldovieri *et al*., 2011). Pertanto, l'inibizione di tale corrente è spesso sufficiente ad aumentare l'eccitabilità neuronale: mutazioni nei geni *kcnq*2 e *kcnq3* che codificano per questi canali sono responsabili delle Convulsioni Benigne Neonatali Familiari (BFNE), una rara forma di epilessia idiopatica dei neonati a trasmissione autosomico-dominante (Maljevic *et al*., 2010). Tale patologia è caratterizzata dall'insorgenza di convulsioni parziali o generalizzate in un contesto di normale sviluppo neuropsicologico. Le crisi epilettiche compaiono al terzo giorno di vita post-natale e solitamente scompaiono spontaneamente dopo alcune settimane o mesi; tuttavia, nel 10-15% dei bambini colpiti, le convulsioni si ripresentano nuovamente nel corso della vita (Plouin 1994). Inoltre, come precedentemente detto, di recente mutazioni in questi geni sono state anche riscontrate in famiglie affette da gravi forme di EE (Weckhuysen *et al.*, 2012-2013; Allen *et al*., 2013).

Kv7.4: tali canali sono maggiormente espressi nell'orecchio interno (organi vestibolari e cocleari) e nelle vie uditive centrali, ma è stata riscontrata una minore espressione anche nel cervello, nei muscoli scheletrici e nei muscoli lisci viscerali e vascolari. Mutazioni a carico dei geni Kv7.4 sono responsabili di una rara forma di sordità autosomico-dominante di tipo 2, definita *Non-Syndromic Hearing Loss* (DFNA2), caratterizzata dalla perdita progressiva dell'udito. Studi funzionali hanno rivelato che le mutazioni causative di DFNA2 inducono una perdita di funzione del canale Kv7.4 sia mediante un meccanismo di aplosufficienza che attraverso un effetto di dominanza-negativa (Maljevic *et al*., 2010; Soldovieri *et al.*, 2011). Nello specifico, è stato osservato che le mutazioni che causano un effetto dominante-negativo sono riscontrate

principalmente in soggetti che manifestano perdita dell'udito con esordio precoce; al contrario, le mutazioni associate ad un meccanismo di aplosufficienza sono state identificate in pazienti affetti da deficit uditivo ad insorgenza tardiva (Topsakal *et al*., 2005).

Kv7.5: I canali Kv7.5 sono gli ultimi membri della famiglia dei Kv7 ad essere stati identificati: essi sono espressi principalmente in tessuti neuronali (cervello e gangli), ma anche a livello della muscolatura liscia e scheletrica. Le subunità Kv7.5 si assemblano maggiormente con le isoforme Kv7.2, Kv7.3 o Kv7.4 contribuendo all'eterogeneità della corrente M. Recentemente, mutazioni in questo gene sono state associate a forme di EE e di disabilità intellettiva (Lehman *et al*., 2017).

Struttura della subunità Kv7

Strutturalmente il canale Kv7 è un tetramero formato da quattro subunità. Ciascuna subunità è costituita da due domini funzionali: una regione transmembrana codificata da circa il 26% di sequenze amminoacidiche, e una regione intracellulare formata dal 74% di sequenze amminoacidiche (1% all'N-terminale e 73% al C-terminale). La regione transmembrana mostra un'organizzazione topologica con 6 segmenti (6 STM) ad α-elica denominati da S_1 a S_6: la regione compresa tra i segmenti S_1-S_4 forma il dominio del sensore del voltaggio (VSD) che gioca un ruolo fondamentale nei cambiamenti del canale dalla conformazione di riposo a quella attivata in risposta a variazioni del potenziale di membrana (Tombola *et al*., 2006), mentre la regione S_5-S_6 forma il dominio del poro che consente il passaggio degli ioni K^+ attraverso la membrana plasmatica. Così come per gli altri canali del potassio, il passaggio selettivo degli ioni K^+ deidratati è favorito dalla presenza di sequenze GYG altamente conservate. Quando quattro subunità si associano a formare la struttura tetramerica del canale i segmenti S_5 ed S_6 (nonché l'elica-P ed il *loop* di connessione tra le eliche) formano il dominio centrale del poro, mentre gli altri segmenti, formanti i quattro domini del sensore del voltaggio, sono disposti radialmente al poro (Fig. 3). Ciascun dominio VSDs è in grado di regolare l'apertura del poro. I vari segmenti ed i tratti di congiunzione tra di essi svolgono un ruolo specifico nelle varie attività del canale come l'attivazione, l'inattivazione e la selettività ionica (Soldovieri *et al.*, 2011).

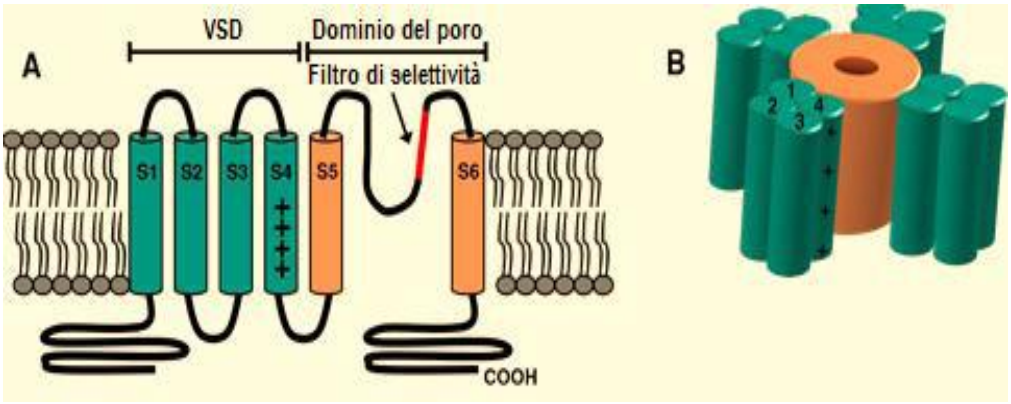

Figura 3. Architettura generale di un canale Kv7. A**)** Struttura topologica di una subunità dei canali Kv7 composta da 6 segmenti ad α-elica (S_1-S_6) con N- e C-terminali intracellulari. B) Canale Kv7 maturo composto da 4 subunità, in cui i segmenti S_1-S_4 formano il VSD ed i segmenti S_5- S_6 delimitano il poro (adattato da Börjesson *et al.*, 2008*).*

Mentre la regione transmembrana svolge un ruolo importante nel passaggio selettivo degli ioni K^+ attraverso la membrana in seguito ai cambiamenti del potenziale di azione, il lungo dominio C-terminale è fondamentale per le funzioni svolte dal canale Kv7 e per la sua regolazione. Il dominio C-terminale dei canali Kv7 è il più lungo rispetto a quello presente negli altri membri della famiglia dei canali del potassio voltaggio-dipendenti, ed è organizzato in quattro distinte eliche, denominate da A a D, che risultano conservate in tutti membri della famiglia Kv7 e che contengono siti importanti per il processo di tetramerizzazione e per l'interazione con molecole modulatorie e proteine accessorie (Fig. 4). Alcune di queste molecole modulatrici regolano le proprietà biofisiche dei canali Kv7 e/o il loro trasporto, il ripiegamento e l'eteromerizzazione, spesso modulando dinamicamente l'affinità e il legame di altre molecole (Barrese et al., 2017). Le eliche C e D formano strutture *coiled-coil* necessarie per le interazioni intersubunità, mentre le eliche A e B presentano i siti di legame per una molecola regolatoria chiamata calmodulina. L'importanza del dominio C-terminale nei canali Kv7 è evidenziata anche dal fatto che, proprio per la sua maggiore estensione, molte mutazioni causative di patologia cadono all'interno di questo dominio.

Pertanto, il C-terminale può rappresentare un bersaglio interessante per modulare selettivamente le subunità Kv7.

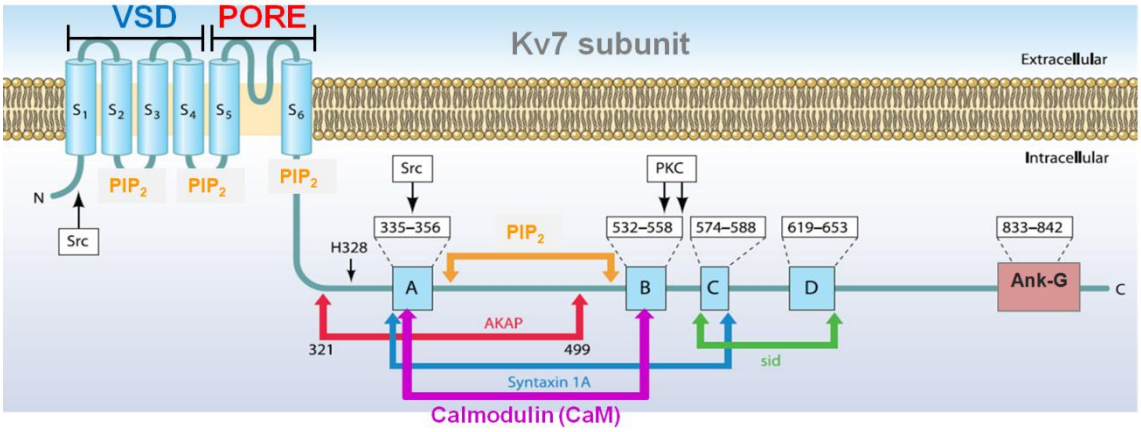

Figura 4. Rappresentazione del lungo dominio C-terminale della subunità Kv7.2. È possibile osservare le quattro ipotetiche regioni ad α-elica denominate A, B, C, e D, e i differenti domini di legame del fosfatidilinositolo-(4-5)-bisfosfato (PIP_2), della calmodulina (CaM), della proteina di ancoraggio per la chinasi A (AKAP), della proteina chinasi C (PKC) e dell'anchirina G (Ank-G) (adattato da Soldovieri *et al*., 2011).

Seguirà una breve descrizione delle principali molecole regolatorie che si legano al dominio C-terminale dei canali Kv7.

Calmodulina: la calmodulina (proteina modulata dal calcio o CaM) è una molecola di piccole dimensioni (148 aa), solubile, acida e termostabile che si trova in tutti i tessuti corporei, ma risulta particolarmente abbondante a livello cerebrale dove le sue concentrazioni variano tra 1 a 10 µM. Strutturalmente, la CaM presenta due differenti domini globulari, chiamati lobo-N e lobo-C, connessi l'uno all'altro attraverso una regione *linker* centrale flessibile. Ogni lobo è formato da due motivi strutturali chiamati *EF-hand* che permettono di legare fino a quattro ioni Ca^{2+} per ogni molecola di CaM. Questa molecola gioca un ruolo chiave nei *pathways* cellulari dove funge da sensore o trasduttore dei segnali di Ca^{2+} regolando la funzione di altre proteine, quale quella dei canali ionici (Alaimo and Villarroel, 2018). A livello dei canali Kv7, il dominio di legame della CaM è costituito da due siti discontinui localizzati nell'elica A e B del dominio C-terminale e separati da circa 135 residui (Yus-Najera *et al*., 2002). Il dominio nell'elica A (hA) è formato dal canonico motivo di legame IQ (IQXXXRXXXXR) in cui i primi due residui sono rispettivamente isoleucina (I) e glutammina (Q). L'altro sito presente nell'elica B (hB) mostra due domini sovrapposti di tipo 1-5-10 (LxxxIxxxxV e MxxxVxxxxF) e tre residui di serina (Ser^{511}, Ser^{523}, Ser^{530}) che possono essere fosforilati dalla protein chinasi C (PKC) (Fig. 4). Infatti, è stato dimostrato che quando la Ser^{511} è mutata in aspartato si assiste alla perdita

dell'interazione del canale Kv7 con la CaM, mentre tale interazione è solo parzialmente alterata quando vengono mutate le altre due serine. Questi risultati suggeriscono che la PKC gioca un ruolo nel legame della CaM con i canali Kv7 mediando la fosforilazione di tali serine (Yus-Najera *et al*., 2002). Nel canale Kv7.2 sembra esserci un ulteriore sito ("motivo TW") tra le eliche A e B che contribuisce al legame della CaM (Gomis-Perez *et al*., 2015). La CaM svolge numerosi ruoli regolatori su tali canali sia nella forma legata che non legata al calcio: innanzitutto, ne regola il *folding* e il *trafficking* verso la membrana plasmatica (Etxeberria *et al*., 2008). Infatti, mutazioni nelle eliche A o B indeboliscono il legame con la CaM causando la ritenzione delle subunità Kv7.2 nel reticolo endoplasmatico (Etxeberria *et al*., 2008). Inoltre, la CaM è essenziale per la corretta funzionalità della corrente M sottesa dai canali eteromerici Kv7.2/Kv7.3 (Gamper and Shapiro, 2003): in particolare, la CaM sembra stabilizzare il poro nella configurazione aperta quando non è legata al calcio, e invece in quella chiusa quando è calcificata (Xu *et al*., 2013). In accordo, in un nostro recente lavoro, abbiamo dimostrato che la corrente espressa dal canale Kv7.2 viene potenziata in seguito all'overespressione della CaM e che tale effetto risulta essere dose-dipendente. Inoltre, abbiamo osservato che tale potenziamento è maggiore quando la CaM non lega il calcio, una condizione ottenuta sperimentalmente mediante l'uso di una CaM mutata (detta CaM_{1234}) in cui sono mutati i quattro residui di acido aspartico necessari per il legame dello ione (Gamper and Shapiro, 2003; Ambrosino *et al*., 2015). In aggiunta, abbiamo osservato che alcune mutazioni causative di BFNE che cadono nel sito di legame per la CaM determinano specifiche conseguenze biochimiche e funzionali che vanno dalla lieve alterazione nell'affinità del canale alla CaM che non si traduce in conseguenze funzionali (L315V), alla significativa riduzione dell'affinità alla CaM e della modulazione funzionale da essa mediata (L351F, Y362C o R553Q), fino alla completa perdita di funzione senza osservare una significativa alterazione nell'affinità del canale alla CaM (W344R) (Ambrosino *et al*., 2015). Tuttavia, vi sono anche alcuni lavori che rivelano il contrario, ossia che l'overespressione della CaM causa una riduzione della densità di corrente del canale Kv7.2 (Gamper et al., 2005): possibili differenze nelle condizioni sperimentali utilizzate (modelli cellulari diversi, isoforme diverse dei canali Kv7, differenti condizioni di registrazione, ecc.) possono essere alla base di tali discrepanze. Infine, recentemente è stato dimostrato che mutazioni nel dominio di

legame alla CaM interferiscono anche con l'attivazione del canale mediata dal fosfatidilinositolo-(4-5)-bifosfato (PIP_2) (Tobelaim *et al*., 2017a; Tobelaim *et al*., 2017b), suggerendo una complessa regolazione sequenziale da parte di queste due molecole.

PIP_2: è un fosfolipide carico negativamente localizzato sul lato intracellulare della membrana plasmatica. Il PIP_2 è un importante cofattore per numerosi canali ionici e trasportatori, compresi i canali Kv7 (Kruse *et al*., 2012). A livello della subunità Kv7.2, il PIP_2 presenta almeno quattro domini di legame: due siti sono localizzati nelle regioni linker S_2-S_3 e S_4-S_5 e coinvolgono rispettivamente i residui di lisina K162 e K230 (Zhang *et al*., 2013); un terza regione di legame al PIP_2 comprende il residuo di istidina H327 presente nel dominio C-terminale prossimale al dominio S_6 (Zhang *et al*., 2003; Telezhkin *et al*., 2013), mentre il quarto sito di legame è localizzato al C-terminale tra le eliche A e B e coinvolge un *cluster* di amminoacidi basici quali i residui K425-K469 (Hernandez *et al*., 2008). In Fig. 4 sono indicati i domini appena descritti. Il PIP_2 funge da attivatore dei canali Kv7 e la sua interazione a livello del linker S_4-S_5 del sensore del voltaggio determina un aumento della probabilità di apertura del canale, stabilizzandone lo stato aperto. I canali Kv7.2, Kv7.4 e Kv7.5 mostrano una bassa affinità per il PIP_2, al contrario, per il canale Kv7.3 è stata dimostrata una maggiore affinità (Li *et al*., 2005). Alcuni siti di interazione del PIP_2 appaiono parzialmente sovrapposti alle regioni di legame della CaM (Fig. 4).

AKAP: la proteina di ancoraggio per la chinasi A (AKAP79/150) facilita le cascate di segnalazione mediate dai secondi messaggeri che permettono di legare gli enzimi ai substrati bersaglio a livello della membrana plasmatica, tra questi substrati bersaglio ci sono anche i canali Kv7 (Wong *et al*., 2004; Hoshi *et al*., 2005). Questa proteina è localizzata sulla membrana plasmatica attraverso il sito di legame al PIP_2 e mediante una modificazione dinamica post-traduzionale di molte proteine, nota come palmitoilazione, che consiste nel legame covalente degli acidi grassi a catena lunga alle catene laterali dei residui di cisteina, treonina o serina. AKAP79/150 forma un complesso trimerico con la PKC e questa interazione è cruciale per la specifica dissociazione della CaM dalla subunità Kv7.2 operata da tale chinasi. Infatti, l'attivazione della PKC causa la fosforilazione dei residui di serina presenti nell'elica B, causando il distacco della CaM a cui segue la riduzione della corrente M (Hoshi *et al*., 2003).

Sintaxina-1A: la proteina SNARE sintaxina-1A (syx-1A) è localizzata sulla membrana presinaptica e funge da sito di ancoraggio per le vescicole sinaptiche. Infatti, l'N-terminale della syx-1A interagisce con la proteina neuronale Sec1 (STXBP1) costituendo un complesso coivolto nella fusione delle vescicole con la membrana e nel conseguente rilascio di neurotrasmettitori (Misura *et al*., 2002). È stato dimostrato che la syx-1A interagisce con l'elica A del dominio C-terminale delle subunità Kv7.2 e Kv7.3 e riduce la corrente elicitata dal canale Kv7.2 di almeno il 50%, mentre non ha alcun effetto sulla corrente mediata dai canali Kv7.3 (Regev *et al*., 2009). Pertanto, è stato ipotizzato che questo differente effetto sui canali Kv7.2 e Kv7.3 potrebbe essere dovuto alla presenza di siti aggiuntivi di legame per la syx-1A nel canale Kv7.2 (in particolare, nel dominio N-terminale) che potrebbero non essere conservati in Kv7.3 (Regev *et al*., 2009). Da sottolineare è che alcune mutazioni associate a BFNE e localizzate nel dominio C-terminale del canale Kv7.2 riducono (L351V, Y362C) o aboliscono (L351F, R553G) la capacità di syx-1A di inibire la corrente mediata dal canale omomerico Kv7.2 o eteromerico Kv7.2/Kv7.3 (Soldovieri *et al*., 2014).

Nedd4-2: la proteina ubiquitina ligasi Nedd4-2 regola l'espressione sulla membrana plasmatica dei canali Kv7.1/KCNE1, Kv7.2/Kv7.3 e Kv7.3/Kv7.5 (Jespersen *et al*., 2005; Ekberg *et al*., 2007). Nedd4-2 riduce la corrente elicitata da tali canali, probabilmente promuovendo la loro ubiquitinazione, internalizzazione e degradazione: il dominio PY, localizzato al C-terminale del canale Kv7.1, è cruciale in questo processo, invece, il ruolo della stessa regione nelle subunità Kv7.2 o Kv7.3 non è ancora stato chiarito.

Anchirina G: l'anchirina G (Ank_G) è una proteina adattatrice che lega le proteine integrali di membrana e media la loro interazione con il citoscheletro. Il dominio di legame di questa proteina è chiamato motivo C3, è lungo circa 10 amminoacidici ed è stato riscontrato a valle dell'elica D esclusivamente nel C-terminale delle subunità Kv7.2 e Kv7.3, ma non nelle altre subunità della famiglia dei canali Kv7 (Pan *et al*., 2006). L'AnkG favorisce l'interazione delle subunità Kv7.2 e Kv7.3 al segmento iniziale dell'assone (AIS) e ai nodi di Ranvier, siti neuronali coinvolti nella genesi e nella propagazione del potenziale di azione (Devaux *et al*., 2004).

Degno di nota è il fatto che le molecole regolatorie appena descritte si associno a regioni parzialmente sovrapposte a livello del dominio C-terminale della subunità Kv7, suggerendo un complesso network di interazione. Infatti, il sito di legame per la CaM, che coinvolge le eliche A e B, in parte si sovrappone con i siti di legame per il PIP_2, per AKAP e per la syx-1A, e presenta putativi siti di fosforilazione per PKC (Fig. 4).

Regolazione della corrente M mediata dal PIP_2 e dalla calmodulina

A livello neuronale, la corrente M è principalmente espressa dai canali eteromerici Kv7.2/Kv7.3 e svolge un ruolo fondamentale nello stabilizzare il potenziale di membrana inibendo l'ipereccitabilità neuronale e la frequenza di scarica. Tale corrente è così chiamata in quanto è inibita dall'attivazione dei recettori colinergici muscarinici **(mAChR**) di tipo M_1 che sono accoppiati a proteine G_q. In particolare, il meccanismo inibitorio avviene attraverso il *pathway* delle proteine $G_{q/11}$ che attiva la fosfolipasi C (PLC). Tale enzima catalizza l'idrolisi del PIP_2 in due secondi messaggeri, ossia l'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3) e il diacilglicerolo (DAG). L'idrolisi del PIP_2 rappresenta il primo evento della cascata che determina la soppressione della corrente M. In aggiunta, la combinazione dei secondi messaggeri generati provoca l'attivazione della PKC che fosforila il canale a livello del residuo di serina S541 localizzato nel segmento distale del dominio di legame della CaM. Tale fosforilazione ha come conseguenza la dissociazione della CaM dalla coda citoplasmatica (Fig. 5). Il canale senza CaM risulta meno affine al PIP_2: pertanto, tale accoppiamento sequenziale tra PIP_2 e CaM causa il silenziamento della corrente M favorendo l'eccitabilità neuronale (Kosenko *et al*., 2012).

Pertanto, il silenziamento della corrente M, dopo stimolazione muscarinica, avviene attraverso distinti passaggi consequenziali: 1) la PLC determina la deplezione del PIP_2; 2) la fosforilazione indotta dalla PKC determina la dissociazione della CaM dalla subunità Kv7.2; 3) in assenza di CaM il canale è meno capace di legare il PIP_2; 4) l'alterata capacità di interagire con il PIP_2 porta al collasso del poro del canale (Hansen *et al*., 2011).

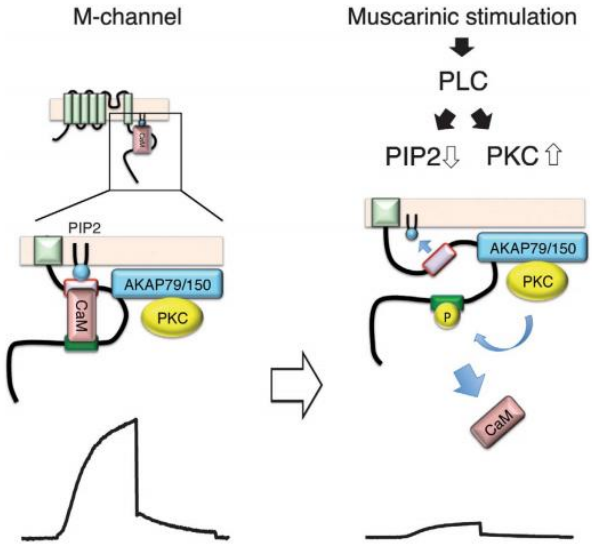

Figura 5. Rappresentazione schematica del meccanismo di modulazione della corrente M mediato dall'attivazione della PLC e, successivamente, della PKC (Kosenko *et al*., 2012).

Recentemente si sta focalizzando molto l'attenzione sulla correlazione tra PIP_2 e CaM nella regolazione dei canali Kv7. Infatti, è stato visto che nella subunità Kv7.2 determinate mutazioni identificate a livello del dominio di legame della CaM interferiscono anche con l'attivazione del canale mediata dal PIP_2 (Zhang *et al*., 2003), suggerendo una competizione tra calmodulina e PIP_2. Infatti, poiché i domini di legame del PIP_2 e della CaM sono molto vicini e parzialmente sovrapposti, non sorprende che alcuni degli effetti indotti dalla CaM sulle funzioni dei canali Kv7 sembrino in realtà dovuti a cambiamenti nell'affinità al PIP_2 (Hernandez *et al*., 2008). Hoshi e coll. (2014) hanno dimostrato che la fosforilazione della CaM, mediata dalla casein chinasi 2, favorisce il legame di questa molecola al canale Kv7.2 e induce una resistenza alla deplezione del PIP_2, aumentando l'ampiezza della corrente espressa dal canale (Kang *et al*., 2004). In accordo con questi studi, il nostro gruppo di ricerca ha osservato che l'espressione e la disponibilità di CaM_{1234}, ossia una CaM incapace di legare il calcio, altera la regolazione dei canali Kv7.2 e Kv7.3 mediata dal PIP_2 (Gomis-Perez *et al*., 2017). In particolare, l'espressione di CaM_{1234} rende il canale Kv7.2 più resistente alla deplezione dei livelli di PIP_2, invece, i canali eteromerici Kv7.2/Kv7.3 diventano più suscettibili alla riduzione delle concentrazioni di questo fosfolipide. Pertanto, questi studi suggeriscono che la CaM influenza la sensibilità al PIP_2 dei canali Kv7.

Sebbene la corrente M sia principalmente inibita dall'attivazione dei recettori colinergici muscarinici (mAChR), anche altri recettori possono svolgere un ruolo nella regolazione di tale corrente; tra questi troviamo i recettori per la bradichinina, angiotensina II, istamina, recettori-2 attivati da proteasi (PAR-2), recettori P2Y, e potenzialmente tutti gli altri recettori GPCR accoppiati a proteine $G_{q/11}$.

Ruolo fisiologico della corrente M

Sulla base delle sue caratteristiche, la corrente M svolge diversi ruoli associati al controllo dell'eccitabilità neuronale. Infatti, a differenza di molti altri canali del potassio voltaggio-dipendenti, i canali Kv7 non inattivano, pertanto, finché la membrana rimane depolarizzata, la corrente M persiste. Il risultato è l'efficace stabilizzazione del potenziale di membrana per tutta la durata in cui i neuroni ricevono stimoli eccitatori. La lenta cinetica di attivazione dei Kv7 indica che questi canali non alterano l'ampiezza o la durata del potenziale di azione; piuttosto, la conseguenza funzionale della corrente M è quella di bloccare la membrana a potenziali più negativi, prevenendo il verificarsi di ripetitivi potenziali di azione. Nello specifico, la corrente M consente di controllare numerosi aspetti dell'eccitabilità neuronale:

Controllo del potenziale di membrana: a causa dell'assenza di inattivazione, i canali Kv7 sono implicati nel controllo del potenziale di membrana a riposo (RMP) a livello del segmento iniziale dell'assone (AIS) e delle porzioni non mielinizzate degli assoni, dei nodi di Ranvier e dei terminali degli assoni. Nello specifio, nei nodi di Ranvier, il controllo del potenziale di riposo da parte della corrente M è anche un fattore determinante per aumentare il recupero dei canali inattivati (ad esempio i canali del Na^+ assonici e i canali del K^+ di tipo A), consentendo un potenziale di azione consecutivo. Pertanto, ai nodi di Ranvier i canali Kv7 esercitano due funzioni contrastanti: aumentare la soglia del potenziale d'azione, ma favorire anche l'eccitabilità promuovendo il recupero dall'inattivazione dei canali del Na^+ (Battefeld *et al*., 2014). Inoltre, è noto che a livello del terminale assonico i canali Kv7 regolano il rilascio sinaptico dei neurotrasmettitori proprio attraverso la regolazione del potenziale di riposo (Martire *et al*., 2004), come verrà descritto in seguito.

Controllo dell'iperpolarizzazione postuma: negli assoni uno stimolo depolarizzante che supera il valore soglia porta alla genesi e alla propagazione del potenziale di azione, definito come un cambiamento transitorio del potenziale di membrana indotto dal flusso di ioni all'interno/all'esterno della cellula. Come mostrato in Fig. 6, il potenziale di azione è caratterizzato da una fase di depolarizzazione rispetto al valore soglia e da una fase di ripolarizzazione. La fase di ripolarizzazione è seguita da una breve iperpolarizzazione postuma (AHP) prima che il potenziale di membrana raggiunga nuovamente il potenziale di riposo; quest'ultima fase è dovuta ai canali K^+ che rimangono aperti. La AHP è suddivisa in una sequenza di tre fasi: una veloce (fAHP, dalla durata di 2-5 ms), una media (mAHP, tipicamente dalla durata di 50-100 ms) e una lenta (sAHP, che dura circa 0,1-2 secondi a diversi secondi). Queste tre fasi sono dovute a distinti canali del K^+: il fAHP è ampiamente mediato dai canali voltaggio-dipendenti BK e Ca^{2+}, il mAHP è mediato dai canali Kv7 e HCN, mentre sAHP è mediato dai canali Kv7 e SK.

Pertanto, la corrente M svolge un ruolo importante durante la depolarizzazione postuma (ADP) riducendo gli impulsi che la generano, agisce nella fase media dell'iperpolarizzazione postuma e contribuisce anche alla fase lenta fungendo da freno per il *firing* neuronale (Storm 1990; Yue e Yaari 2004; Gu *et al*., 2005). Quindi, quando i canali Kv7/M sono bloccati (da farmaci inibitori quale la linopirdina e l'XE991), il neurone rimane depolarizzato per un lungo periodo durante il quale può generare picchi multipli (Yue e Yaari, 2004) (Fig. 6).

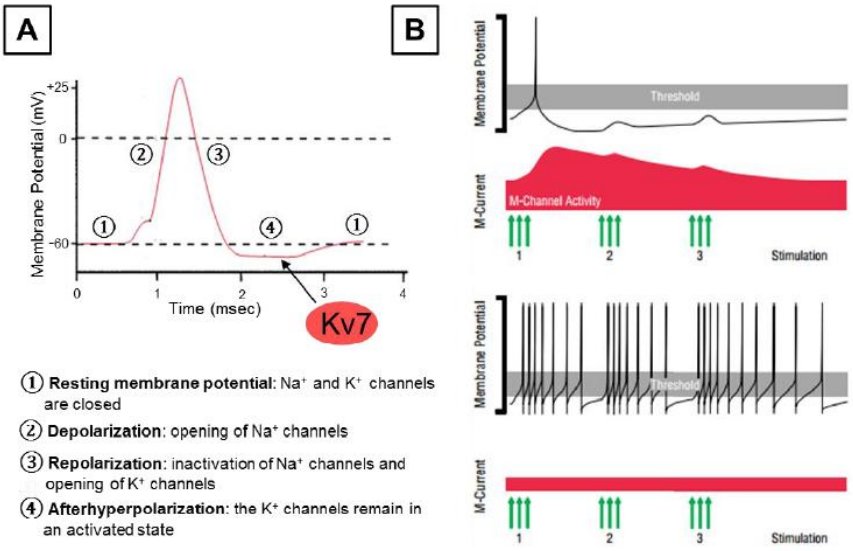

Figura 6. Ruolo della corrente M nel controllo dell'eccitabilità neuronale. A) Rappresentazione del potenziale di azione. B) In alto: gli input eccitatori (frecce verdi, 1) causano la depolarizzazione del potenziale di membrana e l'insorgenza di un singolo potenziale di azione. In seguito, l'aumento dell'attivazione dei canali esprimenti la corrente M iperpolarizza il potenziale di membrana, prevenendo il verificarsi di ripetitivi potenziali di azione (frecce verdi, 2,3). In basso: quando l'attività del canale Kv7 è ridotta (ad esempio in presenza di mutazioni), gli input eccitatori portano a molteplici potenziali d'azione (Cooper and Jan, 2003).

Modulazione dell'intervallo interspike: gli impulsi ad alta frequenza dei potenziali di azione portano all'attivazione dei canali Kv7 favorendo il graduale aumento dell'intervallo tra gli spike, anche conosciuto come adattamento della frequenza degli spike (Aiken *et al*., 1995). È stato dimostrato che la corrente M controlla la frequenza di scarica nei neuroni dopaminergici dell'area tegmentale ventrale e nei neuroni ippocampali. Pertanto, la corrente M regola efficacemente la frequenza di scarica nei neuroni sottoposti a continui stimoli eccitatori (Madison *et al*., 1984).

Risonanza-theta: un'altra funzione fisiologica dei canali Kv7, in condivisione con i canali HCN, è di facilitare la capacità di risposta alle oscillazioni sottosoglia del potenziale di membrana all'interno delle frequenze theta (2-7 Hz). Questa funzione è stata principalmente caratterizzata nei neuroni piramidali nell'ippocampo dove la risonanza-theta è considerata una componente fondamentale per la neuroplasticità, l'apprendimento e la memoria (Hu *et al*., 2002).

Rilascio dei neurotrasmettitori dai terminali presinptici: a livello dei terminali presinaptici, un aumento dei canali Kv7 riduce il rilascio dei neurotrasmettitori. Infatti, l'attivazione della corrente I_{KM} presinaptica iperpolarizza le terminazioni nervose ippocamapali, riducendo così l'aflusso di Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. A sua volta, la ridotta concentrazione di Ca^{2+} limita il rilascio di neurotrasmettitori, quali norepinefrina, GABA e D-aspartato (Martire *et al*., 2004). Il coinvolgimento delle subunità Kv7.2 è stato descritto anche nel rilascio dopaminergico dai sinaptosomi striatali di ratto: il rilascio di dopamina è inibito dalla retigabina che attiva i canali Kv7, mentre è favorito dai bloccanti TEA e XE991 che inibiscono la corrente M (Martire *et al*., 2007). Infine, una classe di farmaci definiti "*cognitive enhancers*", che comprende la linopiridina e l'XE991, favorisce il rilascio dei neurotrasmettitori in quanto agisce inibendo la corrente M e determinando depolarizzazione neuronale; tale meccanismo sembra essere associato ad effetti di miglioramento cognitivo (Zaczek *et al*., 1998).

In conclusione, la soppressione della corrente M porta all'abolizione delle funzioni appena descritte causando ipereccitabilità neuronale. Infatti, l'inibizione dei canali Kv7 favorisce l'accumulo degli stimoli eccitatori determinando la genesi del "*burts firing*" neuronale. Inoltre, la non funzionalità dei canali Kv7 causa la riduzione del valore soglia critico per l'insorgenza del potenziale d'azione e ciò ne facilita la propagazione.

Modulazione positiva della corrente M

Sulla base del ruolo chiave svolto dalla corrente M nel regolare l'eccitabilità neuronale, è fondamentale preservare la corretta funzionalità dei canali Kv7 a livello neuronale. A tale scopo, vi sono diverse molecole che aumentano l'espressione di tale corrente. Tra queste vi sono alcuni neurotrasmettitori, quali la somatostatina (Moore *et al*.,1988), la corticostatina (de Lecea *et al*., 1996) e la dinorfina (Madamba *et al*., 1999), che incrementano la corrente M a livello dell'ippocampo. In particolare, l'effetto indotto dalla somatostatina sembra coinvolgere il *pathway* della fosfolipasi A2-acido arachidonico probabilmente mediato dalla produzione della 5-lipossigenasi. La fosforilazione dei canali Kv7 è associata sia ad un effetto di forte inibizione della corrente M che ad un incremento della funzionalità dei canali Kv7, pertanto sono stati

osservati effetti di modulazione positiva indotti sia da specifiche fosfatasi che da alcune chinasi. Un esempio è rappresentato dalla fosfatasi 2A (PP2A) che contrasta la fosforilazione dei canali Kv7 mediata dalla glicogeno-sintasi chinasi 3β (GSK3β) (Borsotto *et al*., 2007), favorendo un aumento della funzionalità di tali canali. D'altro canto, è stato anche dimostrato che la proteina chinasi CK2, fosforilando il canale Kv7 legato alla CaM, facilita l'interazione di questa molecola al canale, determinando l'aumento dell'efficacia del PIP_2 e l'incremento dell'ampiezza della corrente (Zhang *et al*., 2014). Infine, l'attività dei canali Kv7.2/Kv7.3 è favorita anche dall'azione della protein chinasi A (PKA) che causa la fosforilazione del residuo di serina S52 presente all'N- terminale della subunità Kv7.2.

Un altro *pathway* di segnalazione che consente l'aumento della corrente M (in particolare, della corrente espressa dalle subunità Kv7.2/4/5) è legato all'incremento intracellulare della specie reattiva dell'ossigeno (ROS): infatti, l'ossidazione di tre residui di cisteina presenti all'interno del linker S_2-S_3 aumenta la probabilità di apertuta dei canali Kv7 (Gamper *et al*., 2006). In aggiunta, i ROS incrementano l'espressione della corrente M favorendo la metilazione dei residui di arginina della subunità Kv7.2 da parte dell'arginina metiltransferasi 1 (Prmt1), e ciò promuove l'interazione del canale Kv7.2 con il PIP_2 (Kim *et al*., 2016). Pertanto, questo studio suggerisce che la parziale metilazione dei residui di arginina nei canali Kv7 risulta essenziale per il mantenimento della corrente M basale. Dato il ruolo svolto dal PIP_2 come attivatore dei canali Kv7, è logico dedurre che specifiche chinasi, quale la fosfatidilinositolo-4-fosfato 5 chinasi (**PIP5K**), favorendo la sintesi del PIP_2, contribuiscano alla corretta funzionalità dei canali Kv7.

Recentemente è stato visto che a livello neuronale la β-secretasi BACE1 si associa ai canali della famiglia Kv7: è interessante notare che è l'interazione fisica, e non l'attività enzimatica della proteina BACE1, ad essere responsabile dello spostamento verso sinistra dell'attivazione voltaggio-dipendente di questi canali. Inoltre, è stato anche osservato un cambiamento nella cinetica del canale poiché l'attivazione è accelerata e la deattivazione è rallentata (Hessler *et al*., 2015). È stato altresì osservato che l'interazione di BACE1 con il canale, in concomitanza con un aumento dei livelli del PIP_2, provoca un maggiore spostamento verso sinistra dell'attivazione del canale.

Infine, la corrente elicitata dai canali eteromerici Kv7.2/Kv7.3 può essere incrementata da reagenti, quale l'n-etilmaleimide, che determinano l'alchilazione delle cisteine, (NEM) favorendo una maggiore probabilità di apertura del canale e lo *shift* della curva voltaggio-dipendente verso potenziali più negativi (Li *et al*., 2004).

Farmacologia dei canali Kv7

Data la loro ampia distribuzione in diversi organi e sistemi e la loro associazione con diverse malattie, i canali Kv7 sono importanti bersagli farmacologici per il trattamento di varie condizioni patologiche. Le molecole attive sui canali Kv7 possono agire come inibitori o attivatori. La riduzione dell'attività del canale Kv7 è responsabile di varie patologie umane associate all'aumento dell'eccitabilità, quale l'epilessia, l'aritmia e la sordità. Pertanto, la scoperta di composti che attivino i canali ionici voltaggio-dipendenti appare una strategia importante per l'intervento clinico in questi disturbi umani.

Attivatori

Flupirtina: è un'amminopiridina introdotta come farmaco analgesico per il dolore acuto e cronico. Nel 2013, a causa della sua tossicità epatica, l'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) ne ha limitato l'uso esclusivamente per il dolore acuto, per un tempo non superiore alle due settimane e solo per i pazienti che non possono usare altri farmaci antidolorifici.

Retigabina (N- [2-amino-4- (4-fluorobenzilamino) -fenil] carbammico etilestere): è la molecola attivatore meglio caratterizzata dei canali Kv7.2-5; il sito di legame della retigabina è formato da una tasca idrofobica situata tra le estremità citoplasmatiche del segmento transmembrana S_5-S_6 nelle configurazioni aperte dei canali. All'interno di questa cavità, un residuo di triptofano (Trp236 in Kv7.2 e Kv7.3, Trp242 in Kv7.4 e Trp235 in Kv7.5) nel segmento S_5 sembra giocare un ruolo cruciale per il legame della retigabina al canale (Wuttke *et al*. , 2005; Schenzer *et al*., 2005). Aminoacidi aggiuntivi (nella sequenza Kv7.2: Leu234 in S_5, Leu275 all'interno del *loop* interno del poro, Gly301 nel segmento S_6 e Leu299 in S_6 della subunità adiacente) sembrano essere coinvolti nella formazione dell'intero sito di legame della retigabina (Barrese *et al*.,

2010). Ad eccezione della Leu275, questi amminoacidi sono conservati in tutte le subunità Kv7 neuronali ma mancano nella subunità Kv7.1; l'assenza di questi residui conservati in Kv7.1 rende questo canale insensibile agli effetti della retigabina (Wuttke *et al*., 2005; Schenzer *et al*., 2005). Il meccanismo con cui tale farmaco induce un potenziamento della corrente I_{KM} è alquanto complesso e coinvolge una combinazione di due fattori: lo spostamento dell'attivazione voltaggio-dipendente di questi canali verso potenziali iperpolarizzati e l'aumento della loro probabilità di apertura (Tatulian *et al*., 2001; Miceli *et al*., 2008), con una leggera differenza di potenza e di massimo incremento della corrente tra le diverse subunità Kv7. Infatti, le subunità Kv7.2 e Kv7.3 sono maggiormente sensibili a questo farmaco (EC_{50} < 1.0 μM), mentre i canali Kv7.4 e Kv7.5 hanno una minore sensibilità (EC_{50} > 1.0 μM) (Barrese *et al*., 2010; Miceli *et al*., 2011).

Considerando il suo profilo farmacologico favorevole, nel 2011 la retigabina (il cui nome commerciale è "Trobalt" in Europa o "Potiga" negli Stati Uniti) è stata approvata dall'Agenzia Europea dei Medicinali e dalla Food and Drug Administration negli Stati Uniti come terapia aggiuntiva per pazienti affetti da convulsioni. Nonostante i suoi effetti benefici, gli studi successivi hanno rivelato la comparsa di reazioni avverse, come la ritenzione urinaria, la colorazione blu della pelle e la deposizione del pigmento nella retina. Quest'ultimo effetto è probabilmente dovuto alla fotodegradazione e all'ossidazione della retigabina in caso di esposizione a radiazioni UV o visibili, mentre la ritenzione urinaria è probabilmente dovuta all'ampia azione su tutti i canali Kv7: infatti, la retigabina è in grado di potenziare anche il canale Kv7.4 che si esprime nelle cellule muscolari lisce in cui la sua attivazione determina iperpolarizzazione della membrana, con conseguente riduzione del tono contrattile.

Questi effetti collaterali hanno limitato l'uso clinico della retigabina come farmaco antiepilettico: infatti, la produzione e la commercializzazione di questo farmaco sono state sospese da giugno 2017 (https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57fe4b6640f0b6713800000c/Trobalt_letter.pdf). Parallelamente, si stanno sperimentando nuovi composti che risultino più selettivi verso i canali Kv7.2 e Kv7.3 e che abbiano minori effetti tossici. Ad esempio, l'aggiunta del fluoro all'anello tri-amminofenilico della retigabina ha portato alla sintesi dell'**SF0034**: studi preclinici condotti su modelli animali hanno rivelato che l'SF0034 mostra una maggiore potenza

come farmaco anticonvulsivante e una minore tossicità rispetto alla retigabina. Infatti, l'SF0034 risulta meno attivo sui canali Kv7.4 e Kv7.5, riducendo gli effetti avversi causati dalla retigabina a causa dell'attivazione di questi canali. In aggiunta, l'SF0034 sembra essere chimicamente più stabile della retigabina e non causa la produzione dei metaboliti di colore blu (Kalappa *et al*., 2015).

Un altro analogo della retigabina è l'**RL648_81**, cioè etile (2-ammino-3-fluoro-4 - ((4-(trifluorometil) benzil) ammino) fenil) carbammato, che sembra essere 3 volte più potente dell'SF0034 e 15 volte più potente della retigabina nell'attivare i canali Kv7.2/Kv7.3. Sebbene non siano ancora disponibili dati preclinici, questo composto è un promettente candidato clinico per il trattamento dei disturbi neurologici associati ad ipereccitabilità neuronale (Kumar *et al*., 2016).

Il composto **R-L3** o **L-364 373** [(3-R) -1, 3-diidro-5- (2-fluorofenil) -3- (1H-indol-3-ilmetil) -1-metil-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one)] è un attivatore di canali Kv7.1. Da sottolineare è che l'effetto di R-L3 sui canali Kv7.1 si riduce quando la subunità Kv7.1 è coespressa con la sua subunità accessoria KCNE1 (Seebohm *et al*., 2003).

Il **BMS-204352** [(3S)-(+)- (5-cloro-2-metossifenil) -1,3-diidro-3-fluoro-6-(trifluorometil) -2H-indol-2-one) è un potente attivatore dei canali Kv7 con un EC_{50} di 2,4 μM per Kv7.5. Il BMS-204352 è in grado di attivare anche i canali Kv7.2, Kv7.2/Kv7.3 e Kv7.3/Kv7.4. Il BMS-204352 ha effetti ansiolitici, suggerendo la possibilità che i canali Kv7 possano essere modulati anche per il trattamento dell'ansia (Xiong *et al*., 2008).

I **fenamati**, inclusi l'acido meclofenamico e il diclofenac, sono attivatori relativamente potenti dei canali Kv7.2 e Kv7.3, con valori di EC_{50} rispettivamente di 25 e 2.6 μM. Questi composti causano uno spostamento verso valori più iperpolarizzati della curva di attivazione e rallentano la velocità di chiusura del canale. Inoltre, *in vivo* il diclofenac e l'acido meclofenamico mostrano forti proprietà antiepilettiche e sono ampiamente usati come farmaci antinfiammatori non steroidei agendo come inibitori non selettivi delle cicloossigenasi (Xiong *et al*., 2008). È stato dimostrato che un analogo del farmaco analgesico diclofenac, chiamato NH29, interagisce con un solco esterno situato all'interfaccia tra le eliche S_1, S_2 e S_4 del VSD dei canali Kv7.2, dove stabilizza l'interazione tra due residui conservati in S_2 (E130) e S_4 (R207) (Peretz *et al*., 2010).

Sebbene gli effetti farmacologici sui canali Kv7 siano osservati solo ad alte concentrazioni, queste molecole potrebbero essere utilizzate per lo sviluppo di nuovi composti modulatori dei canali Kv7, utili per il trattamento delle condizioni di ipereccitabilità neuronale, come l'emicrania, l'epilessia e il dolore neuropatico (Xiong *et al*, 2008).

L'**acrilammide**, quale l'acrilammide (S)-1 e (S)-2, è capace di attivare i canali Kv7 con diversa potenza, ad eccezione dell'isoforma Kv7.1 sulla quale è stato osservato un effetto inibitorio. Le acrilammidi (S)-1 e (S)-2 sono in grado di potenziare i canali Kv7.4 e Kv7.5 a tutti i potenziali di membrana testati. Al contrario, sui canali Kv7.2 o Kv7.2/Kv7.3 questi composti esplicano un duplice effetto: infatti, le correnti espresse da tali canali risultano incrementate a bassi potenziali, mentre ad alti potenziali si osserva un effetto inibitorio (Bentzen *et al*., 2006; Blom *et al*., 2009). Inoltre, l'acrilammide determina un significativo spostamento della curva di attivazione voltaggio-dipendente verso potenziali più negativi. L'acrilammide (S)-2 risulta più potente di quella (S)-1 (Blom *et al*., 2009).

Lo **zinco piritione** (ZnPy) o bis (1-idrossi-2 (1H) -piridineselonato-O, S) determina un forte potenziamento di tutti i canali Kv7, ad eccezione del canale Kv7.3. Lo ZnPy è ampiamente usato per il trattamento della psoriasi. Come la retigabina, l'effetto dello ZnPy sui canali Kv7 è sia quello di indurre uno spostamento iperpolarizzante della voltaggio-dipendenza che di aumentare l'ampiezza delle correnti elicitate dai canali Kv7 (Xiong *et al*., 2008; Gao *et al*., 2017).

Inibitori

Linopiridina: è uno dei primi composti inibitori ad essere stato identificato. Agisce inibendo la corrente I_{KM} e causando depolarizzazione neuronale e, quindi, un aumento dell'eccitabilità neuronale a cui segue il rilascio di neurotrasmettitori, quale l'acetilcolina. Per tale motivo, risulta potenzialmente utile per il trattamento delle malattie neurodegenerative causate da ridotto rilascio di neurotrasmettitori come la malattia di Alzheimer. Infatti, promuovendo il rilascio di acetilcolina, la linopiridina favorirebbe un miglioramento delle capacità di apprendimento in modelli animali con disfunzione cognitiva. Tuttavia, gli studi clinici sui pazienti con Alzheimer non hanno mostrato una chiara efficacia di questo composto (Zaczek *et al*., 1998). Il principale

problema della linopiridina (e anche di altri inibitori Kv7) è che non è in grado di discriminare tra le diverse isoforme della famiglia Kv7, essendo attivo anche sui canali cardiaci Kv7.1, sebbene con una potenza inferiore quando queste subunità co-assemblano con le subunità accessorie KCNE1.

XE991: poiché la linopiridina causa una serie di effetti tossici, tra cui i tremori, successivi studi hanno permesso di identificare un derivato a struttura antracenonica, ossia l'XE991. In esperimenti *in vivo* ed *in vitro*, tale composto risulta essere più potente della linopiridina nel bloccare le correnti mediate dai canali Kv7 e nell'indurre il rilascio di acetilcolina, e mostra anche una maggiore durata d'azione (Zaczek *et al*., 1998). Tuttavia, come la linopiridina, anche XE991 non è in grado di discriminare tra le diverse isoforme dei Kv7 (Wang *et al*., 2000).

Tetraetilammonio (TEA): i canali Kv7 mostrano una differente sensibilità farmacologica al TEA. Infatti, il canale Kv7.2 è altamente sensibile (IC_{50} = 0,3 mM), Kv7.3 è quasi insensibile al TEA (IC_{50} = 30 mM), mentre Kv7.1 e Kv7.4 mostrano una sensibilità intermedia (IC_{50} rispettivamente di 5 e 3 mM) (Hadley *et al*., 2000). L'alta sensibilità al TEA mostrata dalla subunità Kv7.2 è dovuta alla presenza di un residuo di tirosina (Y284) nel poro del canale, assente nelle altre subunità (Hadley *et al*., 2000).

Caratteristiche delle mutazioni identificate nei geni *kcnq2* o *kcnq3*

Molti geni implicati nelle forme epilettiche umane possono determinare una varietà di fenotipi epilettici che vanno da manifestazioni cliniche lievi a espressioni più gravi. Questo è anche il caso dei geni *kcnq2* e *kcnq3*. Le mutazioni trovate nel gene *kcnq2* possono causare sia forme di EE familiare neonatale (BFNE) che condizioni cliniche severe di encefalopatia epilettica associate a quadri clinici riconducibili alla sindrome di Ohtahara (Saitsu *et al*., 2012; Kato *et al*., 2013; Weckhuysen *et al*., 2013) e più raramente ad Encefalopatia Mioclonica Precoce e agli Spasmi Infantili (Samanta *et al*., 2014; Millichap *et al*., 2017).

Invece, mutazioni a livello del gene *kcnq3* sono sempre state associate a BFNE, ma recentemente mutazioni in questo gene sono state anche correlate a forme di EE con peggioramento neuropsicologico e cognitivo (Allen *et al*., 2013; Ambrosino *et al*., 2018) o a forme di disabilità intellettiva senza epilessia (Rauch *et al*., 2012; McRae *et al*., 2017) o di disabilità intellettiva accompagnata da epilessia e da cecità corticale

(Bosch *et al*., 2016). Quindi uno stesso gene è responsabile sia di una forma benigna (BFNE) che maligna (EE): tuttavia, non è mai stata riscontrata una sovrapposizione tra le forme benigne e maligne, ossia, il tipo di mutazione è determinante per il fenotipo e l'evoluzione della patologia. Il diverso fenotipo clinico potrebbe essere una conseguenza delle differenti alterazioni molecolari indotte dalle mutazioni. Infatti, studi *in vitro* condotti su sistemi eterologhi, come oociti di *X. laevis* e linee cellulari di mammifero, rivelano che le mutazioni associate a BFNE provocano effetti di perdita di funzione dei canali con alterazione della voltaggio-dipendenza e riduzione della densità di corrente, suggerendo che l'aploinsufficienza rappresenta il principale meccanismo patogenetico associato alle BFNE (Schroeder *et al*., 1998). Per quelle mutazioni che interessano il lungo dominio C-terminale intracellulare sono stati descritti ulteriori meccanismi patogenetici, come difetti nella stabilità della subunità (Soldovieri *et al*., 2006), cambiamenti nel *targeting* subcellulare (Chung *et al*., 2006) o alterazione della regolazione dei canali mediata da proteine modulatrici, come la CaM (Ambrosino *et al*., 2015) o la syx-1A (Soldovieri *et al*., 2014). Al contrario, per le varianti associate ad EE sono state osservate conseguenze più importanti sulla funzione del canale, quali effetti di dominanza-negativa (Miceli *et al*., 2013; Orhan *et al*., 2014), alterazioni della localizzazione subcellulare nel segmento iniziale dell'assone, alterazione nella regolazione del canale mediata dal PIP_2 o effetti con guadagno di funzione del canale (Miceli *et al*., 2015; Devaux *et al*., 2016; Millichap *et al*., 2016); tutti questi effetti sembrano contribuire alla gravità clinica del fenotipo. È importante sottolineare che le mutazioni associate ai differenti fenotipi clinici mostrano anche una differente localizzazione a livello della subunità Kv7.2 (Fig. 7): infatti, le mutazioni associate a BFNE sembrano essere distribuite lungo l'intera sequenza, al contrario, le mutazioni causative di EE sono concentrate in specifici domini del canale, come il segmento S_4, il poro, il dominio C-terminale dove si trovano i siti di legame al PIP_2 e alla CaM, e l'elica B, anch'essa coinvolta nel legame alla CaM (Millichap *et al*., 2016). Per quanto riguarda l'ereditarietà di queste malattie, le BFNE sono per definizione forme trasmissibili mediante uno schema di ereditarietà autosomico-dominante. Al contrario, le EE non sono trasmissibili e, solo raramente, sono stati riscontrati casi di mosaicismo, ossia i genitori del probando presentano un carico lesionale genetico basso tale da non sviluppare la malattia.

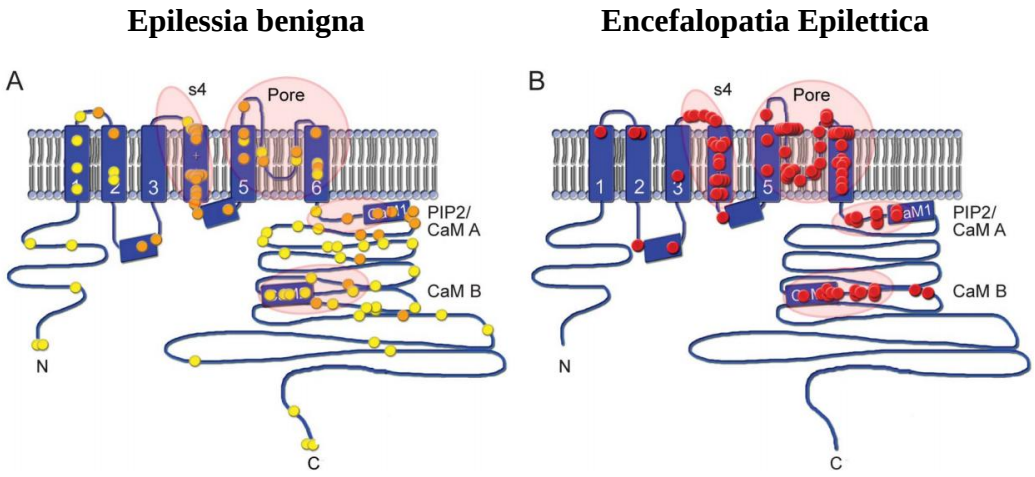

Figura 7. Distribuzione delle varianti nella subunità Kv7.2 causative di forme benigne di epilessia o di encefalopatia epilettica. Sulla sinistra (**A**), sono rappresentate le mutazioni riscontrate in condizioni benigne di epilessia quale la BFNE: tali mutazioni sono distribuite lungo l'intera sequenza peptidica. I simboli arancioni corrispondono a varianti missenso, mentre i simboli gialli rappresentano altri tipi di varianti, quali perdita del codone di inizio, inserzioni, delezioni, cambiamenti nella cornice di lettura o codoni di stop. Sulla destra (**B**), si osserva la distribuzione delle mutazioni causative di encefalopatia epilettica: sono solitamente sostituzioni di un singolo nucleotide (missenso) con conseguente cambiamento di un singolo amminoacido. Sono cerchiati i 4 domini critici per le varianti associate ad EE: il segmento S_4 del sensore del voltaggio, il poro, il dominio prossimale C-terminale a cui si legano il PIP_2 e la CaM e il dominio più distale che lega la CaM (da Millichap *et al*, 2016).

Il numero di varianti identificate nel gene *kcnq2* risulta maggiore (~180 varianti) rispetto a quello riscontrato per il gene *kcnq3* (~15 varianti) (www.rikee.org): solitamente le mutazioni che colpiscono il gene *kcnq2* possono essere missenso o non-senso, frameshift, con troncamento o associate a difetti nello splicing; al contrario, tutte le mutazioni identificate nel gene *kcnq3* sono missenso. Nella maggior parte dei casi riportati in letteratura (85-90%), le mutazioni causano una perdita di funzione del canale (*loss-of-function*); invece, le mutazioni con effetto di guadagno di funzione (*gain-of-function)* sono meno frequenti (10-15%), ma sono solitamente associate a fenotipi più gravi.

Pertanto, comprendere i meccanismi patogenetici alla base dell'EE è molto importante per identificare nuovi bersagli farmacologici: infatti, uno dei principali problemi nel trattamento di questo disturbo epilettico è che le convulsioni sono spesso resistenti ai tradizionali farmaci antiepilettici sia di vecchia che di nuova generazione. Attualmente, il trattamento di prima linea per l'EE e per le BFNE consiste nella somministrazione di carbamazepina o fenitoina (bloccanti dei canali del Na^+) (Pisano *et al*., 2015; Sands *et*

al., 2016); inoltre, alcuni pazienti sembrano rispondere al trattamento con topiramato (attivo sui canali Ca^{2+}) e con leveritacetam (legante la proteina vescicolare SV2A) (Pisano *et al*., 2015). L'importante funzione dei canali Kv7 nell'eccitabilità neuronale, così come il ruolo patogenetico delle mutazioni riscontrate nei canali Kv7.2 e Kv7.3 associate a gravi forme di EE, ha portato a considerare questi canali come importanti bersagli farmacologici.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della presente Tesi di Dottorato è stato quello di investigare sulle conseguenze funzionali e farmacologiche e sui meccanismi molecolari associati alla presenza di specifiche mutazioni nei geni *kcnq2* o *kcnq3* responsabili di una grave condizione clinica definita Encefalopatia Epilettica (EE). Nello specifico, in collaborazione con diversi gruppi di pediatri e neurologi italiani, abbiamo studiato i canali Kv7.2 o Kv7.3 incorporanti le seguenti mutazioni:

Gene	Sostituzione nucleotidica	Sostituzione amminoacidica	Referenze
kcnq2	c.973A>G	p.R325G	● Weckhuysen *et al*., 2013 ● Numis *et al*., 2014
kcnq3	c.1075G>T	p.V359L	Collaborazione con il Dott. Jacopo DiFrancesco (Istituto Besta di Milano)
kcnq3	c.1624G>A	p.D542N	Collaborazione con il Dott. Jacopo DiFrancesco (Istituto Besta di Milano)
kcnq2	c.1687 G>A	p.D535N	● Weckhuysen et al., 2013 ● Milh et al., 2015
kcnq2	c.928G>A	p.G310S	Collaborazione con il Dott. Jacopo DiFrancesco (Istituto Besta di Milano)

Tabella 1. Elenco delle mutazioni studiate nel presente lavoro di Dottorato con relativa indicazione del gene in cui sono state riscontrate e della sostituzione nucleotidica ed amminoacidica corrispondente. "c" indica la sostituzione nucleotidica, "p" indica la sostituzione amminoacidica.

Alcune di queste mutazioni in studio sono state classificate in un nuovo database informatico, disponibile gratuitamente, chiamato *Rational Intervention for KCNQ2/3 Epileptic Encephalopathy* (RIKEE; www.rikee.org); anche il nostro gruppo di ricerca ha contribuito alla costruzione di tale raccolta di informazioni riguardanti le varianti nei geni *kcnq2* e *kcnq3* ed i loro possibili effetti patologici.

Nel capitolo dei Risultati i dati ottenuti saranno divisi in tre distinte sezioni sulla base della specifica mutazione o del gruppo di mutazioni studiate, così come riportato:

- mutazione **Kv7.2 R325G**, identificata in tre soggetti con EE precedentemente riportati (Weckhuysen *et al*., 2013; Numis *et al*., 2014) ed in un quarto soggetto con sindrome di Kleefstra (Marchese *et al*., 2016). Dal punto di vista clinico, i pazienti affetti da EE portatori di questa mutazione mostrano crisi epilettiche sin dai primi giorni di vita ed un grave ritardo psicomotorio. Sotto l'aspetto neurologico si riscontra ipotonia assiale, quadriplegia, assenza di linguaggio e rigidità del capo. Il trattamento con oxcarbazepina/carbamazepina ha apportato parziali benefici. I risultati derivati da questo studio sono stati oggetto di pubblicazione da parte del nostro gruppo di ricerca durante il periodo di Dottorato (Soldovieri *et al*., 2016).

- in collaborazione con il gruppo del Dott. DiFrancesco dell'Istituto Besta di Milano abbiamo identificato due mutazioni nel gene *kcnq3* riscontrate in un soggetto con EE in eterozigosi composta (**Kv7.3 V359L/Kv7.3 D542N**), ciascuna ereditata da un genitore clinicamente asintomatico. Il probando portatore delle mutazioni Kv7.3 V359L e Kv7.3 D542N è una bambina di 7 anni nata da una gravidanza senza complicazioni e da genitori sani non consanguinei. Le convulsioni si sono presentate un giorno dopo la nascita e sono state caratterizzate da deviazione della testa, retroversione degli occhi, ipertonia in flessione degli arti superiori e pianto prolungato. Le convulsioni sono frequenti, spesso con cadenza giornaliera. L'esame obiettivo ha rivelato una grave compromissione neurologica sin dalle prime fasi dello sviluppo, contraddistinta da disabilità visiva, tetraparesi spastica con ipertonia diffusa e iperreflessia. Il trattamento con vitamina B6, fenobarbital e vigabatin non ha arrecato benefici. All'età di 2 anni, il paziente ha mostrato un grave ritardo cognitivo, incapacità di elaborare un discorso e tetraparesi diffusa. Per quanto concerne l'anamnesi familiare, non è stata riscontratta alcuna storia di epilessia o di altre patologie neurologiche; tutti gli altri membri della famiglia risultano asintomatici e mostrano un normale sviluppo psicomotorio.

Il residuo D542 studiato nel canale Kv7.3 corrisponde al residuo D535 nell'isoforma "c" del canale Kv7.2. La variante Kv7.2 D535N è stata recentemente descritta in tre casi sporadici (non familiari) con epilessia neonatale e ritardo dello sviluppo (Weckhuysen *et al*., 2013; Milh *et al*., 2015). Pertanto, sono state studiate anche le possibili differenze funzionali associate alla stessa variante nei canali Kv7.2 e Kv7.3. La maggior parte dei dati ottenuti dallo studio di queste mutazioni sono stati oggetto di pubblicazione nel corso del periodo di Dottorato (Ambrosino *et al*., 2018).

- mutazione **Kv7.2 G310S** riscontrata *de novo* in un paziente con EE ed identificata in collaborazione con il gruppo del Dott. DiFrancesco**.** Il probando portatore di tale mutazione è una bambina che ha manifestato le convulsioni sin dal primo giorno di vita, sia in veglia che durante il sonno. Le crisi epilettiche si presentavano frequentemente (plurigiornaliere) ed erano inizialmente focali, poi sono diventate generalizzate, di tipo tonico, accompagnate da spasmi. Dal punto di vista neurologico mostra un grave ritardo cognitivo e tetraparesi diffusa. La terapia con levetiracetam e acido valproico non ha apportato rilevanti miglioramenti, in quanto il probando continua a manifestare un costante ed elevato numero di crisi giornaliere.

Come si può osservare in Fig. 8, le varianti in studio sono principalmente localizzate a livello del dominio C-terminale del canale Kv7.2 o Kv7.3, eccetto per la mutazione G310S presente nel segmento S_6 della subunità Kv7.2.

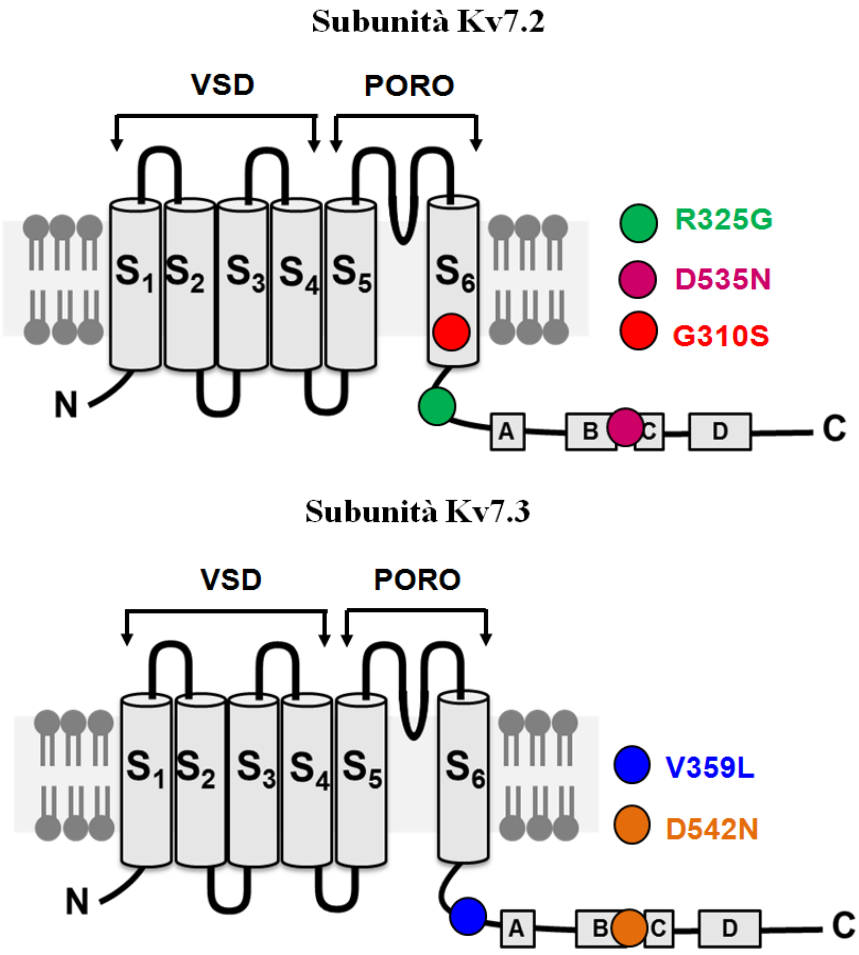

Figura 8. Rappresentazione schematica di una subunità Kv7.2 o Kv7.3 in cui è mostrata la localizzazione delle mutazioni oggetto di questo studio. I cerchi colorati indicano la posizione delle mutazioni investigate. Per le mutazioni che interessano la subunità Kv7.2, la numerazione si riferisce all'isoforma "c" del canale.

Per studiare le conseguenze biochimiche, funzionali e farmacologiche causate da queste mutazioni sono stati condotti i seguenti esperimenti:

1. ingegnerizzazione di ciascuna mutazione in plasmidi codificanti per le subunità Kv7.2 (isoforma c) o Kv7.3;
2. registrazioni di elettrofisiologia per valutare la corrente espressa da cellule di ovaio di criceto cinese (CHO) trasfettate con le subunità Kv7.2 o Kv7.3 *wild-type* o mutanti, in configurazione omomerica o eteromerica, ossia in co-espressione con le subunità Kv7.2/Kv7.3 *wild-type*;
3. valutazione dell'espressione totale o di membrana dei canali mutanti non funzionali;

4. registrazioni di elettrofisiologia in presenza di inibitori, quale il TEA, per verificare se le subunità mutanti si incorporano correttamente nei canali eteromerici, o di attivatori, come la retigabina, per valutare la possibilità di contrastare l'alterazione indotta dai canali mutanti non funzionali;
5. studi di *homology modelling* per comprendere, dal punto di vista strutturale, se il residuo mutato è presente in uno specifico sito di legame per determinate molecole regolatorie (PIP_2, CaM) e quindi individuare il motivo per cui i canali mutanti risultano non funzionali;
6. identificazione dei possibili fattori molecolari coinvolti e valutazione della possibilità di recuperare la funzionalità del canale mutante ripristinando i *pathways* biochimici modificati dalla presenza di specifiche mutazioni.

Nel complesso, tali studi permetteranno di comprendere quali sono gli effetti funzionali causati dalle mutazioni in studio, di individuare i meccanismi cellulari che risultano modificati dalla presenza di tali mutazioni e di valutare l'efficacia di strategie farmacologiche atte a ripristinare la funzionalità dei canali Kv7.2 o Kv7.3 mutati.

3. MATERIALI E METODI

Mutagenesi sito-diretta

Le mutazioni di interesse sono state ingegnerizzate nel vettore pcDNA3.1 contenente il cDNA codificante per le subunità Kv7.2 o Kv7.3 (*Agilent Technologies, Milano, Italia*) attraverso la tecnica di mutagenesi sito-diretta basata sulla reazione a catena della polimerasi (PCR), detta *QuikChange*. In particolare, le mutazioni R325G, D535N e G310S sono state ingegnerizzate nel cDNA codificante per l'isoforma umana di tipo c del canale Kv7.2 (numero di accesso NM 004518.4; 844 amminoacidi). Le mutazioni sono state inserite in ciascun plasmide attraverso la tecnica della PCR, usando una coppia di primer (*forward* e *reverse*) incorporante la sostituzione nucleotidica riscontrata nel paziente. Le reazioni di amplificazione sono state realizzate in un volume finale di 50 µl contenente 50-100 ng di plasmidi per i canali Kv7.2 o Kv7.3 *wt*, 0.6 µg di primer forward, 0.6 µg di primer reverse, 1 U di Q5 DNA polimerasi *(NEB; New England Biolabs, Regno Unito)* e 0.2 mM dNTP mix, diluiti nel buffer di reazione ottimizzato per tale polimerasi. Il protocollo di amplificazione utilizzato prevedeva 3 fasi (Fig. 9), ripetute per 30 cicli: denaturazione del DNA a doppia elica (95°C per 1 min), appaiamento dei primer con il singolo filamento di DNA (per questo step la temperatura è stata modificata opportunamente sulla base della sequenza nucleotidica di ogni coppia di primer) ed estensione dei primer (73°C per 5 min).

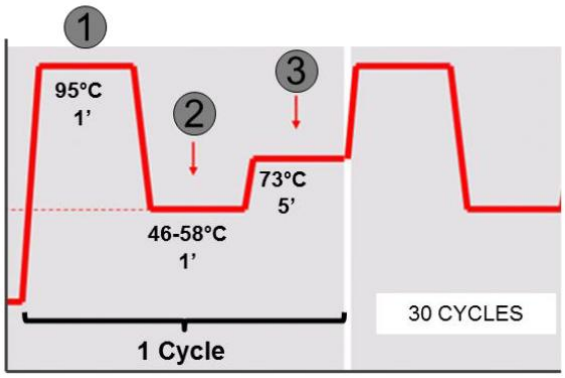

Figura 9. Protocollo della reazione a catena della polimerasi. La PCR consiste di 3 fasi. Fase 1: denaturazione del DNA; Fase 2: allineamento dei primer mutati alla sequenza complementare del DNA; Fase 3: la polimerasi sintetizza un nuovo filamento di DNA complementare al filamento stampo.

Trasformazione batterica e preparazione del DNA plasmidico

Il volume derivante dalla reazione di amplificazione conteneva sia il DNA metilato (parentale) che quello non metilato (di nuova sintesi); pertanto, al fine di rimuovere il DNA parentale, è stata effettuata una digestione enzimatica con l'enzima DpnI (*NEB*; 20 U di enzima diluito nel buffer ottimizzato per la digestione, lasciata 1 h a 37°C) capace di digerire solo il DNA metilato. In seguito alla digestione enzimatica, i prodotti della PCR sono stati trasformati in cellule *E. coli* DH5-α mediante il metodo della trasformazione chimica (30' a 4°C, shock termico a 42°C per 45'' seguito da 2' a 4°C).

Per favorire il recupero dei batteri che hanno subito lo shock termico, le cellule sono state incubate con il mezzo SOC (2% triptone, 0.5 % estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucosio) per 1 h a 37°C. Infine, le cellule sono state trasferite in piastre con LB + agar (contenenti 10 g/L triptone, 5 g/L estratto di lievito, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar) e con uno specifico antibiotico al quale i plasmidi sono resistenti, quale l'ampicillina (Amp), allo scopo di consentire solo la crescita selettiva di cellule *E. coli* trasformate con i plasmidi pcDNA3.1 in cui sono presenti i cDNA per Kv7.2 o Kv7.3. Infine, per favorire la crescita batterica, le piastre (capovolte) sono state incubate a 37°C per circa 16 h.

Ogni colonia cresciuta nel mezzo LB è stata inoculata in 6 ml di mezzo LB fresco contenente l'antibiotico selettivo Amp a 37°C/220 rpm per circa 16 h. In seguito, il DNA plasmidico è stato estratto attraverso un kit disponibile in commercio (*NucleoSpin Plasmid EasyPure, Promega, Milano, Italia*). Il successivo sequenziamento (*Eurofins Genomic, Milano, Italia*) di una parte del cDNA codificante comprendente il residuo da mutare ha permesso di verificare se la mutazione di interesse fosse stata inserita correttamente. Al fine di ottenere una maggiore quantità di DNA, uno dei cloni risultati positivi è stato amplificato su larga scala (500 ml) ed il DNA plasmidico è stato estratto mediante un kit commercialmente disponibile (*PureYield Plasmid Maxiprep System, Promega*). Infine, il cDNA ottenuto è stato sequenziato per confermare la presenza della mutazione di interesse e per escludere la presenza di ulteriori mutazioni nell'intera sequenza codificante.

Colture cellulari e trasfezioni con Lipofectamina 2000

Cellule di ovaio di criceto cinese (CHO, *Chinese Hamster Ovary*) sono state cresciute in terreno DMEM (*Dulbecco's Mimimum Eagle Medium, Sigma, Milano, Italia*) contenente 10% di Siero Fetale Bovino (FBS) decomplementato (mediante riscaldamento a 56°C per 30 min), 1% L-Glutammina (2 mM in 0,85% NaCl) ed 1% Penicillina/Streptomicina (100 U/mL). Ogni 2-3 giorni le cellule venivano staccate dalla piastra madre mediante tripsina e trasferite in piastre con mezzo fresco. Le cellule sono state coltivate in atmosfera umidificata alla temperatura di 37°C con 5% CO_2 in piastre Petri da 60 mm o da 40 mm, a seconda delle specifiche necessità sperimentali. Per gli esperimenti di elettrofisiologia le cellule CHO sono state piastrate a bassa confluenza (circa 70-80%) su capsule Petri da 40 mm contenenti vetrini (*Microtech, Napoli, Italia)* sterilizzati in etanolo al 70% e successivamente al calore (4 h a 180°C), e poi trattati con poli-L-lisina 100 μg/ml (*Sigma-Aldrich, Milano, Italia*) allo scopo di favorire l'adesione cellulare. Per gli esperimenti di *western-blotting*, le cellule CHO sono state piastrate su capsule Petri da 60 mm. Dopo 24 h, le cellule sono state trasfettate con il cDNA codificante per il canale Kv7.2 o Kv7.3 mediante l'utilizzo di Lipofectamina 2000 (*Life Technologies, Milano, Italia)* secondo il protocollo consigliato dalla casa produttrice. La quantità totale di cDNA utilizzato nella miscela di trasfezione è stata mantenuta costante a 4 o 6 μg rispettivamente per gli esperimenti di elettrofisiologia o di biochimica; come controllo dell'avvenuta trasfezione è stato utilizzato un plasmide codificante per un'isoforma della proteina fluorescente verde (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein, Clonetch, CA, USA*).

Registrazioni di elettrofisiologia attraverso la tecnica del *patch-clamp*

Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati condotti dopo 24 h dalle trasfezioni e le correnti prodotte dalle cellule CHO esprimenti i canali Kv7.2 o Kv7.3, in forma *wild-type* o incorporante specifiche mutazioni, sono state registrate a temperatura ambiente utilizzando la tecnica del *patch-clamp* in configurazione *whole-cell*. Sono state utilizzate micropipette di vetro aventi una resistenza di 3-5 MΩ quando riempite con una soluzione intracellulare contenente: 140 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM Mg-ATP, pH 7.4 (corretto con KOH). La soluzione extracellulare,

invece, contiene: 138 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Glucosio, 10 mM HEPES, pH 7.4 (aggiustato con NaOH).

I dati sono stati acquisiti ed analizzati mediante l'utilizzo di un amplificatore commercialmente disponibile Axopatch 200A (*Molecular Devices, Union City, CA, USA*) e del pacchetto pCLAMP (versione 10.2; *Molecular Devices, Union City, CA, USA*). La capacità della cellula (*C*), usata come riferimento per misurare la grandezza di ciascuna cellula registrata e quindi per normalizzare l'intensità di corrente misurata, veniva determinata misurando l'integrale della curva ottenuta calcolando i transienti capacitivi, evocati da brevi stimoli della durata di 5-10 ms in cui il potenziale veniva modificato da -80 a -75 mV, tenendo spento il circuito di compensazione.

Per gli esperimenti farmacologici, in cui sono stati utilizzati il TEA o la retigabina (ottenuti da *Valeant Pharmaceuticals, Aliso Viejo, CA, USA*), le correnti venivano monitorate utilizzando un protocollo di rampa (Fig. 10) in cui il potenziale veniva modificato da -80 mV a +0 mV in 3 s, alla frequenza di 0.1 Hz. Per cambiare rapidamente la soluzione (< 1 s) di interesse è stato usato un controller di flusso, il cFlow 8, collegato a un apparecchio a otto valvole, detto cF-8VS (*Cella MicroControls, Norfolk, VA, USA*). Gli effetti indotti dai farmaci sono stati calcolati allo stato stazionario, dopo 1-2 min di applicazione del farmaco ed espressi come percento dell'intensità di corrente misurata nella soluzione di controllo.

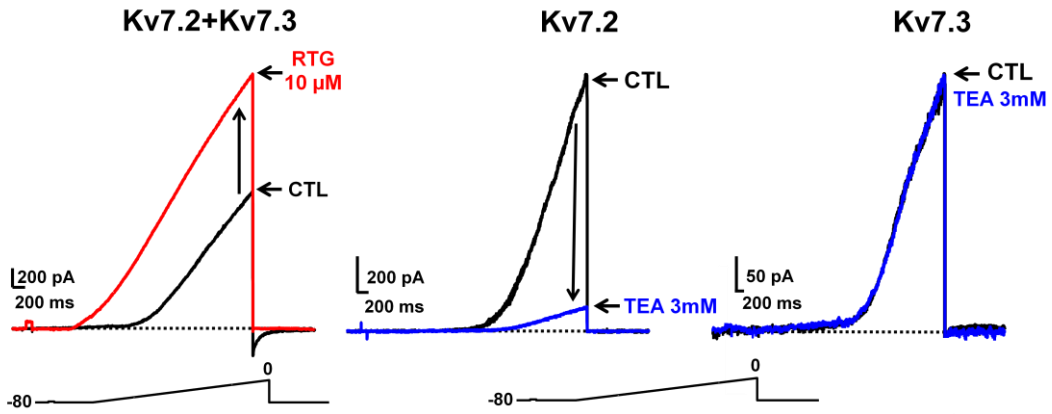

Figura 10. Effetti funzionali associati a composti modulatori dei canali Kv7, usando il protocollo di rampa. Sulla sinistra è mostrato l'effetto di indotto dall'attivatore retigabina (traccia rossa), invece al centro e sulla destra sono rappresentati gli effetti associati al TEA sul canale Kv7.2 o Kv7.3 rispettivamente (tracce blu). Il protocollo di voltaggio usato è mostrato in basso.

Per ottenere le curve voltaggio-dipendenti, le correnti venivano misurate utilizzando un classico protocollo di voltaggio che prevedeva un potenziale di mantenimento a -80 mV, al quale il canale è chiuso. Successivamente, venivano applicati step depolarizzanti per 1.5 s da -80 a +40 mV (che incrementavano di 10 mV per ogni step) con cui è stato possibile misurare l'attivazione voltaggio-dipendente del canale. A questo punto, veniva applicato un potenziale di 0 mV della durata di 300 ms, al quale è stato possibile misurare le proprietà delle correnti espresse dal canale allo stato stazionario (Fig. 11). I valori registrati all'inizio del *pulse* di 0 mV sono stati misurati, normalizzati ed espressi in funzione del potenziale applicato nello step precedente: l'analisi delle correnti a tale potenziale permetteva quindi di descrivere la voltaggio-dipendenza del canale e di misurarne il potenziale di emiattivazione (o $V_{½}$). I dati ottenuti sono stati adattati alla distribuzione di Boltzmann secondo la seguente formula:

$$y = max / [1 + exp (V_{½} - V) / k]$$

dove V è il potenziale applicato, $V_{1/2}$ è il potenziale di emiattivazione e k è la pendenza della curva.

La densità di corrente (espressa in pA/pF) veniva calcolata come picco della corrente (pA) espressa a 0 mV diviso la capacità (C) della stessa cellula (pF).

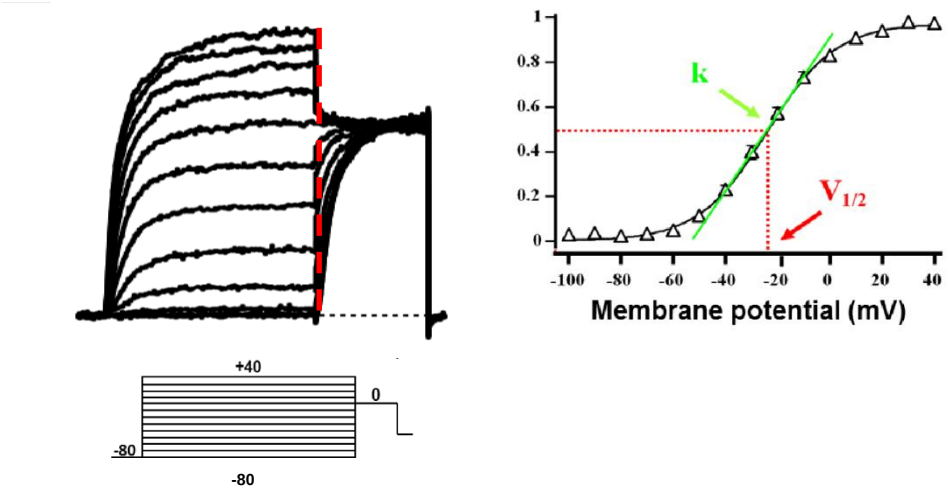

Figura 11. Protocollo i/V e metodo per la quantizzazione. Sulla sinistra si osserva una traccia rappresentativa ottenuta applicando il protocollo di voltaggio indicato in basso. Sulla destra, è rappresentata la curva corrente/voltaggio ottenuta fittando i dati sperimentali intersecati dalla linea tratteggiata rossa mediante distribuzione di Boltzmann.

In esperimenti in cui è stata utilizzata la fostatasi voltaggio-dipendente DrVSP (*Danio rerio voltage-sensing phosphatase*) è stato applicato un potenziale di 0 mV della durata di 1.5" per attivare le correnti espresse dai canali Kv7, seguito da uno step di +100 mV dalla durata variabile (da 0.2" a 2", con un incremento di 0.2") necessario per l'attivazione della fosfatasi, e da un secondo step a 0 mV che determinava lo spegnimento della fosfatasi ed il recupero della corrente elicitata dai canali Kv7 (25") (Fig. 12). L'inibizione tempo-dipendente della corrente è stata quantizzata come rapporto tra la corrente misurata all'inizio del secondo step a 0 mV (dopo l'attivazione della fosfatasi) e la corrente misurata alla fine del primo step a 0 mV (prima dell'attivazione della fosfatasi), espressa in funzione della durata del *pulse* a +100 mV. Invece, il recupero della corrente espressa dai canali Kv7 è stato quantizzato normalizzando i valori di corrente registrati durante l'intera durata del secondo step a 0 mV, rispetto alla corrente misurata alla fine del primo *pulse* a 0 mV. La cinetica di inibizione della corrente in seguito ad attivazione della DrVSP e del recupero della stessa dopo inattivazione della fosfatasi è stata misurata fittando le tracce con una singola funzione esponenziale sulla base della seguente formula:

$$y = amp \times e\,(-t/\tau) + c$$

dove τ era la costante di tempo della funzione.

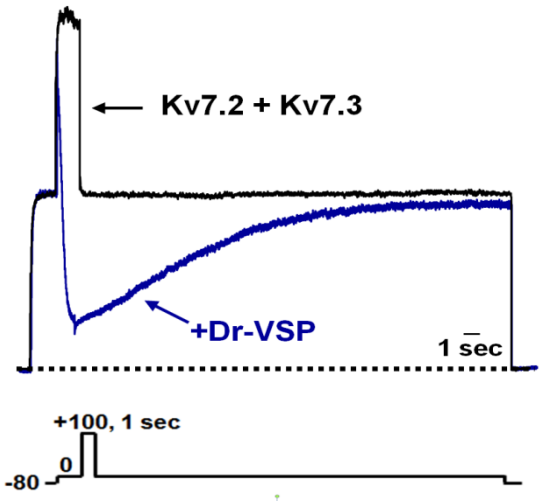

Figura 12. Meccanismo di azione della fosfatasi DrVSP. Rappresentazione del meccanismo di azione della fostatasi in risposta al protocollo di voltaggio, mostrato in basso. Si osserva sia l'inibizione della corrente che il successivo recupero.

In alcuni esperimenti è stato utilizzato il plasmide codificante per Kv7.3 A315T, anche chiamato Kv7.3*, in cui tale mutazione a livello del poro del canale consente di incrementare la corrente espressa da Kv7.3 (Zaika *et al*., 2008; Gómez-Posada *et al*., 2010). Inoltre, altri esperimenti sono stati condotti con il plasmide Kv7.2 Y284C, ossia un mutante del poro che rende il canale Kv7.2 insensibile al bloccante TEA. L'utilizzo di questi plasmidi ha favorito una maggiore comprensione di alcuni risultati e ha fornito un'ulteriore conferma dei dati ottenuti con i plasmidi codificanti per Kv7.2 o Kv7.3 *wt*.

Biotinilazione delle proteine di membrana e Western Blotting

Per gli esperimenti di *western-blotting*, sono state piastrate circa 250.000 cellule CHO su ciascuna capsula Petri da 60 mm e, dopo 24 h, le cellule sono state trasfettate con 6 µg totali di cDNA (5 µg di canale Kv7.2 o Kv7.3 *wt* o mutante + 1 µg di EGFP). Un giorno dopo la trasfezione, per gli esperimenti di biotinilazione, le cellule sono state trattate per 30' a temperatura ambiente (RT) con Sulfo-NHS-LV-Biotin (*Pierce, Erembodegem-Aalst, Belgio*), un reagente che, essendo impermeabile alla membrana cellulare, consente di marcare solo le proteine presenti sulla membrana plasmatica (Fig. 13). Quindi, sono stati effettuati tre lavaggi con PBS (Phosphate Buffer Saline) addizionato con 100 mM di glicina al fine di rimuovere l'eccesso di biotina. Per gli esperimenti di biotinilazione, le cellule sono state lisate con CMF-buffer contenente (in mM): 120 NaCl, 50 KCl, 50 NaF, 20 Tris-HCl pH 7.5, 10 EDTA, 2% Triton, 2 DTT e 1X inibitori di proteasi *(Roche, Milano, Italia)*. Una stessa quantità di lisato cellulare è stata fatta reagire con biglie di streptavidina (*Pierce*) per 30' a 4°C allo scopo di consentire il legame della biotina alla superficie delle biglie magnetiche. Le biglie, legate alle proteine di membrana, sono state separate e raccolte mediante un supporto magnetico; il surnatante, invece, è stato usato come lisato totale.

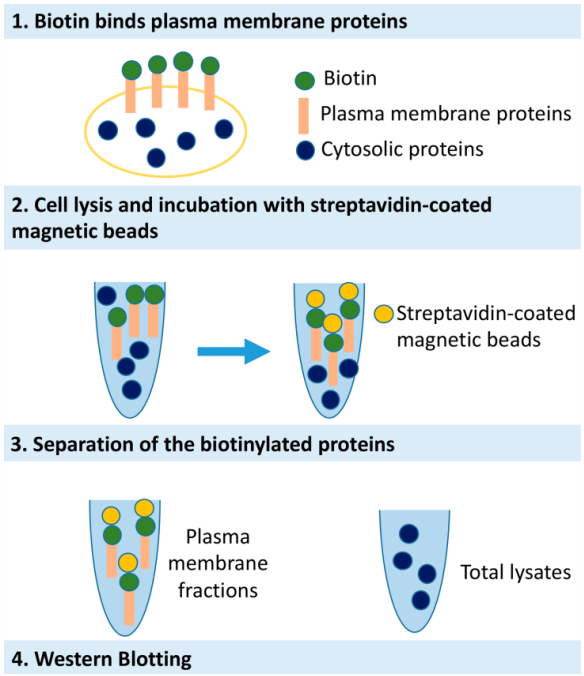

Figura 13. Rappresentazione schematica della tecnica di biotinilazione.

Dopo il passaggio della biotinilazione, il volume totale delle proteine di membrana ed una uguale quantità di lisato totale proveniente dai differenti campioni sono stati separati elettroforeticamente a RT su gel di poliacrilammide (*SDS-PAGE*) al 7% in tampone di corsa (contenente 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS) fino alla completa separazione del marcatore proteico caricato in parallelo (*Biorad, Milano, Italia*). In seguito, le proteine sono state trasferite su membrane di polivinilidenfluoruro (PVDF, *Biorad, Milano, Italia*) in tampone di trasferimento (contenente 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanolo). Le membrane PVDF sono state incubate per 1 h a RT con caseina al 5% (5% di caseina sciolta nella soluzione PBS-Tween) allo scopo di ridurre il segnale di fondo aspecifico; successivamente tali filtri sono stati incubati con gli anticorpi primari: *mouse monoclonal* anti-Kv7.2 (1:500; clone N26A/23, Antibodies Inc., Davis, CA) o *rabbit policlonal* anti-Kv7.3 (1:500; clone APC-051; Alomone, Gerusalemme, Israele) per 16 h a 4°C. In parallelo, le membrane sono state incubate con anticorpi *mouse monoclonal* anti-tubulina (1:5000; Sigma Aldrich, Milano, Italia) come controllo interno (per verificare che fosse stata caricata la medesima quantità di lisato totale e come proteina *housekeeping* verso la quale normalizzare l'intensità dell'espressione delle proteine in studio). Successivamente, l'eccesso di anticorpo

primario è stato rimosso mediante lavaggi in PSB-Tween per 30' e le membrane venivano quindi incubate per 1 h a RT con anticorpi secondari anti-mouse o anti-rabbit (diluizione 1:5.000; *GE Healthcare, Little Chalfont, Regno Unito*).
Gli anticorpi secondari erano coniugati a perossidasi (HRP, horseradish peroxidase) che consente l'emissione di luce in presenza di un reattivo chemiluminescente (*ECL, Promega, Madison, WI, USA*): tale segnale luminoso veniva quindi catturato su lastre autoradiografiche. L'analisi delle immagini è stata effettuata mediante il software *ImageLab* (*Biorad, Milano, Italia*).

Modello Molecolare

I modelli tridimensionali delle subunità Kv7.2 o Kv7.3 sono stati generati mediante la tecnica bioinformatica dell'*homology modelling*, come precedentemente descritto (Miceli *et al*., 2013). In particolare, tali modelli sono stati ottenuti ed analizzati sia adoperando il modulo DeepView del software Swiss-PDBViewer (versione 4.1, disponibile su http://www.expasy.ch/spdbv/), che utilizzando il programma PyMOL (*DeLano Scientific, Palo Alto, California, USA*; disponibile alla pagina http://pymol.sourceforge.net/). I modelli sono stati generati a partire dal cristallo del dominio prossimale C-terminale della subunità Kv7.1 (Sachyani *et al*., 2014) che include anche le eliche A e B.
Il modello è stato poi allineato alla struttura cristallina dei canali Kir2.2 legati a diC8-PIP_2 (Hansen *et al*., 2011), usando il *tool Chimera matchmarker* (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/docs/ContributedSoftware/matchmaker/matchmaker.html); le coordinate cristallografiche della molecola di PIP_2 sono state poi trasferite nel modello della subunità Kv7.2 o Kv7.3.

Analisi Statistica

I dati sono stati espressi come il valore medio ± l'errore standard medio (MEDIA±E.S.M.). Ogni dato è espresso come MEDIA±E.S.M. di almeno 4 determinazioni. Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state valutate con il test *t* di *Student* o con quello ANOVA seguito dal test *Student-Newman-Keuls*. Le differenze venivano considerate statisticamente significative quando $p<0.05$.

4. RISULTATI

I risultati relativi allo studio delle possibili conseguenze funzionali, biochimiche, farmacologiche indotte dalle mutazioni in studio sono stati divisi sulla base delle differenti mutazioni identificate in collaborazione con diversi gruppi di pediatri e neurologi italiani; pertanto saranno descritte tre sezioni di risultati riguardanti le seguenti mutazioni:

- **Sezione 4.1**: la mutazione **Kv7.2 R325G** identificata in tre soggetti con EE ed in un quarto soggetto con sindrome di Kleefstra;
- **Sezione 4.2**: due varianti in eterozigosi composta nel gene *kcnq3* riscontrate in un soggetto con EE (**Kv7.3 V359L/Kv7.3 D542N**), ciascuna ereditata da un genitore clinicamente asintomatico; e la mutazione Kv7.2 D535N, corrispondente alla variante Kv7.3 D542N, recentemente descritta in tre casi sporadici (non familiari) con epilessia neonatale e ritardo dello sviluppo;
- **Sezione 4.3**: la mutazione **Kv7.2 G310S** riscontrata *de novo* in un paziente con EE.

4.1 STUDIO DELLA MUTAZIONE Kv7.2 R325G

La mutazione Kv7.2 R325G è stata identificata in tre soggetti con EE e grave ritardo nello sviluppo. Inoltre, la stessa variante è stata anche riscontrata in un quarto soggetto con sindrome di Kleefstra (Marchese *et al*., 2016), un disordine genetico caratterizzato da disabilità intellettuale, capacità di linguaggio assente o limitata, ipotonia, sinofria, ipertelorismo e microcefalia. Gli studi funzionali, biochimici e farmacologici condotti sono stati finalizzati all'identificazione del meccanismo molecolare causativo della patologia e all'individuazione di nuove strategie terapeutiche per il trattamento dei pazienti in studio.

4.1.1 Caratterizzazione biochimica e funzionale dei canali omomerici ed eteromerici incorporanti la mutazione Kv7.2 R325G

Allo scopo di studiare le possibili alterazioni funzionali indotte dalla mutazione Kv7.2 R235G, sono state condotte registrazioni di elettrofisiologia su cellule CHO trasfettate con il plasmide codificante per il canale Kv7.2 *wild-type* (*wt*) o mutato. Com'è possibile osservare in Fig. 14a, il canale omomerico Kv7.2 *wt*, usato come controllo, esprimeva una robusta corrente uscente (38.0 ± 0.4 pA/pF) che si attivava intorno a -40 mV, saturava a circa 0/20 mV e mostrava una lenta cinetica di attivazione e deattivazione, senza inattivazione. Al contrario, il canale omomerico Kv7.2 R325G non esprimeva correnti significativamente superiori ai livelli di corrente basali misurati con lo stesso protocollo in cellule CHO non trasfettate (NT): infatti, la densità di corrente misurata a 0 mV era di 0.7±0.1 pA/pF per CHO NT (n=4) e 1.1±0.1 pA/pF per Kv7.2 R325G (n=13; $p>0.05$). Tali dati suggeriscono un effetto di perdita di funzione indotto dalla mutazione R325G sul canale Kv7.2.

Per comprendere se l'alterazione funzionale indotta dalla mutazione R325G potesse essere dovuta ad un'alterazione dell'espressione totale o in membrana delle subunità Kv7.2, sono stati condotti esperimenti di western-blotting su lisati cellulari totali o su frazioni arricchite di proteine di membrana (ottenute mediante la tecnica di biotinilazione). Tali esperimenti hanno rivelato un'espressione non significativamente diversa delle subunità *wt* e mutanti a livello di lisati totali o della frazione isolata sulla

membrana plasmatica (Fig. 14b): infatti, in cellule trasfettate con Kv7.2 *wt* o Kv7.2 R325G la media dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica derivante dal rapporto della densità ottica delle bande, ossia OD_{Q2Tot}/OD_{Tub} (nei lisati totali) o OD_{Q2Biot}/OD_{Q2Tot} (nella frazione delle proteine biotinilate), era rispettivamente di 0.85±0.13 e 1.15±0.11 per Kv7.2 *wt*, o 0.71±0.03 e 0.85±0.17 per Kv7.2 R325G (n=4; p>0.05). Tali esperimenti hanno quindi mostrato una significativa espressione delle subunità mutanti Kv7.2 R325G non funzionali sulla membrana plasmatica. Pertanto, sono stati investigati i loro possibili effetti sulle correnti elicitate dai canali Kv7.2 e/o Kv7.3 effettuando esperimenti di co-espressione. Com'è visibile in Fig. 14c, la densità di corrente misurata a 0 mV in cellule co-trasfettate con il cDNA codificante per i canali Kv7.2 + Kv7.2 R325G (1.8 µg +1.8 µg) era significativamente inferiore rispetto a quella misurata in cellule trasfettate con il il cDNA codificante per Kv7.2 (1.8 µg) (n=11-20 in presenza o in assenza delle subunità Kv7.2 R325G; p<0.05). Allo stesso modo, anche la densità di corrente di Kv7.3 + Kv7.2 R325G risultava significativamente ridotta rispetto al controllo rappresentato dal canale omomerico Kv7.3 (n=13-15 in assenza o in presenza delle subunità Kv7.2 R325G; p<0.05); un effetto inibitorio più pronunciato era osservato co-esprimendo la subunità mutante in studio con la subunità Kv7.3 incorporante una mutazione nel poro, A315T (Kv7.3*) (~90% di inibizione) capace di incrementare la densità di corrente del canale Kv7.3 (Zaika *et al*., 2008; Gómez-Posada *et al*., 2010) (n=17-18 in assenza o in presenza della subunità Kv7.2 R325G). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la subunità mutante Kv7.2 R325G esercita un effetto dominante-negativo sulla corrente espressa dalle subunità Kv7.2, Kv7.3 o Kv7.3*.

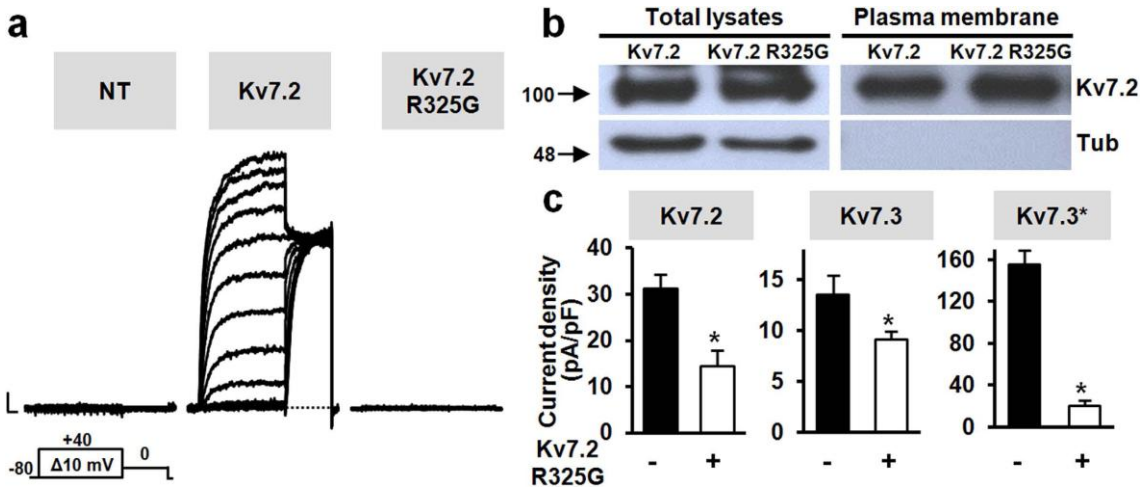

Figura 14. Caratterizzazione biochimica e funzionale delle subunità Kv7.2 R325G. (**a**) Correnti espresse da cellule CHO non trasfettate o trasfettate con il canale Kv7.2 o Kv7.2 R325G in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in basso. Scala della corrente: 200 pA; scala del tempo: 200 ms. (**b**) Immagine rappresentativa di un esperimento di western-blotting condotto sui lisati totali (sulla sinistra) o sulle frazioni biotinilate (sulla destra) ottenuti da cellule CHO trasfettate con i costrutti indicati. Sono stati utilizzati anticorpi anti-Kv7.2 o anti-tubulina, come indicato. I numeri sulla sinistra corrispondono alla massa molecolare dei frammenti proteici del marcatore utilizzato. (**c**) Densità di corrente misurata al potenziale di 0 mV per i diversi canali, come indicato. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi da cellule esprimenti le subunità *wt* ($p<0.05$).

Sono stati condotti esperimenti farmacologici con il bloccante TEA per studiare l'incorporazione della subunità Kv7.2 R325G nel canale eteromerico con le subunità Kv7.2, Kv7.3 o Kv7.3*. A tale scopo, è stata sfruttata la differente sensibilità farmacologica dei canali Kv7.2 e Kv7.3 a questo composto: in particolare, le correnti Kv7.2 sono molto sensibili al TEA (una concentrazione pari a 3 mM induce una inibizione di ~ 90%), mentre quelle espresse da Kv7.3 molto meno (inibizione di ~ 18% alla concentrazione di 30 mM TEA). Quindi, quando le subunità Kv7.3 poco sensibili al TEA sono state co-espresse con le subunità Kv7.2 R325G si osservava una maggiore sensibilità all'effetto di inibizione indotto da 30 mM TEA, identico a quello osservato per i canali eteromerici Kv7.2+Kv7.3 (Fig. 15a). Simili risultati sono stati ottenuti quando sono state co-espresse le subunità Kv7.3* (Fig. 15b).

Al contrario, per studiare l'eteromerizzazione tra Kv7.2 e Kv7.2 R325G, poiché queste due subunità hanno la stessa sensibilità al TEA, è stato utilizzato un mutante del poro (Y284C) che rende il canale Kv7.2 insensibile al composto; pertanto, i canali eteromerici ottenuti coesprimendo le subunità Kv7.2 e Kv7.2 Y284C mostravano una

sensibilità intermedia al TEA tra quella osservata per il canale Kv7.2 (molto sensibile al TEA) e quella mostrata dal canale Kv7.2 Y284C (insensibile al composto); allo stesso modo i canali eteromerici incorporanti le subunità Kv7.2 ed il doppio mutante Kv7.2 Y284C/R325G mostravano una medesima sensibilità intermedia al TEA (Fig. 15c). Tali risultati suggeriscono che la subunità mutata si incorpora correttamente nel canale eteromerico con le subunità Kv7.2 o Kv7.3.

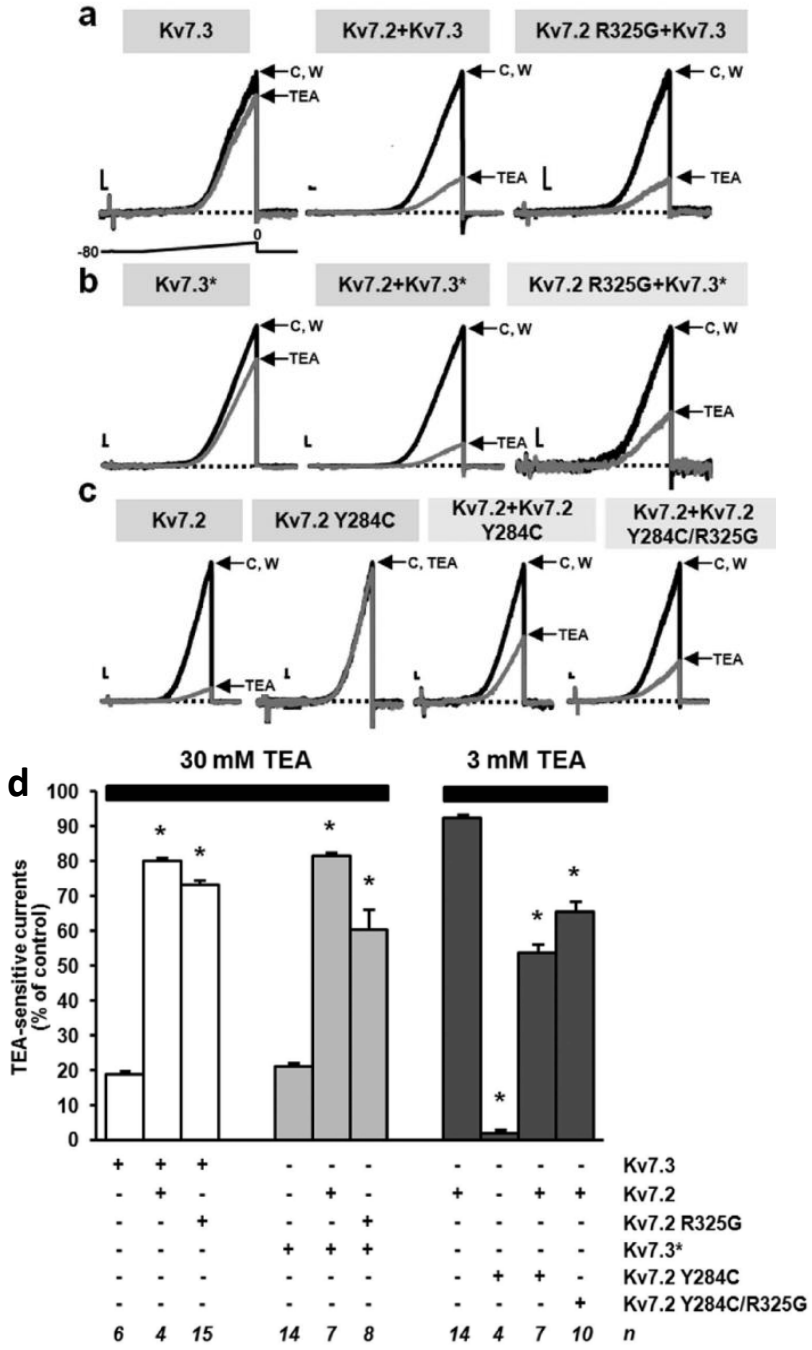

Figura 15. Sensibilità al TEA di canali eteromerici incorporanti le subunità Kv7.2 R325G. (**a,b,c**). Tracce rappresentative delle correnti misurate in cellule esprimenti le subunità indicate in risposta al protocollo di voltaggio (rampa), mostrato in basso, in soluzione di controllo (C), dopo 2' di perfusione di 30 mM (**a**,**b**) o 3 mM (**c**) TEA o in seguito alla rimozione del farmaco (W). Scala della corrente: 50 pA; scala del tempo 200 ms. (**d**) Quantizzazione dei dati raggruppati ottenuti da questi esperimenti. L'asterisco indica valori significativamente diversi dai rispettivi controlli (barra più a sinistra; $p<0.05$). Nell'ultima riga è indicato il numero di cellule registrate (n) per ciascun gruppo sperimentale.

Per riprodurre il bilancio genico dei pazienti affetti da EE che presentano la mutazione su un singolo allele e considerato che la corrente I_{KM} è principalmente sottesa dalle subunità Kv7.2 e Kv7.3 in configurazione eteromerica, sono state condotte registrazioni di elettrofisiologia su cellule CHO co-trasfettate con i cDNA codificanti per la subunità mutante Kv7.2 R325G e per le subunità Kv7.2 e Kv7.3 in un rapporto di trasfezione di 0.5:0.5:1 (per mimare il bilancio genico del probando). Come controlli, sono stati usati i canali eteromerici in cui le subunità Kv7.2 e Kv7.3 erano co-espresse in rapporto di 1:1 (per mimare la genetica di un soggetto sano) o di 0.5:1, in cui è stata trasfettata solo la quantità di cDNA di Kv7.2 *wt* presente nel soggetto affetto al fine di verificare che in queste condizioni ci fosse una linearità tra quantità di cDNA trasfettato e corrente misurata. La densità di corrente misurata in cellule esprimenti Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3 risultava significativamente inferiore rispetto a quella misurata in cellule esprimenti le subunità Kv7.2+Kv7.3 sia in rapporto di 1:1 che di 0.5:1 (Fig. 16a), confermando l'effetto dominante-negativo esercitato dalle subunità mutanti sulla funzione del canale eteromerico. La densità di corrente (in pA/pF) era di 124.5±4.4 (n=25), 83.2±4.1 (n=33) o 55.5±6.1 (n=33) per le cellule co-esprimenti rispettivamente Kv7.2+Kv7.3 (rapporto di trasfezione 1:1), Kv7.2+Kv7.3 (rapporto di trasfezione 0.5:1) o Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3 (rapporto di trasfezione 0.5:0.5:1; $p<0.05$ tra i gruppi). Sulla base di questi risultati e data la scarsa efficacia dei farmaci antiepilettici tradizionali nel trattamento delle EE, è stata testata la capacità del farmaco attivatore retigabina di contrastare l'alterazione funzionale indotta dalla mutazione in studio: in cellule esprimenti Kv7.2+Kv7.3 e Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3 tale farmaco, alla concentrazione di 10 μM, determinava un simile effetto sullo spostamento della voltaggio-dipendenza verso potenziali più iperpolarizzati, sull'attivazione ($V_{½}$) del canale (Fig. 16b) e sul potenziamento della corrente massima (Fig. 16c). Pertanto, durante la perfusione di retigabina, la densità di corrente del canale eteromerico mutante Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3 risultava identica a quella del canale eteromerico *wt* Kv7.2+Kv7.3, suggerendo che la retigabina consente di ripristinare la funzionalità dei canali eteromerici mutanti.

.

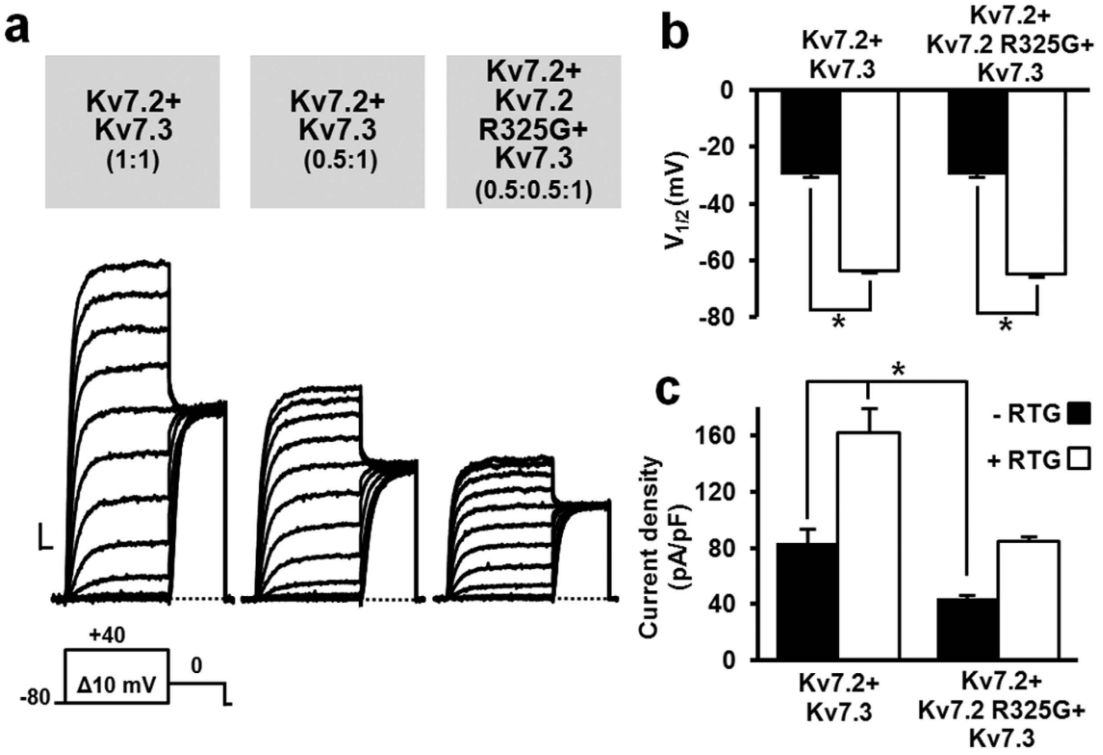

Figura 16. Caratterizzazione funzionale e farmacologica dei canali eteromerici Kv7.2+Kv7.3 incorporanti le subunità mutate Kv7.2 R325G. (**a**) Correnti registrate in risposta al protocollo di voltaggio rappresentato; i rapporti di trasfezione sono indicati tra parentesi. (**b**,**c**) Quantizzazione dell'effetto indotto dalla retigabina (RTG) sull'attivazione ($V_{½}$) del canale (**b**) e sulla densità di corrente misurata a 0 mV (**c**). Gli asterischi indicano valori significativamente diversi ($p<0.05$) dai rispettivi controlli. Per i dati mostrati nei pannelli b e c, il numero (n) di esperimenti è 14 e 20 rispettivamente in assenza (barre nere) o in presenza (barre bianche) dell'attivatore RTG.

4.1.2 La mutazione R325G influenza la regolazione PIP_2-dipendente della corrente espressa dai canali Kv7.2 e Kv7.2/Kv7.3

Tra le subunità della famiglia Kv7, il residuo R325 risulta altamente conservato ed è localizzato nel breve linker di connessione tra il segmento S_6 e il sito di legame per la CaM a livello dell'elica A del dominio C-terminale del canale Kv7.2 (Fig. 17a). Vi sono evidenze per le quali nel canale Kv7.1 il sito di legame al PIP_2 presente nel linker prossimale citosolico risulta determinante per la stabilità di apertura del poro (Zaydman *et al.*, 2013; Kasimova *et al.*, 2015); pertanto, attraverso studi di modellistica molecolare è stato valutato il potenziale contributo del residuo R325 nell'interazione con il PIP_2. In particolare, il modello tridimensionale della subunità Kv7.2 è stato generato a partire dal modello di omologia di Kv7.1 che integra la struttura cristallina

del dominio C-terminale prossimale di Kv7.1 che include le eliche A e B. Tale modello è stato poi allineato con la struttura cristallina del canale Kir2.2 legato ad un derivato a catena corta del PIP_2 (dioctanoyl-PIP_2; diC8-PIP_2); infine, le coordinate cristallografiche del PIP_2 legato sono state traslate in un modello del canale Kv7.2 di interesse. A partire da questo modello, sono stati condotti esperimenti di *docking* al fine di trovare la migliore configurazione di legame Kv7.2/PIP_2. I dati ottenuti hanno rivelato che, all'interno di questa regione, il PIP_2 carico negativamente è coivolto in un complesso network di interazioni elettrostatiche con le catene laterali dei residui amminoacidici del linker S_2-S_3 (F163, R165), del linker S_4-S_5 (S223) e della regione pre-elica A (K319, E322, R325 e Q326) (Fig. 17b). Nello specifico, la catena laterale del residuo R325 interagisce con entrambi i gruppi 3'OH e 4'PO_4^{2-} della molecola di PIP_2. Da tale modello si evince che il residuo R325 è coinvolto nel sito di binding per il PIP_2 e che è anche molto vicino al sito di legame per la CaM.

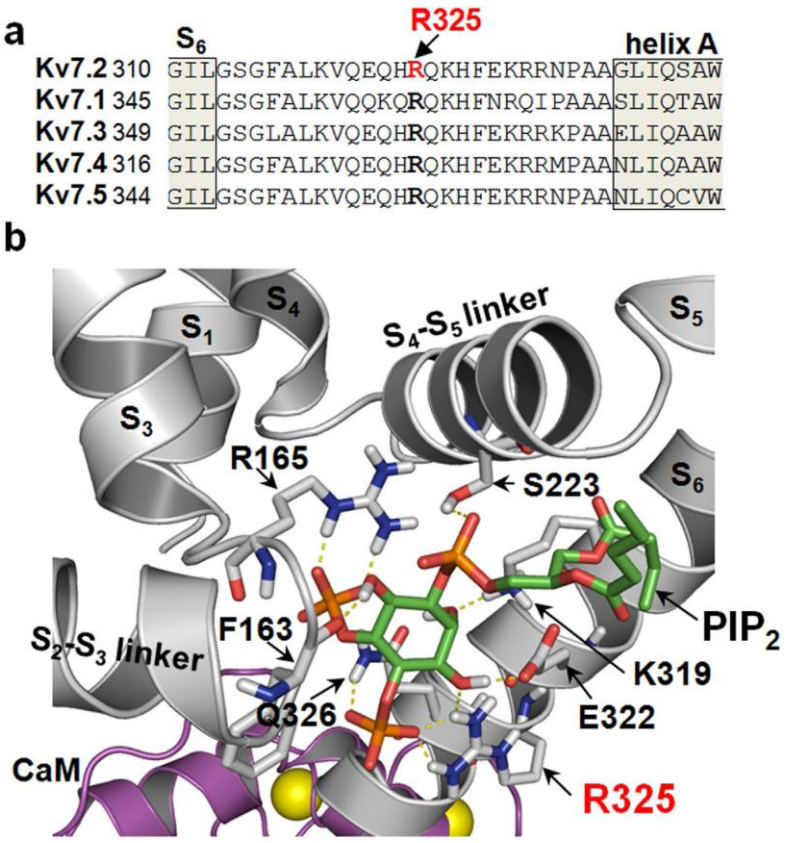

Figura 17. Localizzazione del residuo R325 all'interno del pocket di legame al PIP_2 nella subunità Kv7.2. (**a**) Allineamento delle sequenze amminoacidiche (dalla fine del segmento S_6 e l'inizio dell'elica A) tra le diverse subunità della famiglia Kv7. (**b**) Rappresentazione di una singola molecola di PIP_2 legata alla subunità Kv7.2. Nel modello si osserva che il residuo R325 è nelle vicinanze del sito di legame per la CaM (eliche viola; le palline gialle rappresentano 2 ioni Ca^{2+} legati alla CaM).

Sulla base di tali dati strutturali, è stato investigato se la perdita di funzione del canale Kv7.2 incorporante la sostituzione R325G fosse dovuta ad un'alterazione nella regolazione mediata dal PIP_2 delle corrrenti mediate dal canale Kv7.2; a tale scopo è stata utilizzata una chinasi (PIP5K) che incrementa i livelli endogeni di PIP_2 (Weng *et al*., 2001; Winks *et al*., 2005). La co-espressione del canale Kv7.2 *wt* con la PIP5K portava ad un potenziamento della corrente (Fig. 18a e b), suggerendo che in tali condizioni sperimentali i livelli endogeni di PIP_2 regolano strettamente la corrente massimale espressa dai canali Kv7.2. Inoltre, e più importante, la co-espressione della chinasi con il canale mutato permetteva di recuperare, anche se parzialmente, la funzionalità del canale (Fig. 18c), suggerendo che la perdita di funzione del canale mutato sia legata ad una ridotta capacità dei livelli endogeni di PIP_2 di attivare il canale mutato, che quindi potrebbe essere caratterizzato da una riduzione dell'affinità del canale verso tale modulatore lipidico. Al contrario, non veniva misurata alcuna corrente quando la sola PIP5K veniva espressa in cellule CHO non trasfettate, escludendo un possibile effetto aspecifico indotto dall'espressione della chinasi. Inoltre, è stato osservato che l'applicazione di 10 μM RTG sulla corrente del canale Kv7.2 R325G recuperata dalla co-espressione con la chinasi determinava un significativo spostamento a sinistra della voltaggio-dipendenza del canale (Fig. 18c). Da sottolineare è che lo spostamento della voltaggio-dipendenza indotto dalla RTG sulla corrente Kv7.2 R325G+PIP5K (-14.6 mV) non era significativamente diverso da quello misurato sulla corrente Kv7.2+PIP5K (-16.4 mV); tuttavia, entrambi i valori erano significativamente inferiori rispetto a quello ottenuto quando il farmaco era testato su cellule esprimenti le sole subunità Kv7.2 (-30.0 mV; $p<0.05$) (Fig. 18c). Tali risultati suggeriscono che il PIP_2 e la retigabina convergono su un pathway molecolare comune, ossia agiscono attraverso meccanismi parzialmente sovrapposti per stabilizzare l'apertura del poro voltaggio-dipendente.

In letteratura vi sono evidenze per cui la co-espressione della CaM o della CaM_{1234}, una CaM mutante che non lega il calcio (Gamper and Shapiro., 2003), consente di ripristinare la funzionalità di subunità Kv7.2 incorporanti mutazioni a livello del sito di legame per la CaM (Alaimo *et al*., 2013). Sulla base di tali evidenze e vista la vicinanza della mutazione in studio al sito di legame per la CaM (Fig. 17), è stata anche testata l'ipotesi che la perdita di funzione del canale Kv7.2 R325G fosse secondaria ad

un’alterazione della modulazione CaM-mediata della corrente espressa dai canali Kv7.2. Quando co-espressa col canale Kv7.2, la CaM o la CaM_{1234} causava un significativo aumento della densità di corrente (Fig. 18b); al contrario, quando tali molecole venivano co-espresse con il canale mutato non determinavano alcun recupero funzionale (Fig. 18b). Inoltre, la CaM o la CaM_{1234} non erano in grado di potenziare ulteriormente le correnti di Kv7.2 o Kv7.2 R325G già incrementate dalla co-espressione con la PIP5K (Fig.18b). Questi dati suggeriscono che la mutazione in studio non interferisce con la modulazione del canale mediata dalla CaM.

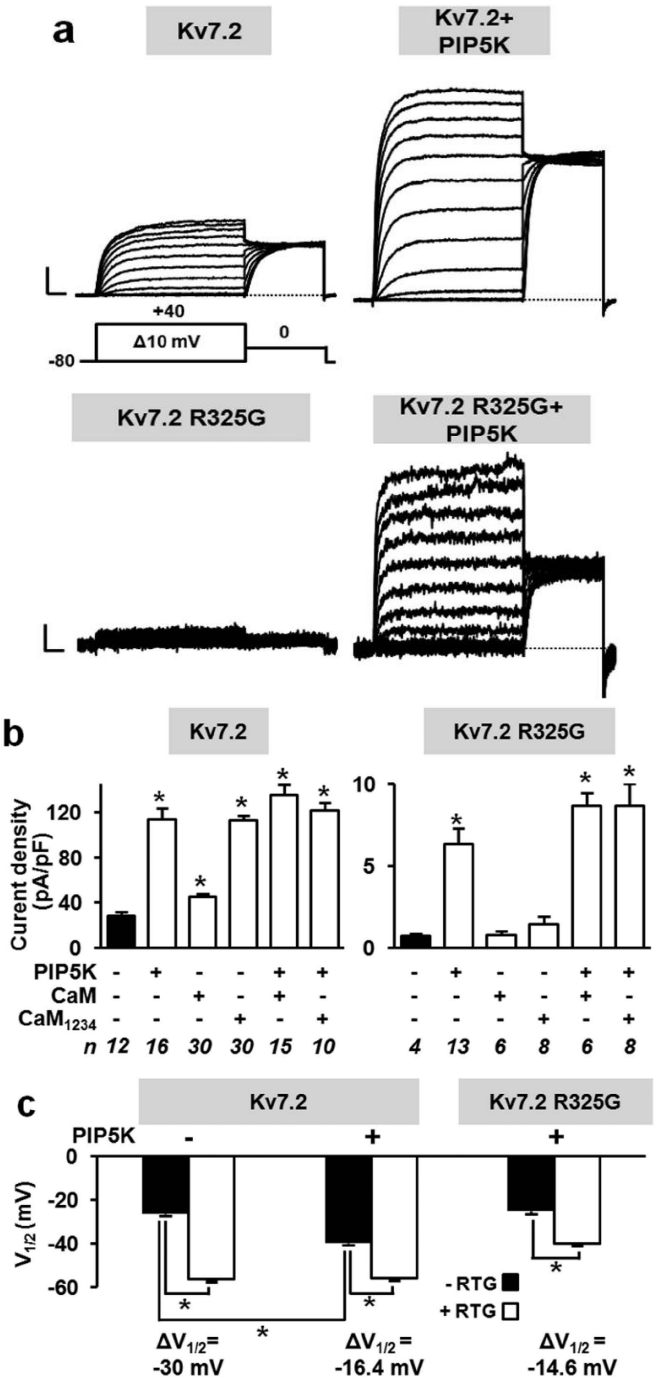

Figura 18. Studio dell'effetto della co-espressione di PIP5K, CaM e/o CaM_{1234} sui canali omomerici Kv7.2 o Kv7.2 R325G. (**a**) Correnti registrate in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in assenza (sinistra) o in presenza (destra) di PIP5K. Scala di corrente: 500 pA (pannelo di sopra) o 50 pA (pannello in basso); scala del tempo: 200 ms. (**b**) Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule esprimenti il canale Kv7.2 o Kv7.2 R325G in assenza o in co-espressione con PIP5K, CaM e/o CaM_{1234}, come indicato. Nell'ultima riga è indicato il numero (n) di esperimenti per ogni gruppo di trasfezione. (**c**) Effetto indotto dalla retigabina (RTG, 10 μM) sull'attivazione (V½) dei canali indicati. In tutti i pannelli gli asterischi indicano valori significativamente differenti ($p<0.05$) rispetto ai controlli.

Un ulteriore modo per studiare la sensibilità al PIP_2 è quello di ridurne i livelli attraverso una fosfatasi che converte il PIP_2 a PIP monofosfato. In particolare, come fosfatasi è stata utilizzata la DrVSP (*Danio rerio voltage-sensitive phosphatase*) che si attiva a potenziali molto positivi (> +100 mV), permettendo di discriminare tra l'attivazione della fosfatasi e l'attivazione del canale (che, come detto, satura a ~ 0/20 mV). L'attivazione della fosfatasi determina il decremento dei livelli di PIP_2 a livello della membrana plasmatica e la conseguente inibizione dei canali Kv7 (Suh and Hille., 2007; Kruse *et al*., 2012). Come si osserva in figura 19a, la corrente espressa dal canale eteromerico Kv7.2+Kv7.3 in assenza di DrVSP misurata a 0 mV, prima e dopo lo step depolarizzante a 100 mV, non era significativamente diversa. Al contrario, quando veniva co-espressa la DrVSP, l'enzima si attivava in seguito al *pulse* di 100 mV, determinando una forte inibizione della corrente, presumibilmente in seguito alla riduzione dei livelli di PIP_2. Al potenziale di 0 mV, in conseguenza dello spegnimento della fosfatasi, si osservava un lento recupero della corrente dovuto alla risintesi endogena del PIP_2. L'effetto di inibizione indotto dalla fosfatasi era contrastato dalla contemporanea co-espressione della PIP5K: infatti, l'inibizione risultava minore e si assisteva ad un rapido recupero della corrente favorito dalla più veloce risintesi di PIP_2 indotta dalla chinasi.

Il canale eteromerico Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3 si mostrava più sensibile all'effetto di inibizione indotto dalla fosfatasi ed anche il recupero della corrente risultava più lento rispetto a quello osservato per il canale eteromerico *wt*: infatti, dopo 10", per il canale eteromerico *wt* si osservava il 76% di recupero della corrente, mentre, il canale eteromerico mutante recuperava il 64% della corrente (Fig. 19b). Conducendo gli esperimenti a differenti tempi (Fig. 19c), si osservava come il blocco indotto dalla fosfatasi avvenisse più velocemente nel canale eteromerico mutato: infatti, nel canale eteromerico *wt* erano necessari 0.6" di depolarizzazione a 100 mV per ottenere un significativo effetto di inibizione. Al contrario, nel canale eteromerico mutato l'inibizione era significativa a tempi minori (0.2"). L'effetto di maggiore inibizione e di più lento recupero misurato per il canale mutante era visibile sia in co-espressione della sola DrVSP, che quando sono co-espresse DrVSP e PIP5K. (Fig. 19d).

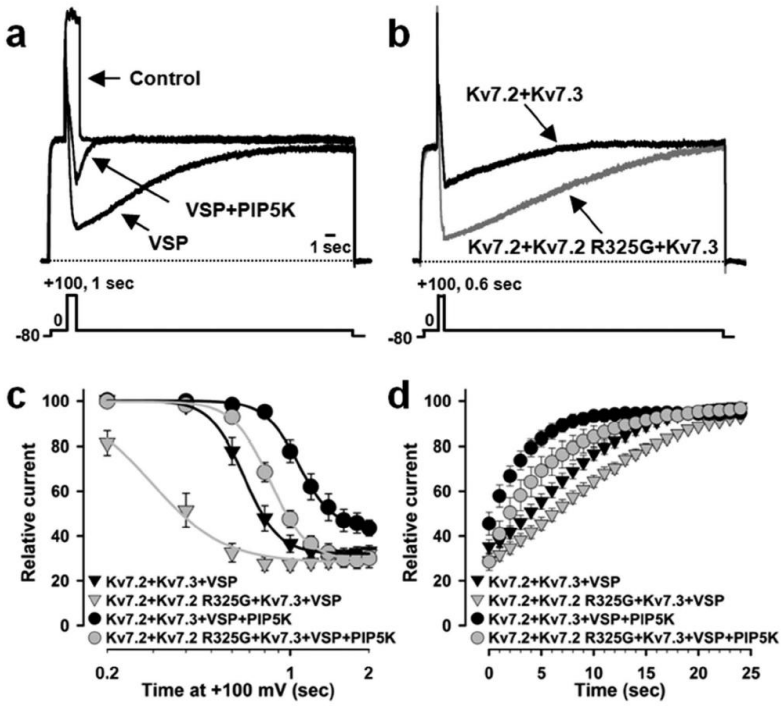

Figura 19. Effetto indotto dalla DrVSP sulle correnti Kv7.2+Kv7.3 e Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3. (**a**) Correnti registrate in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in cellule esprimenti Kv7.2+Kv7.3 (controllo), Kv7.2+Kv7.3+DrVSP, Kv7.2+Kv7.3+DrVSP+PIP5K. (**b**) Correnti registate in risposta al protocollo di voltaggio indicato in cellule esprimenti DrVSP e Kv7.2+Kv7.3 (traccia nera) o Kv7.2+Kv7.2 R325G+Kv7.3 (traccia grigia). (**c,d**) Tempo-dipendenza del processo di inibizionde della corrente (**c**) o del recupero della corrente (**d**) in cellule co-esprimenti i canali indicati e la DrVSP, in assenza o in presenza di PIP5K. L'inibizione della corrente indotta dalla DrVSP (**c**) era espressa come rapporto tra i valori di corrente registrati a 0 mV immediatamente prima e dopo il pulse depolarizzante di +100 mV. Il recupero della corrente (**d**) era espresso come rapporto tra la corrente massima misurata prima dello step depolarizzante di +100 mV e la corrente misurata ad ogni secondo alla fine dello step di +100 mV.

Complessivamente, questi risultati rivelano che la mutazione R325G influenza la funzionalità del canale Kv7.2 interferendo con il meccanismo di regolazione dipendente dal PIP_2: infatti, un aumento dei livelli endogeni di questo fosfolipide consente di recuperare l'effetto di perdita di funzione indotto dalla mutazione.

4.2 STUDIO DELLE MUTAZIONI Kv7.3 V359L E Kv7.3 D542N

Le mutazioni Kv7.3 V359L e Kv7.3 D542N sono state riscontrate in una famiglia in cui il probando, affetto da EE, è portatore di entrambe le mutazioni in eterozigosi composta: ogni variante è stata ereditata da un genitore clinicamente asintomatico. Pertanto, è stata condotta l'analisi genetica di tutti i membri della famiglia, sono state investigate le proprietà funzionali dei canali Kv7.3 incorporanti tali mutazioni al fine di individuarne i meccanismi molecolari coinvolti, ed è stata studiata la sensibiltà farmacologica di tali canali mutanti.

4.2.1 Analisi genetica della famiglia

Il DNA del probando e degli altri membri della famiglia è stato analizzato mediante la tecnica NGS che ha permesso di identificare nel soggetto affetto due nuove varianti geniche in eterozigosi composta nel gene *kcnq3*: queste varianti sono la c.1075G>T e la c.1624G>A (Fig. 20a). Nessuna delle varianti insorge *de novo* in quanto sono ereditate dai genitori che risultano clinicamente asintomatici. La variante c.1075G>T deriva dal padre (individuo I-1), mentre la variante c.1624G>A è stata ereditata dalla madre (individuo I-2). Il fratello del probando è eterozigote per la variante c.1624G>A (individuo II-1). In questi soggetti non è stata identifica alcuna variante patogenica nel gene omologo *kcnq2* né negli altri geni analizzati. Le varianti Kv7.3 identificate sono entrambe nuove e portano alla sostituzione missenso di due residui localizzati nella lunga coda C-terminale della subunità Kv7.3: in particolare, la variante c.1075G>T causa la sostituzione di una valina, localizzata nel corto linker tra il segmento S6 e l'elica A di legame con la CaM, con una leucina (V359L), mentre la variante c.1624G>A determina la sostituzione di un residuo di aspartato (quindi carico negativamente) con l'amminoacido polare asparagina a livello della regione tra le eliche B e C (D542N) (Fig. 20b). Entrambi i residui sono altamente conservati tra i cinque membri della famiglia dei canali Kv7 (Fig. 20c).

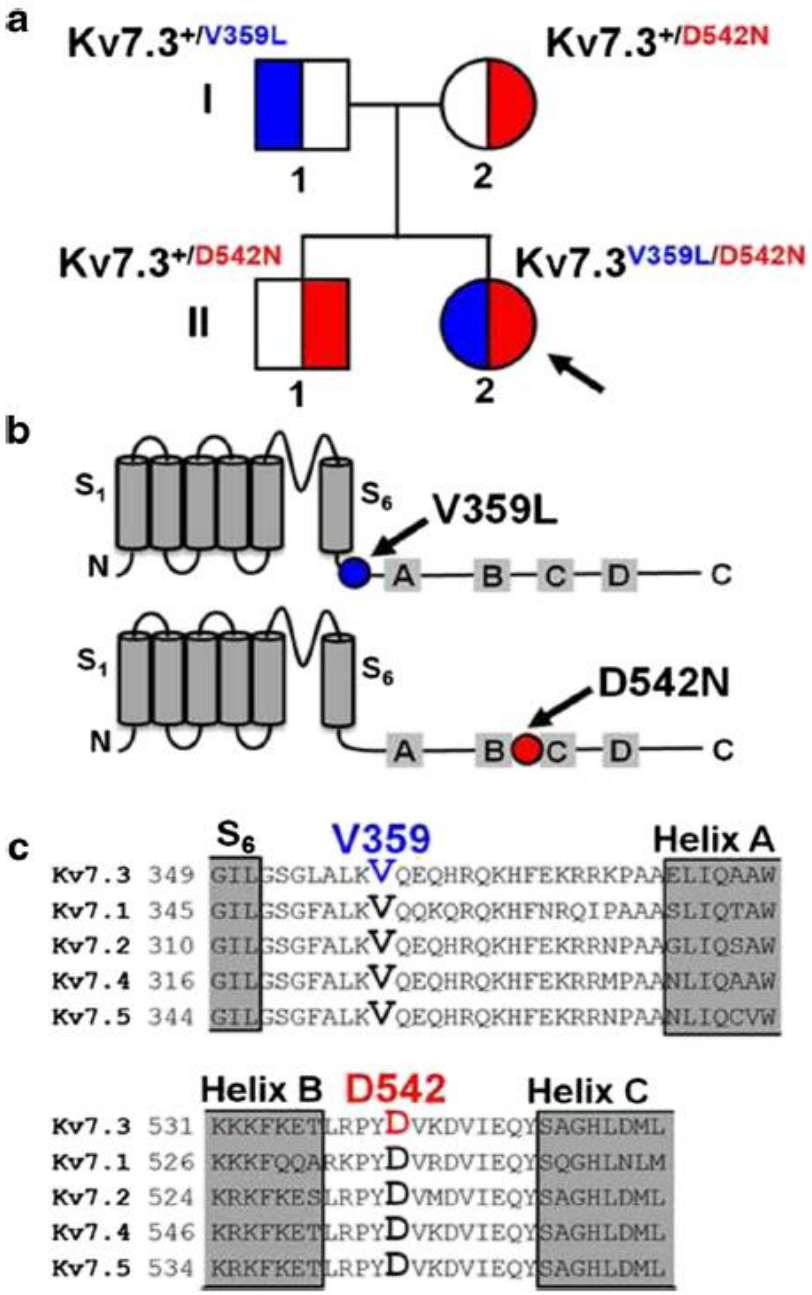

Figura 20. Albero genealogico della famiglia in studio, rappresentazione schematica di una singola subunità Kv7.3 e parziale allineamento delle sequenze dei diversi membri della famiglia Kv7. (**a**) Albero genealogico della famiglia in esame. Le sostituzioni V359L e D542N sono rappresentate rispettivamente in blu ed in rosso; il simbolo "+" indica l'allele Kv7.3 *wt*. La freccia indica il probando. (**b**) Rappresentazione schematica di una subunità del canale Kv7.3: la localizzazione dei residui in studio è indicata dalle frecce. (**c**) Allineamenti parziali delle sequenze primarie delle subunità Kv7.1-Kv7.5, ottenute con ClustalΩ; si osserva l'elevato grado di conservazione di entrambi i residui. L'isoforma c del canale Kv7.2 è stata utilizzata per l'allineamento.

4.2.2 Caratterizzazione funzionale, biochimica e farmacologica dei canali omomerici ed eteromerici incorporanti le subunità Kv7.3 mutanti.

Per studiare gli effetti funzionali associati alle varianti Kv7.3 di nuova identificazione sono state condotte registrazioni elettrofisiologiche su cellule CHO trasfettate con il cDNA codificante per le subunità Kv7.3, Kv7.3 V359L e Kv7.3 D542N. Il canale Kv7.3 *wt* , usato come controllo, esprimeva una correte uscente voltaggio-dipendente che si attivava intorno a -50 mV e saturava a circa 0 mV (Fig. 21a). Al contrario, la densità di corrente misurata a 0 mV in cellule trasfettate con i plasmidi codificanti per Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N non era significativamente diversa da quella misurata in cellule non trasfettate (Fig. 22a, b; Tab. 2). Dagli esperimenti di western-blotting condotti su lisati totali o frazioni arricchite delle proteine di membrana di cellule trasfettate con Kv7.3, Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N è emerso che non vi era una differente espressione tra le subunità Kv7.3, Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N. Infatti, la media dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica derivante dal rapporto della densità ottica delle bande nei lisati totali ($OD_{Q3Tot}/OD_{Tub)}$ era di 1.00±0.20 per Kv7.3, 0.89±0.10 per Kv7.3 V359L o 0.79±0.11 per Kv7.3 D542N (n=4; $p>0.05$); inoltre, la media dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica derivante dal rapporto della densità ottica nella frazione delle proteine biotinilate (OD_{Q3Biot}/OD_{Tub}) era di 1.00±0.14 per Kv7.3, 0.72±0.16 per Kv7.3 V359L o 0.81±0.18 per Kv7.3 D542N (n=4, $p>0.05$). Questi dati suggeriscono che le subunità mutanti non interferiscono con la sintesi del canale o con il suo *trafficking* alla membrana plasmatica (Fig. 22c).

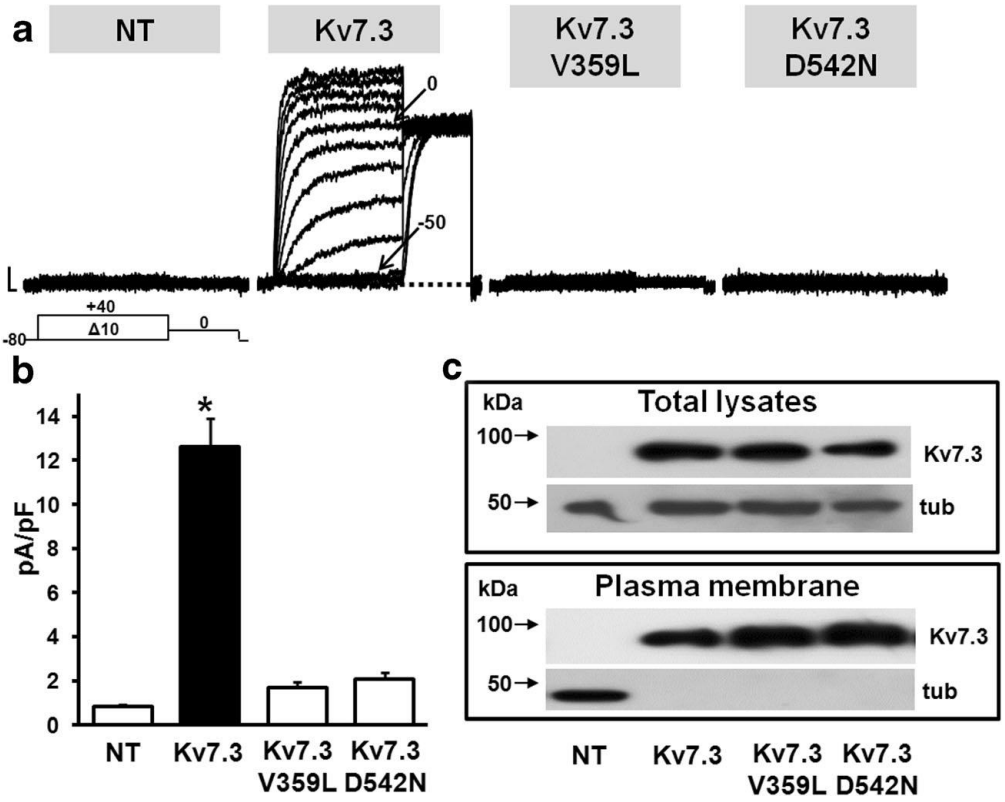

Figura 22. Caratterizzazione biochimica e funzionale dei canali omomerici Kv7.3 incorporanti le subunità Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N. Tracce rappresentative (**a**) e densità di corrente misurata a 0 mV (**b**) in cellule CHO non trasfettate (NT) o trasfettate con i plasmidi codificanti per Kv7.3, Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N, come indicato. Il protocollo di voltaggio usato è indicato in basso. Scala di corrente: 50 pA; scala del tempo: 100 ms. In **b** l'asterisco indica un valore significativamente diverso ($p<0.05$) rispetto a quello di cellule CHO non trasfettate o trasfettate con le subunità Kv7.2 V359L o Kv7.3 D542N. Ogni dato è ottenuto dalla media±SEM dei valori derivanti da 5 a 25 cellule registrate in almeno 3 sesioni sperimentali.
(**c**) Immagini rappresentative di esperimenti di Western blot o di biotinilazione ottenuti da cellule CHO non trasfettate o esprimenti le subunita indicate rilevate con anticorpi anti-Kv7.3 o anti-tubulina (tub). I numeri sulla sinistra corrispondono al peso molecolare dei frammenti proteici del marcatore utilizzato.

	Number	Current density (pA/pF)	$V_{½}$ (mV)	k (mV/efold)
Kv7.3	25	12.6 ± 1.3	−40.4 ± 0.6	6.9 ± 0.6
Kv7.3 V359L	17	1.7 ± 0.2*	ND	ND
Kv7.3 D542N	18	2.1 ± 0.3*	ND	ND
Kv7.2 + Kv7.3	22	107.2 ± 9.0	−27.5 ± 0.5	12.3 ± 0.5
Kv7.2 + Kv7.3 V359L	20	67.9 ± 7.1**	−15.7 ± 0.5**	12.1 ± 0.4
Kv7.2 + Kv7.3 D542N	20	49.0 ± 5.5**	−19.7 ± 0.4**	11.0 ± 0.4
Kv7.2 + Kv7.3 + Kv7.3 V359L	35	93.9 ± 5.7	−20.5 ± 0.4**	11.9 ± 0.3
Kv7.2 + Kv7.3 + Kv7.3 D542N	35	85.7 ± 4.8	−24.9 ± 0.3**	10.4 ± 0.3
Kv7.2 + Kv7.3 V359L + Kv7.3 D542N	26	69.0 ± 8.2**	−20.8 ± 0.5**	10.9 ± 0.4
Kv7.2	34	42.2 ± 2.7	−22.8 ± 0.7	11.9 ± 0.5
Kv7.2 D535N	9	6.0 ± 1.2***	ND	ND
Kv7.2 + Kv7.2 D535N	19	18.7 ± 2.8***	−20.3 ± 0.6	11.2 ± 0.5
Kv7.2 D535N + Kv7.3	15	25.3 ± 3.3**	−24.3 ± 0.7**	12.8 ± 0.6
Kv7.2 + Kv7.2 D535N + Kv7.3	24	39.4 ± 4.4**	−23.0 ± 0.5**	12.0 ± 0.5

ND: non determinabile
*p<0.05 verso Kv7.3; **p<0.05 verso Kv7.2+Kv7.3; ***p<0.05 verso Kv7.2

Tabella 2. Proprietà biofisiche dei canali incorporanti le diverse combinazioni di subunità Kv7.2 e Kv7.3 *wt* o mutanti.

Quando espresse insieme, le subunità Kv7.2 e Kv7.3 assemblano in modo casuale e la corrente elicitata dai canali eteromerici Kv7.2+Kv7.3 è significativamente maggiore rispetto a quella espressa dai canali omomerici Kv7.2 o Kv7.3 (Tab. 2). In presenza di subunità Kv7.3 mutanti, la densità di corrente di Kv7.2+Kv7.3 V359L o di Kv7.2+Kv7.3 D542N risultava significativamente inferiore rispetto a quella di Kv7.2+Kv7.3 (Tab. 2), suggerendo che le subunità mutanti esercitano un effetto dominante-negativo sulla corrente espressa dalle subunità Kv7.2. Inoltre, nei canali eteromerici la sensibilità al bloccante TEA risulta intermedia (~50%) tra l'alta sensibilità mostrata da Kv7.2 e la bassa sensibilità di Kv7.3. Gli esperimenti farmacologici condotti in presenza di TEA su cellule esprimenti le subunità Kv7.3 mutanti hanno rivelato che tali subunità mostravano una simile incorporazione nei canali eteromerici con le subunità Kv7.2: infatti, 3 mM TEA bloccava un'identica frazione di corrente registrata in cellule esprimenti subunità Kv7.3 *wt* o mutanti insieme a subunità Kv7.2: nello specifico, la percentuale di blocco indotta dal TEA era di 49±2.6, 57.4±2.3 o 52.3±3.1 in cellule esprimenti rispettivamente Kv7.2+Kv7.3, Kv7.2+Kv7.3 V359L o Kv7.2+Kv7.3 D542N (p>0.05 verso Kv7.2+Kv7.3) (Fig. 23a).

Tali risultati suggeriscono che le subunità mutate si incorporano correttamente nel canale eteromerico.

Al fine di riprodurre il bilancio genico di tutti i membri della famiglia in studio, sono stati condotti ulteriori esperimenti di elettrofisiologia su cellule CHO co-esprimenti le subunità Kv7.2+Kv7.3 per mimare la genetica di un soggetto sano (rapporto di trasfezione 1:1), Kv7.2+Kv7.3+Kv7.3 V359L o Kv7.2+Kv7.3+Kv7.3 D542N per mimare il bilancio genico dei genitori asintomatici (rapporto di trasfezione 1:0.5:0.5) e Kv7.2+Kv7.3 V359L+Kv7.3 D542N per riprodurre la genetica del probando (rapporto di trasfezione 1:0.5:0.5). I risultati ottenuti mostravano un effetto di perdita di funzione indotto dalle subunità Kv7.3 mutanti solo quando co-espresse contemporaneamente (Kv7.2+Kv7.3 V359L+Kv7.3 D542N), ossia solo nella configurazione che mima il probando, ma non nelle configurazioni che mimano i genitori asintomatici (Kv7.2 + Kv7.3V359L + Kv7.3 oppure Kv7.2 + Kv7.3 D542N + Kv7.3) (Fig. 23b; Tab. 2). Questi dati risultano chiaramente in linea con il dato clinico, in quanto è misurabile un'alterazione del comportamento dei canali Kv7.2/Kv7.3 eteromerici solo nella configurazione che mima l'unico soggetto affetto.

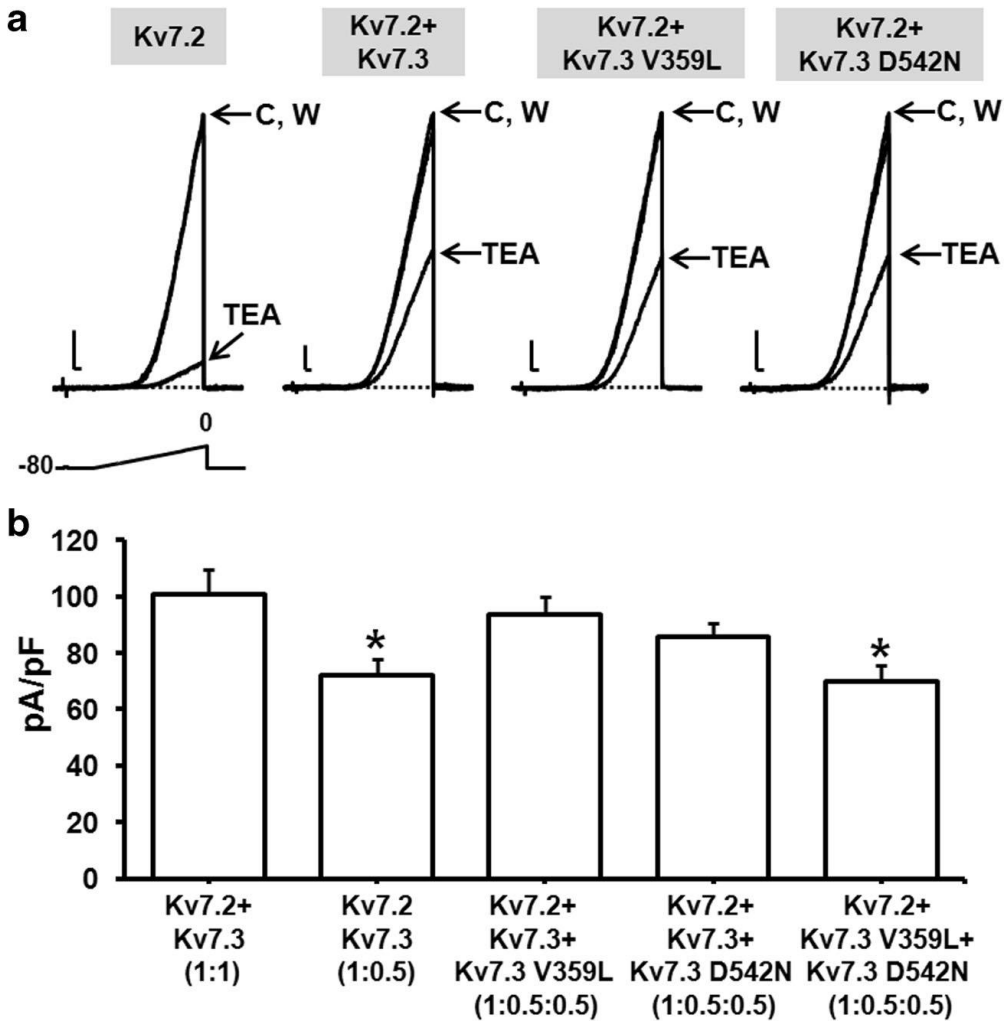

Figura 23. Caratterizzazione funzionale e farmacologica dei canali eteromerici incorporanti le subunità Kv7.3 mutanti. (**a**) Tracce rappresentative delle correnti misurate in cellule esprimenti le subunità indicate in risposta al protocollo di voltaggio (rampa), mostrato in basso, in soluzione di controllo (C), dopo 1-2' di perfusione di 3 mM (c) TEA o in seguito alla rimozione del farmaco (W). Scala della corrente: 200 pA; scala del tempo 200 ms. Ogni dato è ottenuto dalla media ± SEM dei valori derivanti da 4 a 20 cellule registrate in almeno 3 sessioni sperimentali. (**b**) Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule CHO trasfettate con le combinazioni di subunità indicate; tra parentesi sono mostrati i rapporti di trasfezione utilizzati. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi ($p<0.05$) dal primo gruppo di controllo (Kv7.2 + Kv7.3; rapporto di trasfezione 1:1). Ogni dato deriva dalla media ± SEM dei valori ottenuti dalla regitrazione di 20-35 cellule in almeno 3 sessioni sperimentali.

4.2.3 Le varianti localizzate al C-terminale della subunità Kv7.3 influenzano la regolazione PIP_2-dipendente

Le varianti riscontrate nel probando coinvolgono residui separati da circa 200 aminoacidi a livello del lungo dominio C-terminale della subunità Kv7.3; in particolare

il residuo V359 è localizzato nel linker tra il segmento S_6 e l'elica A, mentre il residuo D542 è presente a livello della regione tra le eliche B e C. Nella configurazione tridimensionale della subunità Kv7.3, a causa dell'orientamento anti-parallelo delle eliche A e B, le regioni in cui sono localizzati i residui in studio appaiono però molto vicine tra loro (Fig. 24a). Come detto precedentemente, i canali Kv7 necessitano del PIP_2 per una corretta funzionalità, e tale lipide carico negativamente si trova solo nel lato interno della membrana plasmatica. All'interfaccia tra i domini transmembrana ed il C-terminale, ossia dove sono localizzati entrambi i residui V359 e D542, è presente una regione importante per il legame del PIP_2 e per le funzioni regolatorie (Zhang *et al*., 2013). Pertanto, una corta catena derivata dal PIP_2 (dioctanoil-PIP_2; diC8-PIP_2) è stata posizionata nel nostro modello mediante la tecnica del docking, al fine di trovare la migliore configurazione Kv7.3/PIP_2. I dati ottenuti mostrano che la molecola di PIP_2 è coinvolta in un complesso *network* di interazioni elettrostatiche con le catene laterali dei residui amminoacidici delle regioni pre-elica A e tra le eliche B e C, con le code idrofobiche che puntano verso l'area lipofilica delimitata da alcuni residui tra cui quello di nostro interesse V359 (Fig. 24b); non è stata osservata alcuna interazione diretta con il residuo D542, bensì una interazione elettrostatica indiretta mediata dal residuo R364. Pertanto, entrambi i residui V359 e D542 sembrano contribuire alo stesso sito di legame del PIP_2 nella subunità Kv7.3.

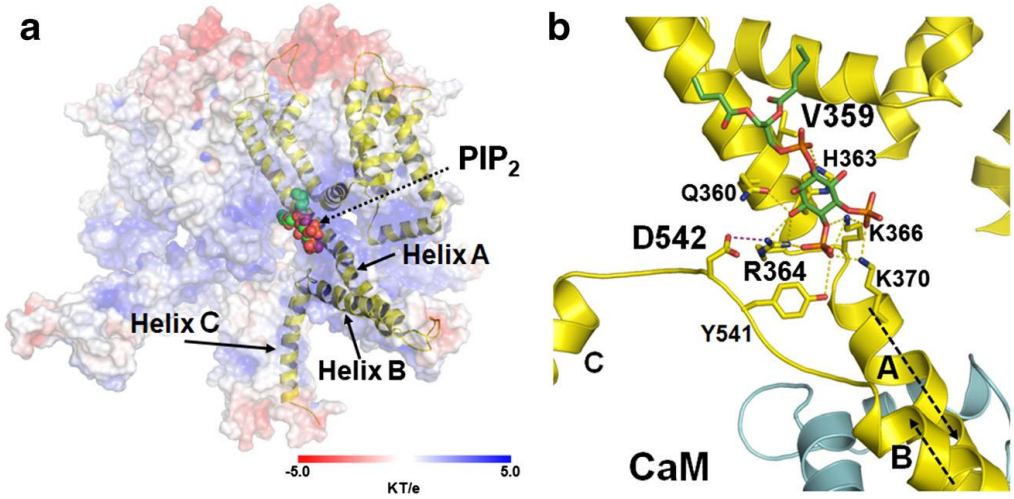

Figura 24. Modello strutturale di un tetramero del canale Kv7.3 con una molecola di PIP_2 legata alla tasca di legame C-terminale di una singola subunità. (**a**) Struttura tridimensionale di un tetramero del canale Kv7.3 con una molecola di PIP_2 legata ad una singola subunità. L'intensità dei colori rosso o blu è proporzionale alla forza elettrostatica della proteina, come indicato dalla scala. (**b**) Molecola di PIP_2 inserita in una singola subunità Kv7.3; si osservano i residui coinvolti attraverso interazioni elettrostatiche (indicate da linee tratteggiate) ed il legame con una molecola di CaM. Le frecce tratteggiate mostrano l'orientamento antiparallelo delle eliche A e B nel dominio C-terminale della subunità Kv7.3.

Sulla base delle informazioni dedotte dal modello strutturale, è stata investigata la sensibilità al PIP_2 dei canali mutanti modificando la disponibilità intracellulare di questo fosfolipide, al fine di valutare se le mutazioni in studio influenzino la regolazione PIP_2-dipendente. A tale scopo, per depletare i livelli di PIP_2 è stata utilizzata la fostatasi DrVSP che, come descritto precedentemente, quando attivata a potenziali fortemente depolarizzanti (~ +100 mV), determinava la riduzione dei livelli di PIP_2 sulla membrana plasmatica e l'inibizione della corrente elicitata dai canali Kv7. La ripolarizzazione del potenziale di membrana causava lo spegnimento della fosfatasi e si assisteva al recupero della corrente dovuto alla risintesi di PIP_2. Quindi è stata misurata la corrente a 0 mV prima e dopo lo step depolarizzante per valutare l'effetto della DrVSP sulla corrente massimale espressa dai canali in studio. Nel canale Kv7.2 + Kv7.3 si osservava che al tempo di 0.4" i livelli di corrente risultavano uguali prima e dopo il *pulse* depolarizzante (Fig. 25a,b). Al contrario, nei canali mutanti Kv7.2+Kv7.3 V359L+Kv7.3 e Kv7.2+Kv7.3 D542N+Kv7.3 a 0.4" si assisteva ad una significativa inibizione della corrente e ad un recupero più lento della stessa (Fig. 25a,b). Quando erano espresse entrambe le subunità Kv7.3 mutanti (Kv7.2+Kv7.3 V359L+Kv7.3 D542N; per

riprodurre la genetica del probando) si osservava un decremento di circa il 60% della corrente dopo 0.4" di depolarizzazione (Fig. 25a). Quindi la corrente del canale Kv7.2+Kv7.3V359L+Kv7.3 D542N era maggiormente inibita e recuperarava ancora più lentamente quando paragonata ai canali mutanti incorporanti solo una subunità mutante (Fig. 25b), suggerendo che la presenza di entrambe le mutazioni causava una maggiore alterazione nella regolazione PIP_2-mediata.

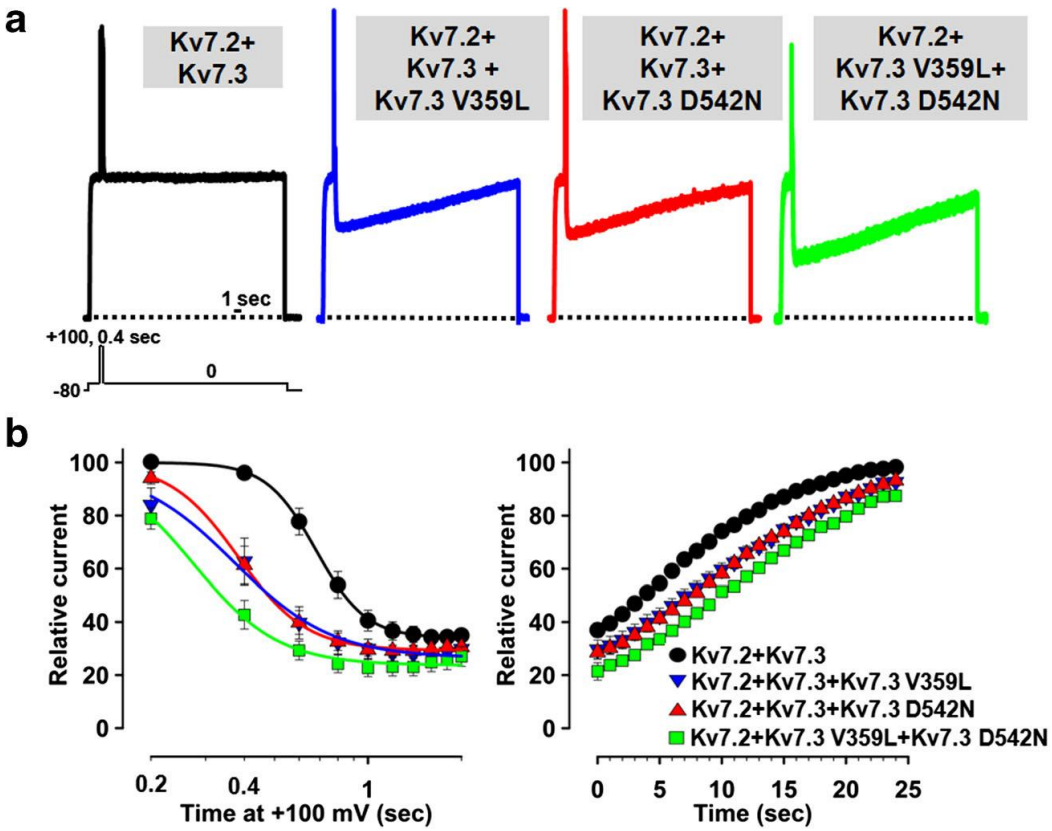

Figura 25. Effetti indotti dalla DrVSP sulle correnti elicitate dai canali eteromerici incorporanti le subunità Kv7.3 mutanti. (**a**) Trace rappresentative di cellule CHO esprimenti i canali eteromerici indicati in co-espressione della DrVSP. Il protocollo di voltaggio usato per attivare la DrVSP è mostrato in basso. (**b**) Quantificazione della corrente residua dopo attivazione della DrVSP o del recupero della corrente in seguito allo spegnimento della DrVSP in cellule esprimenti i canali indicati. Ogni dato deriva dalla media±SEM dei valori ottenuti dalla regitrazione di 14-24 cellule in almeno 3 sessioni sperimentali.

Poiché le mutazioni in studio si trovano in un pocket amminoacidico di interazione con la CaM e sulla base del ruolo regolatorio svolto da tale molecola sui canali Kv7, sono stati condotti ulteriori esperimenti di elettrofisiologia per valutare l'effetto della co-espressione della CaM con i canale omomerici *wt* o mutanti. Da tali esperimenti è emerso che, quando co-espresse con il canale Kv7.3, la CaM causava un significativo

decremento della corrente, come già riportato (Gomis-Perez *et al*., 2017); al contrario, la co-espressione della CaM_{1234} non determinava alcun effetto (Fig. 26), ossia la corrente misurata non era significativamente diversa da quella espressa dal canale Kv7.3 in assenza di CaM_{1234}. Quando queste venivano co-espresse con i canali Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N non si osservava alcun recupero della corrente (Fig. 26). Pertanto, questi dati suggeriscono che le mutazioni in studio non interferiscono con la modulazione della corrente Kv7.3 mediata dalla CaM.

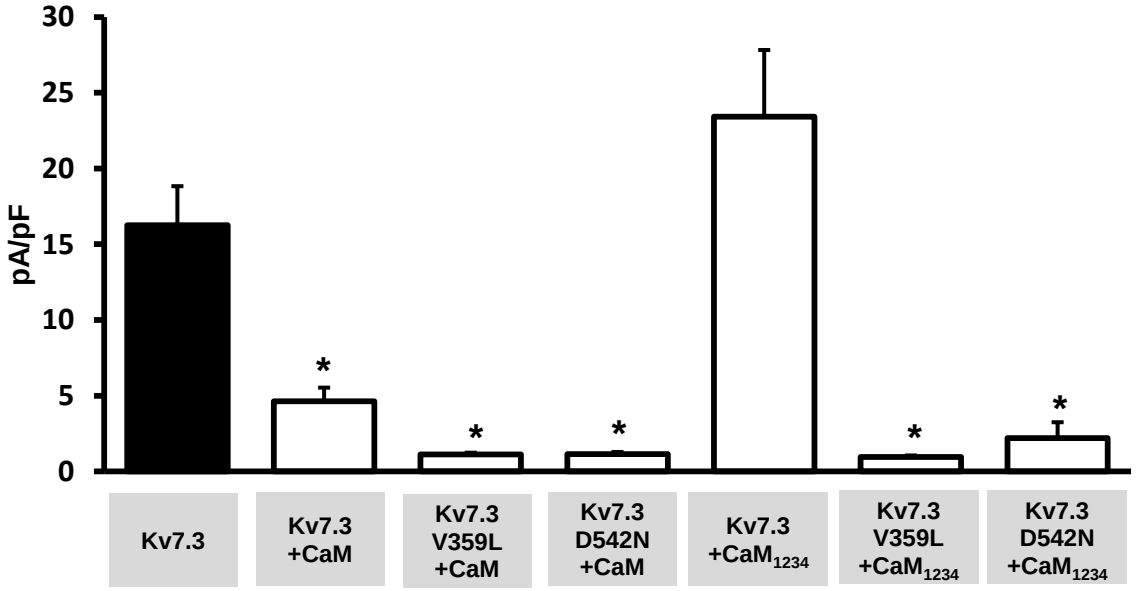

Figura 26. Studio dell'effetto della co-espressione di CaM o CaM_{1234} sul canale omomerico Kv7.3 *wt*, Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N. Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule trasfettate con Kv7.3 *wt*, Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N in co-espressione con CaM o CaM_{1234}. Il singolo asterisco indica valori significativamente diversi ($p<0.05$) dal controllo Kv7.3 *wt* e da Kv7.3+CaM_{1234}.

*4.2.4 Studio delle proprietà funzionali della variante presente a livello dello stesso residuo nei canali Kv7.2 e Kv7.*3

Il residuo D542 studiato nel canale Kv7.3 corrisponde al residuo D535 nell'isoforma "c" o al residuo D563 nell'isoforma "a" del canale altamente omologo Kv7.2. La variante Kv7.2 D535N (corrispondente alla variante D542N nel canale Kv7.3) è stata recentemente descritta in tre casi sporadici (non familiari) con epilessia neonatale e ritardo dello sviluppo (Weckhuysen *et al*., 2013; Milh *et al*., 2015). Degno di nota è che tale mutazione *de novo* a livello di un singolo allele Kv7.2 è sufficiente ad innescare il fenotipo epilettico, invece nella famiglia in studio la corrispondente mutazione nel

canale Kv7.3 (Kv7.3 D542N) non è associata ad alcun fenotipo neurologico. Pertanto, sono stati condotti ulteriori esperimenti al fine di comprendere il meccanismo molecolare alla base delle divergenze cliniche osservate tra individui che presentano la stessa variante nei canali Kv7.2 o Kv7.3.

Gli esperimenti di *patch-clamp* condotti su cellule CHO trasfettate con il canale Kv7.2 D535N mostravano che tale canale esprimeva correnti massimali misurabili, ma significativamente inferiori rispetto a quelle elicitate in cellule esprimenti il canale Kv7.2 (Fig. 27a, Tab. 2). Quando la subunità Kv7.2 D535N è stata co-espressa con le subunità Kv7.2 o Kv7.3 si osservava una significativa inbizione della densità di corrente rispetto a quella mostrata dai controlli utilizzati (Fig. 27b). Inoltre, similmente a quanto osservato per la variante Kv7.3 D542N, anche la subunità Kv7.2 D535N veniva incorporata nel canale eteromerico con le subunità Kv7.3: infatti, la corrente espressa dai canali eteromerici Kv7.2+Kv7.3 o Kv7.2 D535N+Kv7.3 esibiva un'identica sensibilità di blocco a 3 mM TEA (Fig. 27c). Il percento (%) di corrente inibita era di 3.2±2.6, 49.9±2.2 o 48.9±4.2 in cellule esprimenti rispettivamente Kv7.3, Kv7.2+Kv7.3 o Kv7.2 D535N+Kv7.3 ($n=3$-11; $p<0.05$ per Kv7.2+Kv7.3 e Kv7.2 D535N+Kv7.3 verso Kv7.3; $p>0.05$ per Kv7.2 D535N+Kv7.3 verso Kv7.2+Kv7.3).

Infine, i risultati di esperimenti effettuati per mimare il bilancio genico dei pazienti con epilessia suggerivano che la corrente espressa dai canali Kv7.2+Kv7.2 D535N+Kv7.3 (rapporto di trasfezione 0.5:0.5:1) era significativamente ridotta rispetto a quella registrata in cellule di controllo esprimenti i canali Kv7.2+Kv7.3 (rapporto di trasfezione 1:1) (Fig. 27d). In aggiunta, la corrente dei canali eteromerici mutanti risultava inferiore anche rispetto a quella di un altro controllo utilizzato rappresentato dal canale Kv7.2+Kv7.3 in cui era stata trasfettata solo metà quantità di cDNA del canale Kv7.2 (rapporto di trasfezione 0.5:1) (Fig. 27d), suggerendo un forte effetto dominante negativo esercitato dalla subunità mutante in studio. Inoltre, questi dati mostrano che mentre per il canale eteromerico incorporante la subunità mutante Kv7.2 D535N si osservava una forte alterazione funzionale, la corrispondente subunità mutante Kv7.3 D542N non causava alcuna modifica della funzionalità del canale eteromerico in cui era incorporata: questi risultati sono in linea con le divergenze cliniche osservate tra gli individui che presentano la stessa variante nei canali Kv7.2 o Kv7.3.

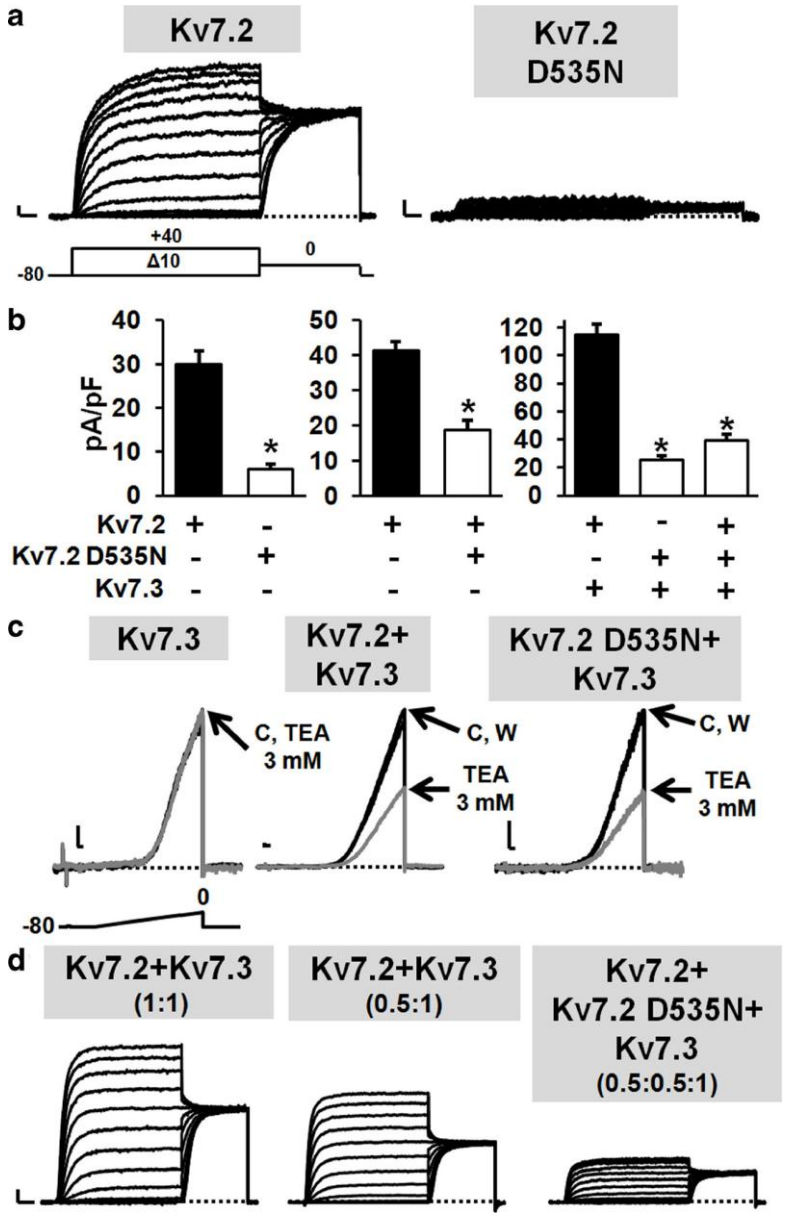

Figura 27. Proprietà funzionali dei canali omomerici o eteromerici incorporanti le subunità Kv7.2 D535N. (**a**) Tracce rappresentative registrate in cellule esprimenti i canali Kv7.2 o Kv7.2 D535N in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in basso. Scala di corrente: 200 pA; scala del tempo 100 ms. (**b**) Densità di corrente misurata al potenziale di 0 mV in cellule CHO esprimenti la combinazione di subunità indicate. Gli asterichi indicano valori significativamente diversi ($p<0.05$) dai rispettivi controlli. (**c**) Tracce rappresentative delle correnti misurate in cellule esprimenti le subunità indicate in risposta al protocollo di voltaggio (rampa) mostrato in soluzione di controllo (C), dopo 1'-2' di perfusione con 3 mM (c) TEA o in seguito alla rimozione del farmaco (W). Scala della corrente: 50 pA; scala del tempo 200 ms. (**d**) Tracce rappresentative di correnti registrate in celle CHO esprimenti i canali eteromerici indicati in risposta allo stesso protocollo di voltaggio mostrato in **a.** I numeri specificati tra parentesi indicano i rapporti di trasfezione usati per ogni gruppo sperimentale. Scala della corrente: 500 pA; scala del tempo 200 ms.

Per comprendere il ruolo della mutazione Kv7.2 D535N nella regolazione del canale mediata dal PIP_2 e per confrontare gli effetti funzionali di questa variante con quelli della corrispondente variante D542N in Kv7.3, sono stati condotti ulteriori esperimenti di elettrofisiologia in cui sono stati utilizzati due *tool*s sperimentali: la chinasi PIP5K che favorisce la sintesi della molecola di PIP_2, o la fosfatasi DrVSP che, al contrario, determina la deplezione dei livelli intracellulari di PIP_2. La co-espressione della PIP5K aumentava significativamente la corrente espressa dal canale omomerico Kv7.2 D535N (3.6±0.6 vs 24.3±3.7 pA/pF rispettivamente in assenza o in presenza di PIP5K; $p<0.05$) (Fig. 28), riportando la corrente agli stessi livelli di quella espressa dal canale omomerico Kv7.2 *wt* (30.0±2.9 pA/pF; $p>0.05$). Questi risultati suggeriscono che l'effetto di perdita di funzione associato alla mutazione in studio nel canale Kv7.2 può essere completamente revertito incrementando la disponibilità di PIP_2 endogeno.

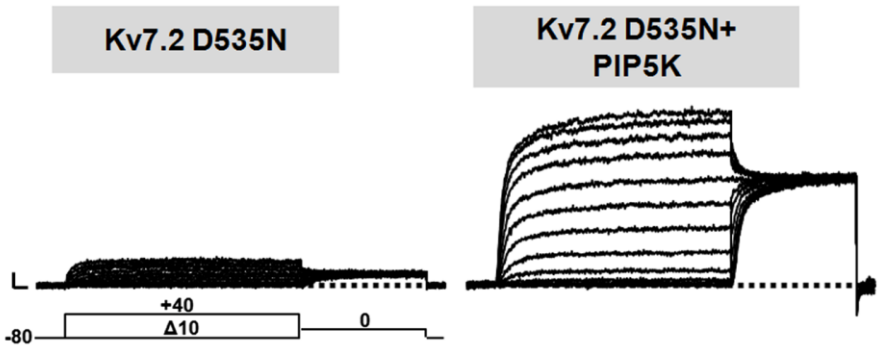

Figura 28. Studio dell'effetto della co-espressione di PIP5K sul canale omomerico Kv7.2 D535N. Tracce rappresentative ottenute da cellule esprimenti le subunità Kv7.2 D535N in assenza (sinistra) o in presenza (destra) di PIP5K in risposta al protocollo di voltaggio mostrato. Scala di corrente: 100 pA; scala del tempo: 100 ms.

Inoltre, le correnti elicitate dal canale Kv7.2 D535N recuperate dalla co-espressione con la PIP5K risultavano più sensibili all'inibizione indotta dalla DrVSP: questo effetto era visibile sia nella configurazione omomerica che in quella eteromerica con le subunità Kv7.2 e Kv7.3 (Fig. 29a). Infatti, per il canale omomerico *wt* si osservava una significativa inibizione della corrente dopo 0.8" di depolarizzazione, mentre per il canale omomerico mutante l'inibizione era significativa dopo 0.4". Allo stesso modo, per i canali eteromerici in co-espressione con la PIP5K, il blocco indotto dalla fostatasi

avveniva più velocemente nel canale eteromerico mutante (0.6”) rispetto a quello osservato per il canale eteromerico *wt* (1”).

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la mutazione Kv7.2 D535N esercita un drammatico effetto sulla regolazione mediata dal PIP_2, e che tale effetto risulta proporzionale al numero di subunità mutanti incorporate, in quanto appare di entità maggiore nella configurazione omomerica (4 subunità mutanti) rispetto a quella eteromerica (una subunità mutante). Negli esperimenti descritti, la co-espressione con la PIP5K era necessaria per aumentare la densità di corrente del canale omomerico Kv7.2 D535N a dei livelli sufficienti per condurre analisi biofisiche e trattamenti farmacologici; tuttavia, questa procedura sperimentale non rispecchiava le reali condizioni fisiologiche. Per questo motivo, al fine di studiare le conseguenze indotte dalla mutazione in condizioni fisiologiche, sono stati effettuati esperimenti in assenza di PIP5K. Sotto queste condizioni sperimentali, i canali eteromerici Kv7.2+Kv7.2 D535N +Kv7.3 (rapporto di trasfezione 0.5:0.5:1) mostravano un maggiore decremento della corrente indotto dalla DrVSP quando confrontati con i canali eteromerici Kv7.2+ Kv7.3 (rapporto di trasfezione 1:1), con circa il 60% di corrente inibita dopo 0.4” di depolarizzazione a +100 mV (Fig. 29a). Inoltre, un’aumentata inibizione della corrente associata alla deplezione del PIP_2 si osservava anche dopo 0.2” o 0.6” di depolarizzazione. Quindi, la sostituzione D535N nel canale Kv7.2, rispetto alla corrispondente variante D542N nel canale Kv7.3, causava effetti più drammatici sul blocco della corrente indotto dalla fosfatasi. Un effetto DrVSP-mediato quantitativamente simile a quello misurato nel canale eteromerico incorporante la subunità Kv7.2 mutante si osservava nei canali eteromerici incorporanti entrambe le subunità Kv7.3 mutanti (Fig. 29c).

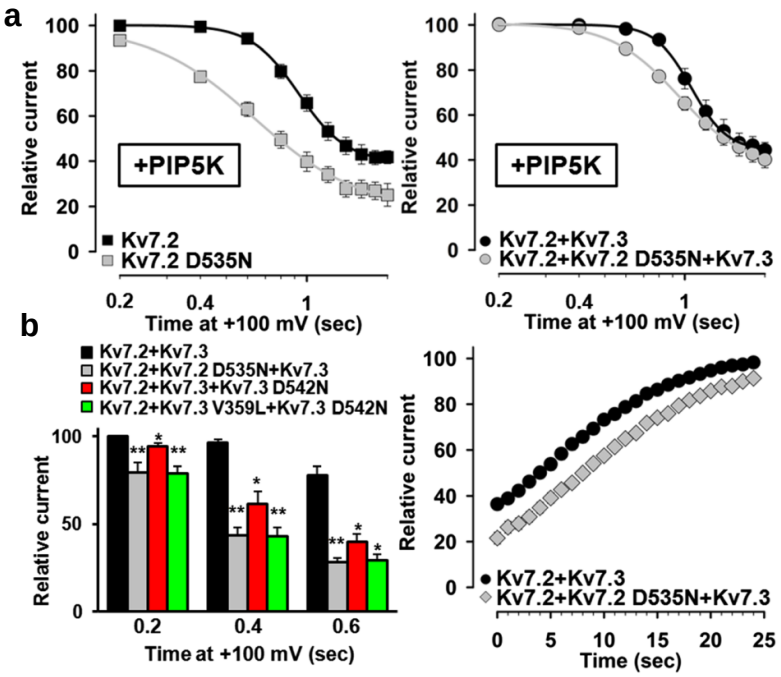

Figura 29. Studio dell'effetto associato a cambiamenti nella disponibilità del PIP_2 sui canali omomerici o eteromerici incorporanti la subunità Kv7.2 D535N. (**a**) Quantificazione dell'inibizione tempo-dipendente della corrente indotta dall'attivazione della DrVSP in cellule esprimenti i canali indicati in presenza dell'enzima PIP5K. (**b**) Tempo-dipendenza dell'effetto di blocco della corrente associato all'attivazione della DrVSP (pannello di sinistra) o allo spegnimento della DrVSP (pannello di destra) in cellule esprimenti le combinazioni di subunità mostrate. Un singolo asterisco indica valori significatiavemnte differenti ($p<0.05$) rispetto a Kv7.2+Kv7.3; il doppio asterisco indica valori significativamente diversi ($p<0.05$) rispetto a Kv7.2+Kv7.3+Kv7.2 D542N.

Per la variante Kv7.3 D542N appena descritta la CaM non esplicava alcun effetto: infatti, quando la CaM veniva co-espressa con il canale Kv7.2 D535N (Fig. 30) non si osservava alcun recupero della densità di corrente; al contrario, la co-espressione del canale mutante con la CaM_{1234} determinava un parziale recupero della corrente (Fig. 30), consentendo di ripristinare parte della funzionalità del canale. I valori di $V_{½}$ di Kv7.2 *wt* e Kv7.2 D535N+CaM_{1234} non risultavano significativamente diversi ($V_{½}$ era -27.0 mV e -27.6 mV, rispettivamente; n=12-16; $p>0.05$). Questi dati suggeriscono che la mutazione Kv7.2 D535N in parte interferisce anche con la regolazione mediata dalla CaM.

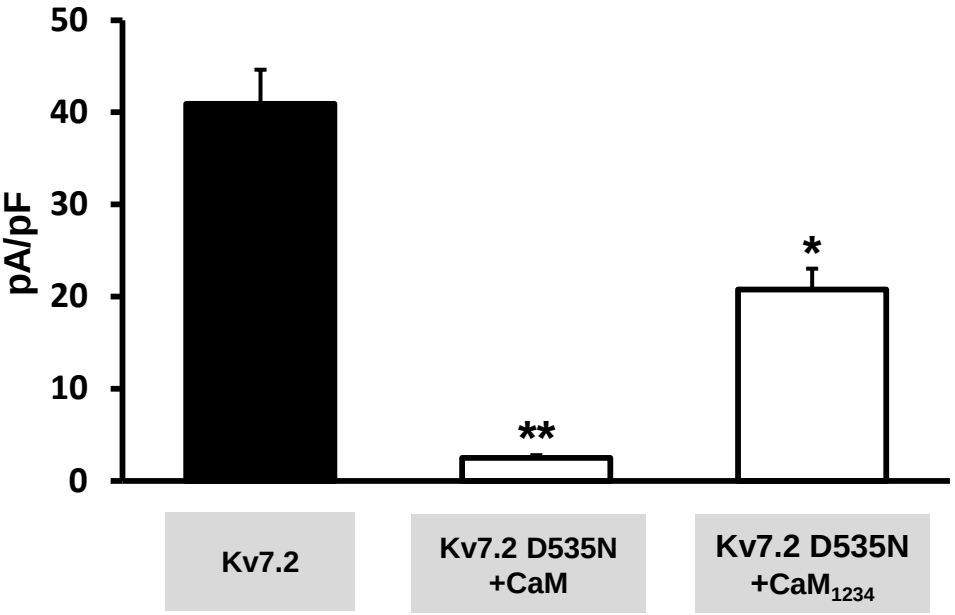

Figura 30. Studio dell'effetto della co-espressione di CaM o CaM_{1234} sul canale omomerico Kv7.2 D535N. Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule trasfettate con Kv7.2 *wt* o con Kv7.2 D535N in co-espressione con CaM o $CaM_{1234.}$ Il singolo asterisco indica valori significativamente diversi ($p<0.05$) dal controllo Kv7.2; il doppio asterisco indica valori significativamente diversi ($p<0.05$) da Kv7.2 e Kv7.2 D535N+CaM_{1234}**.**

4.2.5 Recupero farmacologico della funzionalità dei canali Kv7.2 o Kv7.3 incorporanti le varianti associate ad epilessia

Le terapie farmacologiche con i tradizionali farmaci anticonvulsivanti si sono mostrate poco efficaci nel trattamento dei pazienti affetti da EE; per tale motivo, abbiamo testato la capacità dell'attivatore retigabina (RTG) di contrastare l'alterazione funzionale indotta dalle mutazioni in studio. Tale composto alla concentrazione di 10 μM era capace di ripristinare, ai livelli del canale Kv7.2+Kv7.3, la corrente elicitata dai canali eteromerici mutanti incorporanti entrambe le subunità Kv7.3 mutanti (Kv7.2+Kv7.3 V359L+Kv7.3 D542N) o la subunità Kv7.2 mutante (Kv7.2+Kv7.2 D535N+Kv7.3) (Fig. 31).

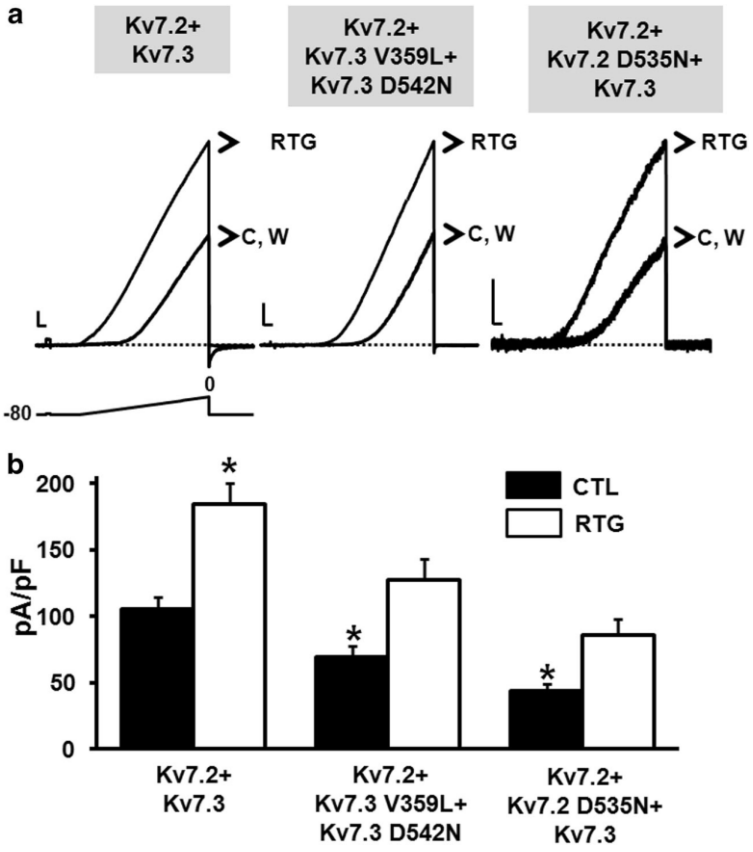

Figura 31. Effetto dell'attivatore retigabina sulle correnti elicitate dai canali incorporanti le mutazioni nei canali Kv7.2 o Kv7.3. (**a**) Tracce rappresentative misurate in cellule esprimenti i canali indicati in risposta al protocollo di voltaggio (rampa), mostrato in basso, in soluzione di controllo (C), dopo 1'-2' di perfusione con 10 μM RTG (RTG) ed in seguito alla rimozione del farmaco (W). Scala di corrente: 200 pA; scala del tempo: 200 ms (**b**) Densità di corrente misurata a 0 mV prima e dopo l'applicazione di 10 μM RTG in cellule esprimenti le subunità indicate. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi ($p<0.05$) da Kv7.2 +Kv7.3. Ogni dato deriva dalla media±SEM dei valori ottenuti da un numero di 9-29 cellule registrate in almeno 3 sessioni sperimentali.

In conclusione, le mutazioni studiate influenzano la regolazione della corrente dipendente dal PIP_2, ma l'effetto risulta maggiore quando la stessa mutazione è presente nel canale Kv7.2 o quando sono incorporate entrambe le subunità mutanti del canale Kv7.3. Inoltre, la mutazione Kv7.2 D535N sembra interferire anche con la modulazione mediata dalla CaM. Infine, gli esperimenti farmacologici condotti *in vitro* evidenziano che il trattamento con attivatori dei canali Kv7 potrebbe rappresentare una valida strategia personalizzata per tali pazienti.

4.3 STUDIO DELLA MUTAZIONE Kv7.2 G310S

La mutazione Kv7.2 G310S è stata riscontrata *de novo* in un probando affetto da una severa forma di EE resistente ai tradizionali farmaci anticonvulsivanti, quali levetiravetam ed acido valproico. Pertanto, sono stati condotti studi funzionali e farmacologici al fine di identificare i meccanismi patogenetici associati alla malattia e di individuare nuovi approcci terapeutici che risultino più efficaci di quelli tradizionali.

4.3.1 Caratterizzazione funzionale, biochimica e farmacologica dei canali omomerici ed eteromerici incorporanti la mutazione Kv7.2 G310S

Allo scopo di studiare le possibili alterazioni funzionali indotte dalla mutazione G310S, sono state condotte registrazioni di elettrofisiologia su cellule CHO trasfettate con il canale Kv7.2 *wt* o mutato. Com'è possibile osservare in Fig. 32a, applicando un protocollo di voltaggio che prevedeva *step* depolarizzanti da -80 a +40 mV, il canale omomerico Kv7.2 *wt*, usato come controllo, esprimeva una robusta corrente uscente (31.7±4.4 pA/pF) che si attivava intorno a -40 mV e che saturava a circa 0/20 mV. Al contrario, il canale omomerico mutante non esprimeva correnti significativamente superiori ai livelli di corrente basali misurati con lo stesso protocollo in cellule CHO non trasfettate (1.9±0.2 pA/pF e 0.8±0.1 pA/pF rispettivamente per Kv7.2 G310S e CHO NT).

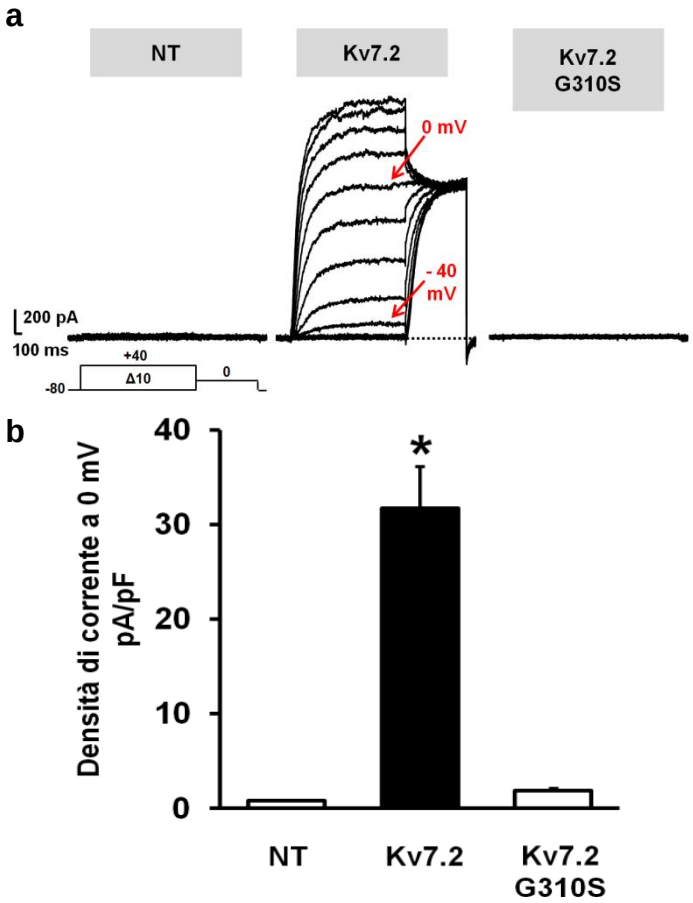

Figura 32. Caratterizzazione funzionale del canale omomerico Kv7.2 G310S. (**a**) Correnti espresse da cellule CHO non trasfettate o trasfettate con il canale Kv7.2 o Kv7.2 G310S in risposta al protocollo di voltaggio mostrato in basso. (**b**) Densità di corrente misurata al potenziale di 0 mV per i diversi canali, come indicato. L'asterisco indica valori significativamente diversi verso cellule NT o esprimenti la subunità mutante ($p<0.05$).

Per comprendere se l'alterazione funzionale indotta dalla mutazione potesse interferire con l'espressione totale o sulla membrana plasmatica delle subunità Kv7.2, sono stati condotti esperimenti di western-blotting che hanno rivelato un'espressione non significativamente diversa tra le subunità Kv7.2 *wt* e mutanti nei lisati totali, ed un incremento della subunità mutante a livello della frazione arricchita delle proteine di membrana (Fig. 33). La media dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica derivante dal rapporto della densità ottica delle bande nei lisati totali (OD_{Q2Tot}/OD_{Tub}) era di 1.00±0.20 per Kv7.2 o 1.28±0.23 per Kv7.2 G310S ($n=6$; $p>0.05$); mentre la media dei valori ottenuti dall'analisi densitometrica derivante dal rapporto della densità ottica nella frazione delle proteine biotinilate (OD_{Q2Biot}/OD_{Tub}) era di 1.00±0.50 per Kv7.2 e 5.17±1.50 per Kv7.2 G310S ($n=4$, $p<0.05$).

Pertanto, questi risultati suggeriscono che la perdita di funzione indotta dalla mutazione Kv7.2 G310S non dipende da una riduzione della sintesi del canale o del suo trasporto sulla membrana plasmatica.

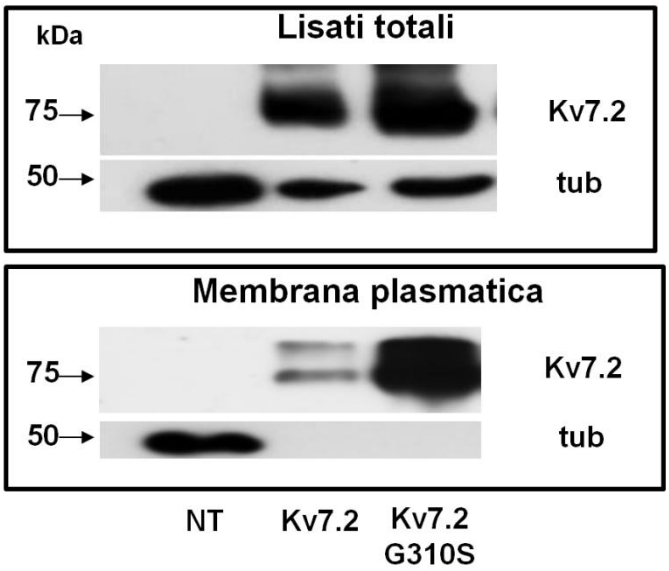

Figura 33. Caratterizzazione biochimica delle subunità Kv7.2 G310S. Immagine rappresentativa di un esperimento di western-blotting condotto sui lisati totali (in alto) o sulle frazioni biotinilate (in basso) ottenuti da cellule CHO non trasfettate o trasfettate con i canali Kv7.2 *wt* o Kv7.2 G310S. Sono stati usati anticorpi anti-Kv7.2 o anti-tubulina, come indicato. I numeri riportati a sinistra corrispondono alla massa molecolare dei frammenti del marcatore proteico utilizzato.

Per investigare se la subunità mutata potesse interferire con la funzione delle subunità Kv7.2 e Kv7.3 *wt*, sono stati effettuati esperimenti di co-espressione: com'è visibile in Fig. 34, la co-espressione della subunità mutata esercitava un effetto dominante-negativo sulla corrente espressa dalle subunità Kv7.2 (a) o Kv7.3 (b) *wt*.

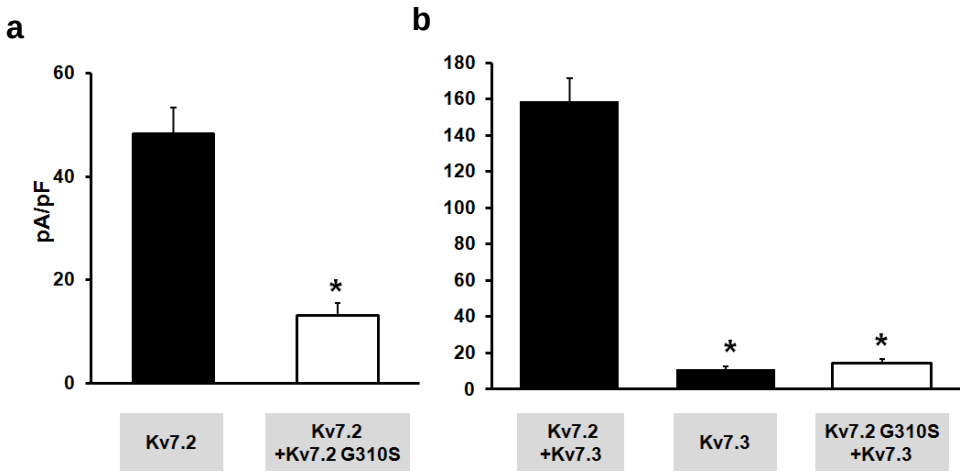

Figura 34. Studio dell'interferenza delle subunità Kv7.2 G310S con le subunita Kv7.2 o Kv7.3 *wt*. Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule CHO co-esprimenti subunità Kv7.2 G310S con subunità Kv7.2 (**a**) o Kv7.3 (**b**) *wild-type*. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi dai rispettivi controlli ($p<0.05$).

Nella figura, la corrente elicitata dal canale eteromerico mutante Kv7.2 G310S+Kv7.3 risulta non significativamente diversa dalla corrente espressa dal canale omomerico Kv7.3 *wt*, per cui sono stati condotti ulteriori esperimenti per comprendere se la subunità mutata si incorporasse o meno nel canale eteromerico. A tale scopo, sono stati condotti esperimenti di elettrofisiologia utilizzando il bloccante TEA e sfruttando la differente sensibilità farmacologica a questo composto dei canali Kv7.2, molto sensibili a 3 mM TEA, e Kv7.3, poco sensibili alla stessa concentrazione di TEA. Pertanto, le correnti espresse dal canale eteromerico mutante Kv7.2 G310S+Kv7.3 mostravano la medesima sensibilità intermedia al TEA osservata per il canale eteromerico Kv7.2+Kv7.3 (Fig. 35), suggerendo che la subunità mutante si incorpora correttamente nel canale eteromerico.

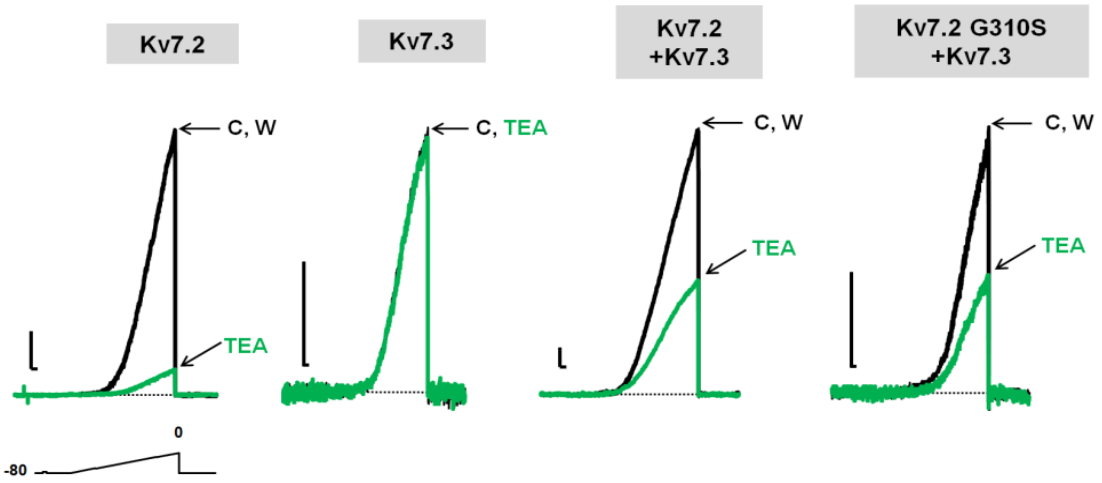

Figura 35. Sensibilità al TEA di canali eteromerici incorporanti le subunità Kv7.2 G310S. Tracce rappresentative delle correnti misurate in cellule esprimenti le subunità indicate in risposta al protocollo di voltaggio (rampa), mostrato in basso, in soluzione di controllo (C), dopo 1' di perfusione di 3 mM TEA o in seguito alla rimozione del farmaco (W).

Il paziente in studio affetto da EE presenta la mutazione su un singolo allele: pertanto, al fine di riprodurne il bilancio genico, sono stati condotti ulteriori esperimenti di elettrofisiologia co-esprimendo le subunità Kv7.2+Kv7.3 *wt* in un rapporto di trasfezione di 1:1 (per riprodurre la genetica dei soggetti sani), oppure, per riprodurre la genetica del soggetto affetto, il cDNA di Kv7.2 è stato diviso in metà *wt* e metà mutante (rapporto di trasfezione tra Kv7.2+Kv7.2 G10S+Kv7.3 pari a 0.5:0.5:1). Infine, è stato usato un ulteriore gruppo di controllo in cui è stata trasfettata solo la quantità di cDNA di Kv7.2 *wt* presente nel soggetto affetto al fine di verificare che in queste condizioni ci fosse una linearità tra quantità di cDNA trasfettato e corrente misurata. Dal grafico in basso si osserva che la densità di corrente del canale eteromerico mutante risultava significativamente inferiore rispetto a quella di entrambi i controlli utilizzati (Fig. 36), suggerendo un effetto di perdita di funzione indotta dalla subunità Kv7.2 mutante sui canali eteromerici e anche un'interferenza con la funzionalità delle subunità *wt*.

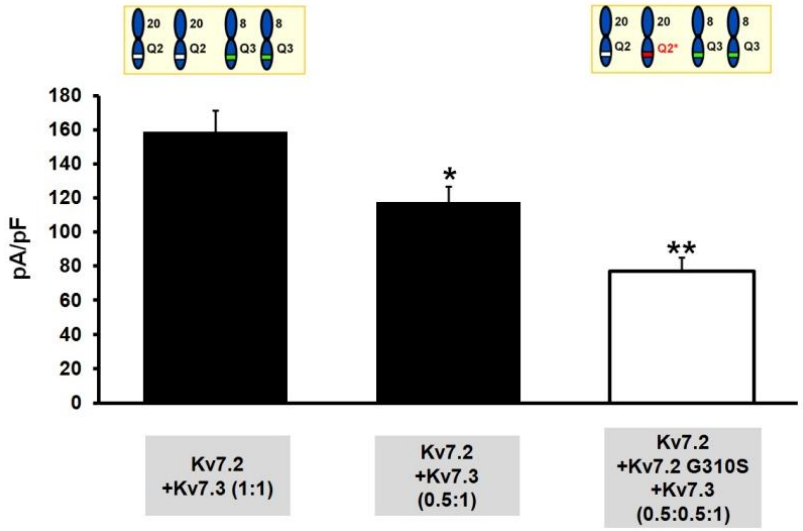

Figura 36. Proprietà funzionali dei canali eteromerici Kv7.2+ Kv7.3 incorporanti le subunità Kv7.2 G310S. Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule CHO trasfettate con i canali eteromerici indicati. Il singolo asterisco indica valori significativamente diversi ($p<0.05$) da Kv7.2+Kv7.3 (1:1); il doppio asterisco indica valori significativamente diversi ($p<0.05$) da entrambi i controlli. I pannelli mostrati sopra le barre raffigurano gli alleli *kcnq2* e *kcnq3* per il soggetto sano (a sinistra) o con EE (a destra).

Sulla base di questi risultati e data la scarsa efficacia dei farmaci antiepilettici tradizionali nel trattamento del paziente in studio affetto da EE, è stata valutata la capacità del farmaco attivatore retigabina di contrastare l'alterazione funzionale indotta dalla mutazione investigata. Infatti, la RTG alla concentrazione di 10 µM è capace di ripristinare, ai livelli del *wt*, la corrente elicitata dai canali eteromerici incorporanti la subunità mutante di Kv7.2 (Fig. 37), suggerendo un possibile impiego terapeutico di questo farmaco o dei suoi derivati.

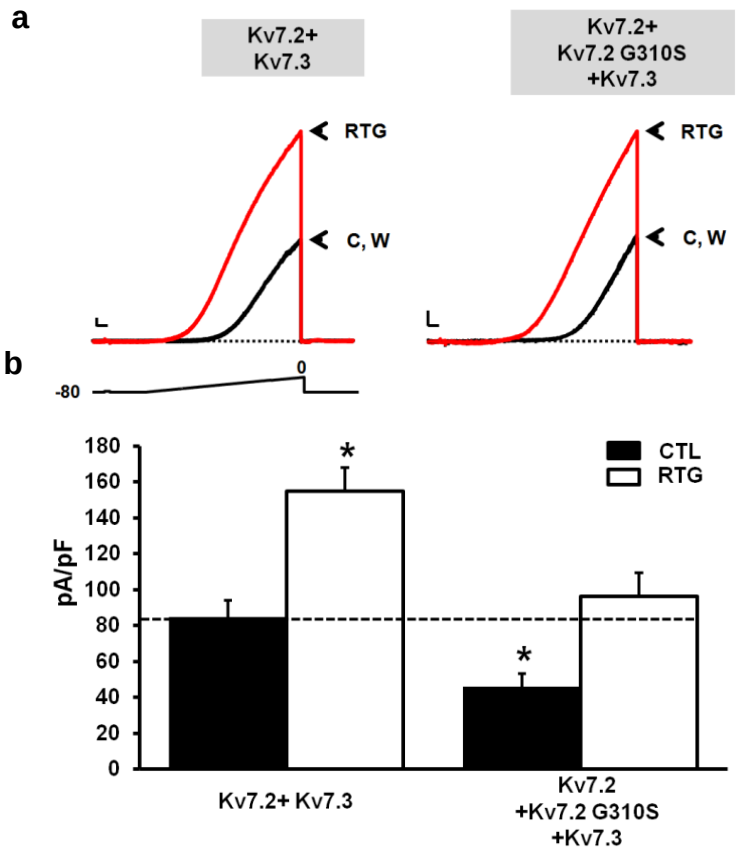

Figura 37. Effetto dell'attivatore Retigabina (RTG) sulle correnti elicitate dai canali eteromerici incorporanti le subunità Kv7.2 G310S. (**a**) Tracce rappresentative misurate in cellule esprimenti le subunità indicate in risposta al protocollo di voltaggio (rampa), mostrato in basso, in soluzione di controllo (C), dopo 1' di perfusione con 10 µM RTG (RTG) ed in seguito alla rimozione del farmaco (W). (**b**) Densità di corrente misurata a 0 mV prima e dopo l'applicazione di 10 µM RTG in cellule esprimenti le subunità indicate. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi ($p<0.05$) verso la prima barra nera.

4.3.2 La mutazione Kv7.2 G310S influenza la regolazione mediata dal PIP_2 e dalla calmodulina

Per comprendere da un punto di vista strutturale il motivo per cui la mutazione induce una perdita di funzione del canale Kv7.2, ci siamo avvalsi del modello tridimensionale del canale precedentemente utilizzato (Fig.17) in cui si vede che il residuo G310 in studio è localizzato nelle strette vicinanze del residuo R325 già descritto, la cui mutazione è stata riscontrata in diverse famiglie affette da EE. In questo pocket amminoacidico è presente il dominio di legame sia per il PIP_2 che per la CaM che, come spiegato nella parte introduttiva, regolano i canali Kv7 attraverso un meccanismo di

modulazione sequenziale. Pertanto, è stata testata l'ipotesi che tale mutazione interferisca con la regolazione della corrente Kv7.2 mediata da parte di tali molecole.

Per studiare la sensibilità al PIP_2 ne sono stati ridotti i livelli attraverso la fosfatasi DrVSP che converte il PIP_2 a PIP monofosfato. Dagli esperimenti si evince che per il canale eteromerico *wt* (Kv7.2+Kv7.3) erano necessari 0.6" di depolarizzazione per ottenere un effetto di inibizione significativo, mentre per il canale eteromerico mutante (Kv7.2+Kv7.2 G310S+Kv7.3) l'inibizione era significativa a tempi minori (0.2") (Fig. 38a), suggerendo che il canale mutante è più sensibile alla deplezione di PIP_2 indotta dalla fosfatasi. In Fig. 38b si può osservare come anche la cinetica di recupero della corrente risulti essere più lenta per il canale eteromerico mutante rispetto a quella osservata per il canale eteromerico *wt*: questa differenza si osservava soprattutto nella parte iniziale del grafico (Fig. 38b) in quanto dopo 10", il canale *wt* recuperava il 70% della corrente massima, mentre per il canale mutante, dopo il medesimo tempo, la corrente recuperata era del 58%. Questi dati confermano che la mutazione interferisce significativamente con la regolazione mediata dal PIP_2.

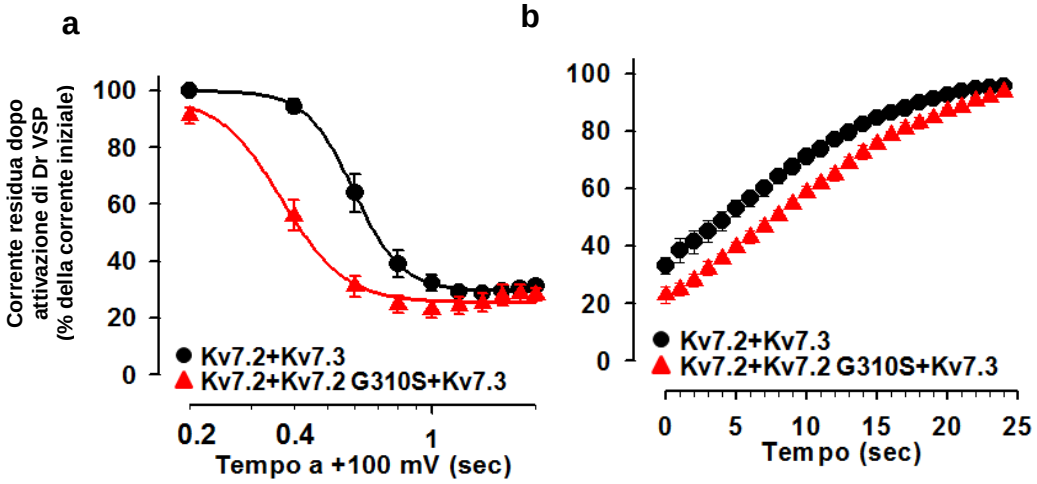

Figura 38. Effetti indotti dalla DrVSP sulle correnti misurate in cellule trasfettate con i canali eteromerici *wt* o incorporanti le subunità mutanti. Quantificazione della corrente residua dopo stimolazione a 100 mV (**a**) o del recupero della corrente a 0 mV (**b**) in cellule esprimenti le subunità Kv7.2+Kv7.3 (traccia nera) o Kv7.2+Kv7.2 G310S+Kv7.3 (traccia rossa).

Un ulteriore modo per studiare la sensibilità al PIP_2 e la modulazione sequenziale con la CaM è quello di co-esprimere la chinasi PIP5K, che aumenta i livelli di PIP_2, o la CaM. Dal grafico si osserva che co-esprimendo il canale *wt* con la chinasi, con la CaM *wt* o con la CaM_{1234} si assisteva ad un significativo incremento della corrente. Tuttavia, per il

canale *wt* la co-espressione della chinasi con la CaM *wt* o mutata non induceva un ulteriore potenziamento, confermando che il PIP_2 e la CaM convergono su un unico *pathway* (Fig. 39; pannelli di sinistra). Al contrario, laddove vi è un deficit nella regolazione da PIP_2, come nel caso del canale mutante, si osservava un comportamento diverso: infatti, co-esprimendo la chinasi con il canale Kv7.2 G310S, si assisteva ad un completo recupero della corrente ai livelli di quella del *wt*; inoltre, anche la co-espressione della CaM_{1234} determinava un significativo incremento della corrente. Degno di nota è che co-esprimendo PIP5K+CaM_{1234} si osservava un effetto additivo, che riportava i livelli di corrente espressi dal canale mutante agli stessi livelli osservati per il canale *wt* in co-espressione con PIP5K e CaM_{1234} (Fig. 39; pannelli di destra). Tali risultati suggeriscono che nel caso del canale Kv7.2 G310S risulta compromessa sia la regolazione da PIP_2 che da CaM.

Questi risultati appaiono innovativi in quanto nel caso della mutazione Kv7.2 R325G, soltanto la co-espressione con la chinasi consentiva un recupero della corrente, mentre la co-espressione della CaM, *wt* o mutata, non determinava alcun effetto significativo (Fig. 18b); invece, per la mutazione Kv7.2 D535N la CaM mutata consentiva un parziale, ma non significativo, recupero della corrente (Fig. 30).

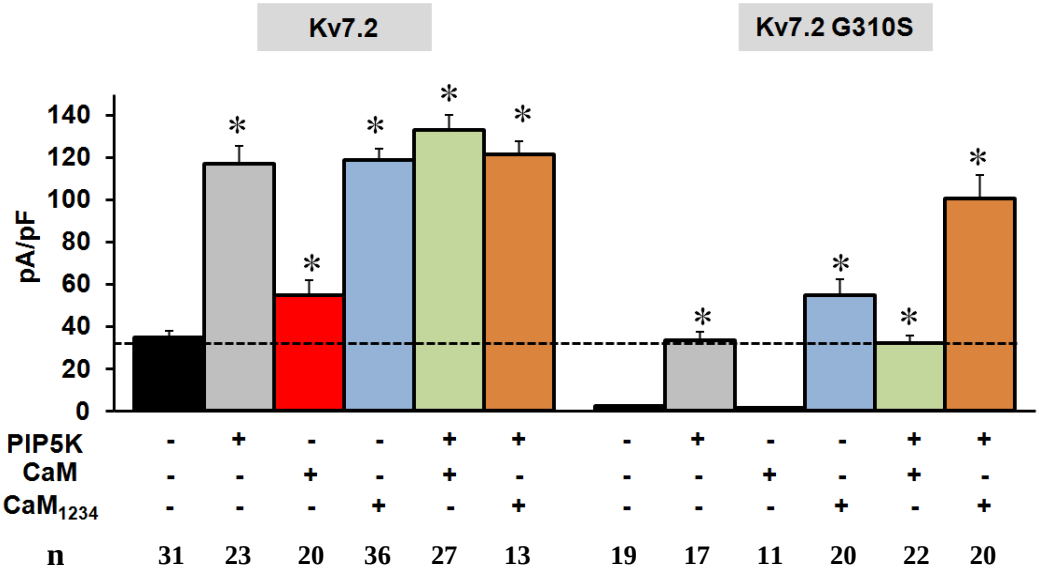

Figura 39. Studio dell'effetto della co-espressione di PIP5K, CaM e/o CaM_{1234} sui canali omomerici Kv7.2 o Kv7.2 G310S. Densità di corrente misurata a 0 mV in cellule trasfettate con il canale Kv7.2 *wt* o Kv7.2 G310S in assenza o in co-espressione con PIP5K, CaM e/o CaM_{1234}. Gli asterischi indicano valori significativamente diversi ($p<0.05$) verso la prima barra nera del grafico. Nell'ultima riga è indicato il numero (n) di cellule registrate per ogni gruppo sperimentale.

In conclusione, la mutazione Kv7.2 G310S causa una completa perdita di funzione del canale probabilmente in seguito all'alterazione della regolazione di tali canali operata dal PIP_2 e, probabilmente, anche da parte della CaM. Inoltre, questi risultati forniscono un razionale per l'uso di attivatori dei canali Kv7, quali la retigabina o derivati, per il trattamento farmacologico del paziente affetto da EE portatore della mutazione Kv7.2 G310S che risulta resistente alla terapia con farmaci antiepilettici tradizionali.

5. DISCUSSIONE

L'epilessia è una malattia neurologica caratterizzata da una persistente predisposizione a sviluppare crisi epilettiche e dalle conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali che ne derivano (Lega Internazionale contro l'epilessia, 2014). Un'alta percentuale di forme epilettiche è resistente ai trattamenti farmacologici ed è associata a gravi effetti a livello delle funzioni cognitive e cerebrali: tale condizione viene definita Encefalopatia Epilettica. Solitamente, questo disturbo clinico è causato da mutazioni riscontrate in diversi geni che codificano per canali ionici, recettori o per altre proteine. Tra questi vi sono i geni *kcnq2* e *kcnq3* che codificano rispettivamente per le subunità chiamate Kv7.2 e Kv7.3: l'assemblaggio di tipo eteromerico di queste subunità è responsabile della formazione di canali del potassio (o selettivi al potassio) voltaggio-dipendenti che sottendono la cosiddetta corrente M, conosciuta per il suo ruolo chiave nella regolazione dell'eccitabilità neuronale. Strutturalmente, i canali Kv7 sono tetrameri e ogni subunità è costituita da 6 segmenti transmembrana denominati da S_1 a S_6, da un'estremità N-terminale e da un lungo dominio C-terminale a cui si legano diverse molecole modulatorie che regolano le funzioni dei canali Kv7. Tra queste, le più rilevanti sono il PIP_2, che funge da attivatore del canale (Zhang *et al*., 2003; Kruse *et al*., 2012), e la calmodulina, che ne regola il ripiegamento ed il trasporto alla membrana plasmatica (Gomis-Perez *et al*., 2017; Alaimo and Villarroel, 2018). Sulla base dell'importante ruolo modulatorio svolto da queste molecole, è stato osservato che l'accoppiamento sequenziale tra la riduzione dei livelli di PIP_2 e la dissociazione della calmodulina dal canale determina il silenziamento della corrente M e quindi l'aumento dell'eccitabilità neuronale (Kosenko *et al*., 2012).

Le mutazioni nei geni *kcnq2* o *kcnq3* sono responsabili delle crisi neonatali ad esordio precoce con ampi esiti clinici, che vanno dalle convulsioni benigne familiari neonatali (BFNE) alla grave encefalopatia epilettica (EE) (Weckhuysen *et al*., 2012-2013; Allen *et al*., 2013; Miceli *et al*., 2017). I meccanismi molecolari alla base di tale eterogeneità fenotipica sono ancora dibattuti, ma nei pazienti affetti (benigni o gravi) la gravità della malattia e il decorso clinico sono probabilmente influenzati dal tipo di variante identificata, in quanto la maggior parte delle mutazioni associate a BFNE sono, ad oggi, distinte da quelle trovate nei pazienti EE. Studi *in vitro* rivelano che le diverse

mutazioni associate all'insorgenza di EE causano conseguenze più gravi sulle proteine Kv7.2 o Kv7.3, quali maggiore perdita di funzione, effetti di dominanza-negativa o alterazioni nella distribuzione subcellulare neuronale, suggerendo una potenziale relazione diretta tra alterazione molecolare e gravità clinica del fenotipo. Questo concetto consente anche di stabilire correlazioni genotipo-fenotipo.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di investigare sulle conseguenze funzionali, sui meccanismi molecolari e sulla sensibilità farmacologica di specifiche mutazioni riscontrate nei geni *kcnq2* (R325G, D535N, G310S) o *kcnq3* (V359L, D542N), e identificate in pazienti affetti da EE. Tutte le mutazioni in studio sono localizzate a livello del C-terminale del canale, ad eccezione della mutazione G310S presente nel segmento S_6. Il probando portatore di entrambe le mutazioni Kv7.3 V359L e Kv7.3 D542N risulta il primo caso di eterozigosi composta descritta nel gene *kcnq3*. Degno di nota, i canali Kv7.2 D535N e Kv7.3 D542N presentano lo stesso residuo mutato: tuttavia, la variante in Kv7.2 è associata a fenotipo patologico, invece, la stessa variante in Kv7.3 non è causativa di patologia. Pertanto, sono state studiate le possibili differenze funzionali associate alla stessa sostituzione amminoacidica a livello dello stesso residuo nei canali Kv7.2 e Kv7.3, al fine di spiegare le divergenze cliniche osservate.

I risultati ottenuti sono stati sintetizzati nelle seguenti tabelle:

		R325G	D535N	G310S
Kv7.2	**Canali omomerici**	Non funzionale	Poco funzionale	Non funzionale
	Canali eteromerici	↓ densità di corrente	↓ densità di corrente	↓ densità di corrente
	Incorporazione in tetrameri con subunità Kv7.3 *wt*	Sì	Sì	Sì
	Espressione totale o sulla membrana plasmatica	Invariata	Invariata	Aumentata (in membrana)
	Co-espressione con la PIP5K	↑ densità di corrente	↑ densità di corrente	↑ densità di corrente
	Co-espressione con la CaM	Nessun effetto	Nessun effetto	Nessun effetto
	Co-espressione con la CaM_{1234}	Nessun effetto	Parziale recupero funzionale	↑ densità di corrente
	Effetto DrVSP	↑ inibizione ↓ recupero	↑ inibizione ↓ recupero	↑ inibizione ↓ recupero
	Fenotipo funzionale	Perdita di funzione	Perdita di funzione	Perdita di funzione

		V359L	D542N	V359L+D542N
Kv7.3	**Canali omomerici**	Non funzionale	Non funzionale	Non funzionale
	Canali eteromerici	densità di corrente invariata	densità di corrente invariata	↓ densità di corrente
	Incorporazione in tetrameri con subunità Kv7.2 *wt*	Sì	Sì	—
	Espressione totale o sulla membrana plasmatica	Invariata	Invariata	—
	Co-espressione con la PIP5K	Nessun effetto	Nessun effetto	—
	Co-espressione con la CaM	Nessun effetto	Nessun effetto	—
	Co-espressione con la CaM_{1234}	Nessun effetto	Nessun effetto	—
	Effetto DrVSP	↑ inibizione (0.4”) ↓ recupero	↑ inibizione (0.4”) ↓ recupero	↑ inibizione (0.2”) ↓ recupero
	Fenotipo funzionale	Perdita di funzione	Perdita di funzione	Perdita di funzione

Sulla base dei risultati ottenuti sono state fatte specifiche considerazioni:

5.1 Tutte le mutazioni in studio causano effetti di perdita di funzione dei canali Kv7.2 o Kv7.3

Le registrazioni elettrofisiologiche condotte su cellule CHO trasfettate con i canali Kv7.2 (R325G, D535N, G310S) o Kv7.3 (V359L o D542N) mutanti in configurazione omomerica rivelano una totale perdita di funzione di tali canali. Esperimenti di western-blotting condotti su lisati totali o su porzioni arricchite di proteine di membrana ottenuti da cellule CHO esprimenti ciascuna subunità rivelano simili livelli di espressione rispetto alle subuità Kv7.2 o Kv7.3 *wild-type*, suggerendo che tali effetti di perdita di funzione non siano ascrivibili ad una mancata espressione o ad un'alterazione del *trafficking* verso la membrana plasmatica delle subunità Kv7.2 o Kv7.3. Al contrario, per il canale Kv7.2 G310S è stato anche osservato un incremento della sua espressione alla membrana plasmatica: i meccanismi molecolari alla base di tale effetto non sono stati studiati in quanto esulano dallo scopo principale del presente lavoro. Tuttavia, sono in corso esperimenti di espressione neuronale delle subunità Kv7.2 esprimenti tale mutazione allo scopo di studiare il *trafficking* di tali subunità mutanti in un contesto più fisiologico per l'espressione del canale stesso. Avendo osservato una significativa espressione in membrana per tutte le subunità mutanti in studio, sono stati condotti ulteriori esperimenti funzionali per studiare i possibili effetti delle subunità mutanti sulle correnti espresse dai canali Kv7.2 o Kv7.3 *wild-type*. In questi esperimenti, si osservava una drammatica riduzione della corrente normalmente espressa dalle subunità *wild-type*, ossia quello che è noto come effetto dominante. Questi risultati sono in linea con quanto riportato dalla letteratura: infatti, la maggior parte delle mutazioni causative di EE causano una perdita di funzione del canale Kv7.2 o Kv7.3 associata ad effetti di dominanza-negativa (Orhan *et al*., 2014) e ciò, probabilmente, contribuisce alla gravità del fenotipo epilettico osservato.

Al fine di riprodurre il bilancio genico dei pazienti affetti da EE e considerato che la corrente M è principalmente sottesa dalle subunità Kv7.2 e Kv7.3, sono stati condotti esperimenti di elettrofisiologia su cellule CHO co-esprimenti le subunità *wild-type* e mutanti in configurazione eteromerica. Per tutte le mutazioni investigate riscontrate nella subunità Kv7.2, i dati ottenuti hanno mostrato una significativa riduzione della

densità di corrente del canale eteromerico incorporante la subunità mutante rispetto a quella misurata per il canale eteromerico *wild-type*. Per le varianti in studio identificate nel canale Kv7.3, è stato osservato un effetto di perdita di funzione del canale eteromerico solo quando le subunità Kv7.3 mutanti erano co-espresse contemporaneamente, ossia solo nella configurazione che mima la genetica del probando. In generale, per tutte le mutazioni studiate la riduzione della corrente misurata per i canali eteromerici mutanti risultava meno drammatica rispetto a quella osservata per le forme omomeriche in cui la presenza della mutazione causava una completa perdita di funzione del canale: questo suggerisce che nelle forme eteromeriche la contemporanea espressione delle subunità *wild-type* e mutanti recupera, anche se parzialmente, la funzionalità del canale.

Tuttavia, il decremento della densità di corrente osservato per i canali eteromerici mutanti potrebbe essere sufficiente per alterare l'eccitabilità neuronale scatenando il fenotipo epilettico osservato nei pazienti in studio. Tale ipotesi è supportata da numerose evidenze in letturatura (Schroender *et al*., 1998; Jentsch 2000). In particolare, in un recente lavoro condotto dal nostro gruppo di ricerca sono stati utilizzati modelli computazionali di cellule piramidali della regione CA1 dell'ippocampo allo scopo di studiare l'effetto sull'eccitabilità neuronale causato da mutazioni in Kv7.2 associate ad epilessia (Miceli *et al*., 2013): anche in questo caso, l'espressione di subunità mutanti in canali eteromerici Kv7.2/Kv7.3 determinava una parziale riduzione dei livelli di corrente espressi rispetto ai canali *wild-type*; quando i parametri relativi alla cinetica e allo stato-stazionario dei canali eteromerici incorporanti tali mutazioni venivano incorporati nel modello neuronale era osservabile un maggior numero di spike rispetto ai modelli di neuroni di controllo, suggerendo un aumento dell'eccitabilità neuronale dovuto alla presenza della mutazione nel canale in configurazione eteromerica (Miceli *et al*., 2013).

5.2 La maggior parte delle mutazioni investigate sono localizzate al C-terminale della subunità Kv7

Le varianti in studio sono principalmente localizzate a livello dell'estremità C-terminale del canale Kv7.2 o Kv7.3, eccetto per la mutazione G310S presente nel segmento S_6 della subunità Kv7.2. Nello specifico, le mutazioni Kv7.2 R325G e Kv7.3 V359L si

trovano nel breve linker di connessione tra il segmento S_6 e l'elica A, invece, la mutazione Kv7.3 D542N e la corrispondente variante D535N nella subunità Kv7.2 sono localizzate nella regione tra le eliche B e C.

Il dominio C-terminale delle subunità Kv7 adempie un ruolo fondamentale nel regolare le funzioni svolte dal canale, in quanto presenta differenti siti coinvolti nell'interazione con importanti molecole modulatorie: tra queste, le più rilevanti sono il PIP_2 e la calmodulina. Nella subunità Kv7, il dominio di legame alla calmodulina è costituito da due siti discontinui nell'elica A e B (Yus-Najera *et al*., 2002). Il PIP_2 presenta almeno 4 domini di legame: due siti sono localizzati nelle regioni linker S_2-S_3 e S_4-S_5 (Zhang *et al*., 2013), una terza regione è presente al C-terminale ed è immediatamente adiacente al dominio S_6 (Telezhkin *et al*., 2013), ed il quarto sito di legame è localizzato al C-terminale tra le eliche A e B (Hernandez *et al*., 2008). Pertanto, i residui amminoacidici mutati in studio sono situati in siti sovrapposti a quelli di legame per il PIP_2 e per la calmodulina. I dati ottenuti dai modelli strutturali hanno permesso di confermare tale valutazione: infatti, dagli esperimenti di *docking* molecolare è emerso che il PIP_2, carico negativamente, è coinvolto in un complesso network di interazioni elettrostatiche in cui partecipano anche le catena laterali dei residui R325 e D535 nella subunità Kv7.2, mentre nella subunità Kv7.3 il residuo V359 interagisce con il PIP_2 attraverso interazioni idrofobiche. Per il residuo Kv7.3 D542 non è stata osservata un'interazione diretta, bensì un'interazione elettrostatica indiretta mediata dal residuo R364 (che corrisponde al residuo R325 nel canale Kv7.2). Allo stesso modo, a livello della subunità Kv7.2 anche il residuo G310 è situato nelle strette vicinanze del residuo R325, suggerendo il suo coinvolgimento nel sito di legame con il PIP_2.

5.3 I canali incorporanti le subunità Kv7.2 o Kv7.3 mutanti mostrano un'alterazione nella regolazione della corrente M mediata dal PIP_2

Sulla base delle informazioni ottenute dai modelli strutturali, abbiamo investigato se l'effetto di perdita di funzione indotto dalle subunità mutanti fosse causato da una ridotta sensibilità nella regolazione dipendente dal PIP_2. A tale scopo, i livelli endogeni di PIP_2 sono stati incrementati grazie all'ausilio della PIP5K. La co-espressione di tale chinasi con i canali Kv7.2 omomerici mutanti favoriva un significativo recupero parziale (nel caso del canale Kv7.2 R325G) o totale (nel caso dei canali Kv7.2 D535N e

Kv7.2 G310S) della densità di corrente. Un simile effetto è stato ottenuto in un recente lavoro mediante l'aggiunta di diC8-PIP_2 direttamente nella soluzione intracellulare che consentiva di recuperare la funzionalità del canale mutante Kv7.2 K526N associato ad EE, suggerendo un'alterazione nella regolazione PIP_2-dipendente anche per tale mutazione (Kim *et al*., 2018). Per quanto concerne i canali Kv7.3 omomerici mutanti da noi studiati, la co-espressione della chinasi non era in grado di recuperare il deficit funzionale osservato: questo dato è in linea con quanto descritto in letteratura poiché la corrente del canale Kv7.3, al contrario di quella espressa da Kv7.2, è fortemente ridotta in seguito ad un incremento dei livelli intracellulari di PIP_2, probabilmente a causa di un'aumentata endocitosi e/o di una maggiore degradazione proteica (Balla 2013; Posor *et al*., 2014). Da sottolineare è anche l'evidenza che il canale Kv7.3 mostra una maggiore affinità nei confronti del PIP_2 rispetto al canale Kv7.2 (Li *et al*., 2005), e questo potrebbe essere il motivo per cui la co-espressione della PIP5K con il canale Kv7.3 non determina un aumento della densità di corrente.

Un altro modo per studiare la regolazione dei canali Kv7.2 o Kv7.3 dal PIP_2 è stato utilizzando la fosfatasi DrVSP che favorisce la riduzione di questo fosfolipide a livello della membrana plasmatica, con conseguente inibizione della corrente M. In co-espressione con la DrVSP, la corrente espressa dai canali eteromerici incorporanti le subunità mutanti in studio risultava maggiormente inibita, rispetto alla riduzione osservata per la corrente elicitata dai canali eteromerici *wild-type*; dopo inattivazione della fosfatasi, anche la cinetica di recupero della corrente risultava più lenta nei canali mutanti rispetto a quella misurata per il canale *wild-type*. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che le mutazioni in studio alterano la regolazione della corrente M mediata dal PIP_2 e confermano il ruolo fondamentale svolto da tale fosfolipide per la corretta funzionalità dei canali Kv7. Sebbene non siano noti i livelli di PIP_2 presenti nelle cellule CHO piuttosto che in cellule neuronali, studi recenti hanno dimostrato l'importanza cruciale del PIP_2 nel regolare l'ipereccitabilità neuronale: in particolare, è stato osservato che in neuroni ippocampali la riduzione dei livelli di PIP_2 interferisce con la fase di iperpolarizzazione postuma (AHP) in cui i canali Kv7 sono coinvolti, aumentando il tempo in cui il neurone rimane depolarizzato e, quindi, causando un incremento dell'eccitabilità neuronale (Kim *et al*., 2016). Similmente, è stato osservato che neuroni ippocampali esprimenti il canale Kv7.2 *wild-type* mostrano un decremento

del *firing* neuronale, laddove l'espressione del canale mutante Kv7.2 K526N associato ad un'alterazione della regolazione da PIP_2 non consentiva di ridurre tale parametro (Kim *et al*., 2018), confermando che l'alterazione della regolazione dei canali Kv7.2/3 dal PIP_2 è associata a cambiamenti dell'eccitabilità neuronale.

5.4 Alcune delle mutazioni investigate causano anche un'alterazione nella regolazione CaM-dipendente

Come descritto nell'Introduzione, la calmodulina è responsabile di una complessa attività regolatoria sui canali Kv7, sia nella forma legata che non legata al calcio. L'importanza di tale regolazione è enfatizzata da alcune evidenze che mostrano come la co-espressione della CaM consenta di ripristinare la funzionalità di alcuni canali Kv7 incorporanti mutazioni a livello del sito di legame per tale proteina regolatoria (Alaimo *et al*., 2013). Poiché le mutazioni oggetto della presente Tesi sono localizzate nelle strette vicinanze dl sito di legame noto per la CaM, sono stati condotti esperimenti di elettrofisiologia per valutare l'effetto della co-espressione della CaM sui canali omomerici *wild-type* o mutanti: in tali esperimenti, veniva utilizzata una forma *wild-type* della CaM oppure una non legante il calcio (CaM_{1234}; Gamper and Shapiro, 2003). Da tali esperimenti è emerso che per il canale Kv7.3 *wild-type* la co-espressione della CaM causava un significativo decremento della corrente, mentre la CaM_{1234} non determinava alcun effetto. Questi risultati sono in accordo con precedenti lavori (Ambrosino *et al*., 2015; Gomis-Perez *et al*., 2017). Allo stesso modo, anche dalla co-espressione della CaM o della CaM_{1234} con i canali Kv7.3 V359L o Kv7.3 D542N non si osservava alcun effetto significativo. Questi dati suggeriscono che probabilmente queste mutazioni non interferiscono con la modulazione mediata dalla calmodulina della corrente elicitata dal canale Kv7.3, anche se saranno necessari ulteriori studi di affinità con questa molecola regolatoria per confermare tale ipotesi.

Al contrario, quando co-espressa col canale Kv7.2 *wild-type*, la CaM o la CaM_{1234} causava un significativo aumento della densità di corrente, come già precedentemente riportato (Ambrosino *et al*., 2015); tale effetto non era visibile nel canale mutante Kv7.2 R325G dove la co-espressione di queste proteine non determinava alcun recupero funzionale, né modificava la corrente espressa dal canale mutato in presenza di PIP5K. Questi risultati sono in linea con l'ipotesi che l'aumento della densità di corrente indotta

dalla calmodulina sul canale Kv7.2 è per lo più mediato dai cambiamenti nell'affinità al PIP_2 (Alberdi *et al*., 2015; Ambrosino *et al*., 2015) e che quindi la presenza di mutazioni che alterano la regolazione PIP_2-dipendente del canale Kv7.2 impedisca anche la regolazione CaM-mediata, come è logico supporre anche dalla vicinanza dei siti di legame di queste molecole regolatorie. Al contrario, la co-espressione con la CaM_{1234}, ma non con CaM, determinava un parziale (per il canale Kv7.2 D535N) o totale (Kv7.2 G310S) recupero della corrente ai livelli del canale *wild-type*. Questo diverso comportamento della CaM rispetto alla CaM_{1234} sui canali mutanti potrebbe essere determinato dai diversi effetti indotti da tale proteina in presenza o in assenza di calcio: in particolare, l'incapacità da parte della CaM_{1234} di legare lo ione potrebbe amplificare, e in questo caso, rendere misurabile il ruolo attivatorio della CaM sulla corrente Kv7 e impedire, invece, il ruolo inibitorio della CaM legata al calcio. Questi dati suggeriscono che tali mutazioni possono interferire, in parte, anche con la regolazione del canale mediata dalla calmodulina, confermando un ruolo sequenziale di PIP_2 e CaM nella regolazione della corrente M (Kosenko *et al*., 2012).

5.5 La stessa variante nei canali Kv7.2 e Kv7.3 è associata a differenti conseguenze funzionali

La variante Kv7.2 D535N è stata descritta in tre pazienti con encefalopatia epilettica ed è stato riportato un quarto caso, portatore della mutazione D535E, con un simile fenotipo epilettico severo (Weckhuysen *et al*., 2013; Milh *et al*., 2015). Tale variante, trovata in Kv7.2, corrisponde alla variante D542N riscontrata nel canale omologo Kv7.3 e descritta nella famiglia di nostro interesse. Tuttavia, la variante Kv7.3 D542N non è associata a fenotipo epilettico: pertanto, la mutazione in Kv7.2 è sufficiente ad innescare il fenotipo epilettico, invece la stessa mutazione a livello dello stesso residuo ma nel canale Kv7.3 non è associata a fenotipo neurologico. Ciò consente, per la prima volta, di eseguire una valutazione comparativa degli effetti funzionali prodotti dalla stessa variante in canali Kv7.2 o Kv7.3, allo scopo di spiegare le divergenze cliniche osservate.

L'incorporazione di una singola subunità Kv7.2 D535N nel canale eteromerico Kv7.2+Kv7.3 causava conseguenze più drammatiche sulla regolazione PIP_2-dipendente rispetto a quelle osservate quando era incorporanta la corrispondente variante Kv7.3

D542N; invece, gli effetti erano simili quando erano co-espresse entrambe le subunità mutanti Kv7.3 V359L e Kv7.3 D542N. Questi risultati rivelano un'importante differenza funzionale tra i corrispondenti residui in Kv7.2 e Kv7.3, con quest'ultimo che risulta più "resistente" ai cambiamenti funzionali indotti dalla mutazione. Pertanto, questi risultati consentono di formulare nuove correlazioni genotipo-fenotipo al fine di associare i differenti stati genetici degli individui (eterozigosi composta in Kv7.3; eterozigosi in Kv7.2) ai fenotipi epilettici osservati, andando a valutare la differente influenza esercitata da ciascuna subunità Kv7.2 o Kv7.3 sulla regolazione del canale mediata dal PIP_2. Rimane da chiarire se la maggiore capacità di tollerare le mutazioni del canale Kv7.3 rispetto al canale Kv7.2 possa contribuire alla più bassa incidenza di varianti, causative di disturbi epilettici, identificate in Kv7.3 rispetto a quelle riscontrate in Kv7.2 (www.rikee.org).

5.6 La retigabina ripristina la funzionalità dei canali Kv7.2 o Kv7.3 incorporanti le mutazioni causative di EE

Tutte le mutazioni qui investigate causano un effetto di perdita di funzione dei canali Kv7.2 o Kv7.3. Tuttavia, le terapie farmacologiche con i tradizionali farmaci antiepilettici risultano poco efficaci nel contrastare l'encefalopatia epilettica. Per tale motivo, sono stati condotti ulteriori esperimenti per testare la capacità delle retigabina di recuperare l'alterazione funzionale osservata. La retigabina agisce come attivatore dei canali neuronali Kv7 determinando un variabile spostamento della curva di attivazione verso potenziali più iperpolarizzati e favorendo l'aumento della probabilità di apertura del canale (Tatulian *et al.*, 2001; Miceli *et al.*, 2008). I dati ottenuti mostrano che la funzionalità dei canali eteromerici incorporanti le subunità mutanti in studio veniva completamente recuperata dalla retigabina: infatti, in seguito a perfusione di retigabina la densità di corrente dei canali eteromerici mutanti ritornava ai livelli di quella misurata per i canali eteromerici *wild-type*.

Per il canale Kv7.2 e Kv7.2 R325G, l'aumento dei livelli di PIP_2 cellulari, ottenuto attraverso la co-espressione della PIP5K, ha determinato uno spostamento del $V_{½}$ verso valori più negativi e ha ridotto l'entità di risposta indotta dalla retigabina: tali dati indicano che la retigabina e il PIP_2 agiscono attraverso meccanismi parzialmente sovrapposti per stabilizzare l'apertura voltaggio-dipendente del poro del canale; in

accordo con questa osservazione vi è l'evidenza che i canali Kv7.3 "impoveriti" di PIP_2 sono insensibili alla retigabina (Zhou *et al*., 2013).

Nelle patologie su base genetica, quale l'epilessia, è fondamentale identificare il gene responsabile del disturbo clinico osservato. Infatti, l'individuazione del gene e del meccanismo patogenico alla base del fenotipo epilettico permette di intervenire mediante approcci terapeutici specifici (medicina di precisione). Una terapia antiepilettica ottimale consisterebbe nell'impiego di un farmaco capace di influenzare i cambiamenti funzionali e di interferire con i meccanismi molecolare associati alla specifica variante patogenica identificata. Infatti, poiché le mutazioni analizzate alterano la regolazione del canale mediata dal PIP_2, e in alcuni casi anche dipendente dalla calmodulina, si potrebbero sviluppare tools farmacologici che interferiscano selettivamente con questi pathways biochimici.

In conclusione, i risultati ottenuti suggeriscono che per tutte le mutazioni investigate il principale meccanismo patogenico responsabile dell'encefalopatia epilettica è una ridotta sensibilità ai livelli endogeni di PIP_2. Pertanto, questi dati consentono di inserire queste forme di epilessia causate da mutazioni nei geni *kcnq2* e *kcnq3* alla crescente lista di canalopatie associate a cambiamenti nella regolazione PIP_2-dipendente (Logothetis *et al*., 2010; Zaydman and Cui, 2014). In aggiunta, queste valutazioni sono in accordo con la recente osservazione che i canali Kv7 sono responsabili dei cambiamenti nell'eccitabilità neuronale a livello corticale a seguito della dinamica regolazione dei livelli intracellulari di PIP_2 (Kim *et al*., 2016). Sebbene la principale modifica indotta dalla presenza di queste mutazioni sia rappresentata dall'alterata modulazione del canale mediata dal PIP_2, per alcune delle mutazioni analizzate si riscontra anche una modificata regolazione dipendente dalla calmodulina, confermando il ruolo sequenziale tra PIP_2 e CaM nella modulazione della corrente M.

Infine, tali risultati forniscono un razionale per l'uso di attivatori, quali la retigabina o suoi analoghi, per il trattamento di pazienti affetti da EE e portatori di mutazioni nei geni *kcnq2* o *kcnq3*.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Aiken SP, Lampe BJ, Murphy PA, Brown BS (1995). Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. ***Br J Pharmacol*** 115(7):1163-1168.
2. Alaimo A, Alberdi A, Gomis-Perez C, Fernández-Orth J, Gómez-Posada JC, Areso P, Villarroel A (2013). Cooperativity between calmodulin-binding sites in Kv7.2 channels. ***J Cell Sci*** 126(Pt 1):244-53.
3. Alaimo A, Villarroel A (2018). Calmodulin: A Multitasking Protein in Kv7.2 Potassium Channel Functions. ***Biomolecules*** 8(3).
4. Alberdi, A. *et al.* (2015). Uncoupling PIP_2-calmodulin regulation of Kv7.2 channels by an assembly destabilizing epileptogenic mutation. ***J Cell Sci*** 128, 4014-4023.
5. Ambrosino P, Alaimo A, Bartollino S, Manocchio L, De Maria M, Mosca I, Gomis-Perez C, Alberdi A, Scambia G, Lesca G, Villarroel A, Taglialatela M, Soldovieri MV (2015). Epilepsy-causing mutations in Kv7.2 C-terminus affect binding and functional modulation by calmodulin. ***Biochim Biophys Acta*** 1852(9):1856-1866.
6. Ambrosino P, Freri E, Castellotti B, Soldovieri MV, Mosca I, Manocchio L, Gellera C, Canafoglia L, Franceschetti S, Salis B, Iraci N, Miceli F, Ragona F, Granata T, DiFrancesco JC, Taglialatela M (2018). Kv7.3 Compound Heterozygous Variants in Early Onset Encephalopathy Reveal Additive Contribution of C-Terminal Residues to PIP_2-Dependent K^+ Channel Gating. ***Mol Neurobiol*** 55(8):7009-7024.
7. Allen AS, Berkovic SF, Cossette P et al (2013). De novo mutations in epileptic encephalopathies. ***Nature*** 501(7466):217-221.
8. Balla T (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. ***Physiol Rev*** 93, 1019-1137.
9. Barrese V, Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Iannotti FA, Cilio MR, and Taglialatela M (2010). Neuronal potassium channel openers in the management of epilepsy: role and potential of retigabine. ***Clinical Pharmacology: Advances and Applications*** 2: 225-236
10. Barrese V, Stott JB, Greenwood IA (2017). KCNQ-Encoded Potassium Channels as Therapeutic Targets. ***Annu Rev Pharmacol Toxicol*** 58:625-648.

11. Battefeld A, Tran BT, Gavrilis J, Cooper EC, Kole MH (2014). Heteromeric Kv7.2/7.3 channels differentially regulate action potential initiation and conduction in neocortical myelinated axons. ***J Neurosci*** 34(10):3719-3732.
12. Bentzen BH, Schmitt N, Calloe K, Dalby Brown W, Grunnet M, Olesen SP (2006). The acrylamide (S)-1 differentially affects Kv7 (KCNQ) potassium channels. ***Neuropharmacology*** 51(6):1068-1077.
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.
14. Blom SM, Schmitt N, Jensen HS (2009). The acrylamide (S)-2 as a positive and negative modulator of Kv7 channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. ***PLoS One*** 4(12):e8251.
15. Börjesson SI, Elinder F (2008). Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels**.** ***Cell Biochem Biophys*** 52(3):149-174.
16. Borsotto M, Cavarec L, Bouillot M, Romey G, Macciardi F, Delaye A, Nasroune M, Bastucci M, Sambucy JL, Luan JJ, Charpagne A, Jouet V, Leger R, Lazdunski M, Cohen D, Chumakov I (2007). PP2A-Bgamma subunit and KCNQ2 K^+ channels in bipolar disorder. ***Pharmacogenomics J*** 7(2):123-132.
17. Bosch DG, Boonstra FN, de Leeuw N, Pfundt R, Nillesen WM, de Ligt J, Gilissen C, Jhangiani S et al (2016) Novel genetic causes for cerebral visual impairment. ***Eur J Hum Genet*** 24(5):660-665.
18. Chung HJ, Jan YN, Jan LY (2006). Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 103:8870-8875.
19. Cooper EC, Jan LY (2003). M-channels: neurological diseases, neuromodulation, and drug development. ***Arch Neurol*** 60:496-500.
20. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. ***Nature*** 381(6579):242-245.

21. Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS (2004) KCNQ2 is a nodal K^+ channel. ***J Neurosci*** 24:1236-1244.
22. Devaux J, Abidi A, Roubertie A, Molinari F, Becq H, Lacoste C, Villard L, Milh M, Anikstejn L (2016). A Kv7.2 mutation associated with early onset epileptic encephalopathy with suppression-burst enhances Kv7/M channel activity. ***Epilepsia*** 57(5):e87-93.
23. Ekberg J, Schuetz F, Boase NA, Conroy SJ, Manning J, Kumar S, Poronnik P, Adams DJ (2007) Regulation of the voltage-gated K^+ channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by ubiquitination. Novel role for Nedd4-2. ***J Biol Chem*** 282:12135-12142.
24. Etxeberria A, Aivar P, Rodriguez-Alfaro JA, Alaimo A, Villacé P, Gómez-Posada JC, Areso P, Villarroel A (2008). Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. ***FASEB J*** 22(4):1135-1143.
25. 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):475-482.
26. Fisher RS, J. Helen Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Perez ER, Scheffer IE, Zuberi SM (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. ***Epilepsia*** 58(4):522-530.
27. Gamper N and Shapiro MS (2003). Calmodulin mediates Ca^{2+}-dependent modulation of M-type K^+ channels. ***J Gen Physiol*** 122(1):17-31.
28. Gamper N, Li Y, Shapiro MS (2005) Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K^+ channels to modulation by Ca2+/calmodulina. ***Mol. Biol. Cell*** 16 (2005) 3538-3551.
29. Gamper N, Zaika O, Li Y, Martin P, Hernandez CC, Perez MR, Wang AY, Jaffe DB, Shapiro MS (2006). Oxidative modification of M-type K(+) channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. ***Embo J*** 25(20):4996-5004.

30. Gao H, Boillat A, Huang D, Liang C, Peers C, Gamper N (2017). Intracellular zinc activates KCNQ channels by reducing their dependence on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 114(31):E6410-E6419.
31. Gómez-Posada JC *et al.* (2010). A pore residue of the KCNQ3 potassium M-channel subunit controls surface expression. ***J Neurosci*** 30,9316-9323.
32. Gomis-Perez C, Alaimo A, Fernandez-Orth J, Alberdi A, Aivar-Mateo P, Bernardo-Seisdedos G, Malo C, Areso P, Felipe A, Villarroel A (2015). An unconventional calmodulin-anchoring site within the AB module of Kv7.2 channels. ***J Cell Sci*** 128(16):3155-3163.
33. Gomis-Perez C, Soldovieri MV, Malo C, Ambrosino P, Taglialatela M, Areso P, Villarroel A (2017). Differential Regulation of PI(4,5)P_2 Sensitivity of Kv7.2 and Kv7.3 Channels by Calmodulin. ***Front Mol Neurosci*** 10, 117.
34. Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. ***J Physiol*** 566:689-715.
35. Hadley JK, Noda M, Selyanko AA, Wood IC, Abogadie FC, Brown DA (2000). Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels. ***Br J Pharmacol*** 129(3):413-415.
36. Hansen SB, Tao X, MacKinnon R (2011) Structural basis of PIP_2 activation of the classical inward rectifier K þ channel Kir2.2. ***Nature*** 477: 495-498.
37. Helbig I, Tayoun AA (2016). Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies. ***Mol Syndromol*** 7(4):172-181.
38. Hernandez CC, Zaika O, Tolstykh GP, Shapiro MS (2008). Regulation of neural KCNQ channels: signalling pathways, structural motifs and functional implications. ***J Physiol*** 586:1811-1821.
39. Hernandez CC, Zaika O & Shapiro MS (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K^+ channels. ***J Gen Physiol*** 132, 361-381.
40. Hessler S, Zheng F, Hartmann S, Rittger A, Lehnert S, Volkel M, Nissen M, Edelmann E, Saftig P, Schwake M, Huth T, Alzheimer C (2015). beta-Secretase BACE1 regulates hippocampal and reconstituted M-currents in a beta-subunit-like fashion. ***J Neurosci*** 35(8):3298-3311.

41. Hoshi N, Zhang J S, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, Langeberg LK, Yoneda Y, Scott JD, Brown DA, Higashida H (2003). AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. ***Nat Neurosci*** 6: 564-571.
42. Hoshi N, Langeberg LK, Scott JD (2005). Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. ***Nat Cell Biol*** 7(11):1066-1073.
43. Hu H, Vervaeke K, Storm JF (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na^+ current in rat hippocampal pyramidal cells. ***J Physiol*** 545(Pt 3):783-805.
44. Jentsch TJ (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. ***Nat Rev Neurosci*** 1(1):21-30.
45. Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP (2005). The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. ***Physiology*** 20:408-416.
46. Kalappa BI, Soh H, Duignan KM, Furuya T, Edwards S, Tzingounis AV, Tzounopoulos T (2015). Potent KCNQ2/3-specific channel activator suppresses in vivo epileptic activity and prevents the development of tinnitus. ***J Neurosci*** 35(23):8829-42.
47. Kasimova MA, Zaydman MA, Cui J and Tarek M (2015). PIP(2)-dependent coupling is prominent in Kv7.1 due to weakenedinteractions between S4-S5 and S6. ***Sci Rep*** 5, 7474.
48. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H (2013). Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. ***Epilepsia*** 54:1282-1287.
49. Kang S, Xu M, Cooper EC, Hoshi N (2014). Channel anchored protein kinase CK2 and protein phosphatase 1 reciprocally regulate KCNQ2-containing M-channels via phosphorylation of calmodulin. ***J Biol Chem*** 289, 11536-11544.
50. Kim HJ, Jeong MH, Kim KR, Jung CY, Lee SY, Kim H, Koh J, Vuong TA, Jung S, Yang H, Park SK, Choi D, Kim SH, Kang K, Sohn JW, Park JM, Jeon D, Koo SH,

Ho WK, Kang JS, Kim ST, Cho H (2016). Protein arginine methylation facilitates KCNQ channel-PIP_2 interaction leading to seizure suppression. ***Elife*** 5.

51. Kim KS, Duignan K M, Hawryluk J M, Soh H and Tzingounis AV (2016). The Voltage Activation of Cortical KCNQ Channels Depends on Global PIP_2 Levels. ***Biophys J*** 110, 1089-1098.
52. Kim EC, Zhang J, Pang W, Wang S, Lee KY, Cavaretta JP, Walters J, Procko E, Tsai NP, Chung HJ. (2018). Reduced axonal surface expression and phosphoinositide sensitivity in K_v7 channels disrupts their function to inhibit neuronal excitability in Kcnq2 epileptic encephalopathy. ***Neurobiol Dis.*** 118:76-93.
53. Kosenko A, Kang S, Smith IM, Greene DL, Langeberg LK, Scott JD, Hoshi N (2012). Coordinated signal integration at the M-type potassium channel upon muscarinic stimulation. ***EMBO J*** 31(14):3147-3156.
54. Kruse M, Hammond GR and Hille B. (2012). Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4,5)P2. ***J Gen Physiol*** 140**,** 189-205.
55. Kumar M, Reed N, Liu R, Aizenman E, Wipf P, Tzounopoulos T (2016). Synthesis and Evaluation of Potent KCNQ2/3-Specific Channel Activators. ***Mol Pharmacol*** 89(6):667-77.
56. Lehman A *et al*. (2017). Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations in KCNQ5 Cause Intellectual Disability or Epileptic Encephalopathy. ***Am J Hum Genet*** 101(1):65-74.
57. Li Y, Gamper N, Shapiro MS (2004). Single-channel analysis of KCNQ K^+ channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. ***J Neurosci*** 24(22):5079-5090.
58. Li Y, Gamper N, Hilgemann DW and Shapiro MS (2005). Regulation of Kv7 (KCNQ) K^+ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. ***J Neurosci*** 25:9825-9835.
59. Logothetis D E, Petrou I, Adney S K and Mahajan, R. (2010) .Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. ***Pflugers Arch*** 460, 321-341.
60. Madamba SG, Schweitzer P, Siggins GR (1999). Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. ***J Neurophysiol*** 82(4):1768-1775.

61. Madison DV, Nicoll RA (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. ***J Physiol*** 354:319-331.
62. Maljevic S, Wuttke TV, Seebohm G, Lerche H (2010). Kv7 channelopathies. ***Pflugers Arch*** 460:277-288.
63. Marchese G, Rizzo F, Guacci A, Weisz A, Coppola G (2016). Kleefstra-variant syndrome with heterozygous mutations in EHMT1 and KCNQ2 genes: a case report. ***Neurol Sci*** 37, 829-831.
64. Martire M, Castaldo P, D'Amico M, Preziosi P, Annunziato L, Taglialatela M. M channels containing KCNQ2 subunits modulate norepinephrine, aspartate, and GABA release from hippocampal nerve terminals (2004). ***J Neurosci*** 24(3):592-597.
65. Martire M, D'Amico M, Panza E, Miceli F, Viggiano D, Lavergata F, Iannotti FA, Barrese V, Preziosi P, Annunziato L, Taglialatela M (2007). Involvement of KCNQ2 subunits in [3H]dopamine release triggered by depolarization and pre-synaptic muscarinic receptor activation from rat striatal synaptosomes. ***J Neurochem*** 102(1):179-93.
66. McRae JF, Clayton S, Fitzgerald TW et al (2017). Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. ***Nature*** 542(7642):433-438.
67. Miceli F, Soldovieri MV, Martire M and Taglialatela M (2008). Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. ***Curr Opin Pharmacol*** 8, 65-74.
68. Miceli F, Soldovieri MV, Iannotti FA, Barrese V, Ambrosino P, Martire M, Cilio MR, and Taglialatela M (2011). The voltage-sensing domain of Kv7.2 channels as a molecular target for epilepsy-causing mutations and anticonvulsants. ***Frontiers in Pharmacology*** 2:2.
69. Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Barrese V, Migliore M, Cilio MR, Taglialatela M (2013). Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 110(11):4386-4391.
70. Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, De Maria M, Migliore M, Migliore R Taglialatela M (2015). Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-

function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. ***J Neurosci*** 35: 3782-3793.

71. Miceli F, Soldovieri MV, Nishtha J, Weckhuysen S, Cooper EC, Taglialatela M (2017) KCNQ3-related disorders. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. ***GeneReviews®*** [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
72. Millichap JJ, Park KL, Tsuchida T, Ben-Zeev B, Carmant L, Flamini R, Joshi N, Levisohn PM, Marsh E, Nangia S, Narayanan V, Ortiz-Gonzalez XR, Patterson MC, Pearl PL, Porter B, Ramsey K, McGinnis EL, Taglialatela M, Tracy M, Tran B, Venkatesan C, Weckhuysen S, Cooper EC (2016). KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots and ezogabine treatment of 11 patients. ***Neurol Genet*** 2(5).
73. Millichap JJ, Miceli F, De Maria M, Keator C, Joshi N, Tran B, Soldovieri MV, Ambrosino P, Shashi V, Mikati MA, Cooper EC, Taglialatela M (2017). Infantile spasms and encephalopathy without preceding neonatal seizures caused by KCNQ2 R198Q, a gain-of-function variant. ***Epilepsia*** 58(1):e10-e15.
74. Milh M, Lacoste C, Cacciagli P, Abidi A, Sutera-Sardo J, Tzelepis I, Colin E, Badens C *et al* (2015). Variable clinical expression in patients with mosaicism for KCNQ2 mutations. ***Am J Med Genet A*** 167A(10):2314-2318.
75. Misura KM, Bock JB, Gonzalez LC Jr, Scheller RH, Weis WI (2002). Three-dimensional structure of the amino-terminal domain of syntaxin 6, a SNAP-25 C homolog. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 99(14): 9184-9189.
76. Moore SD, Madamba SG, Joels M, Siggins GR (1988). Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. **Science** 239(4837):278-280.
77. Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T (2014). Epilepsy: new avances. ***Lancet*** 385(9971):884-898.
78. Myers KA , Johnstone D, Dyment DA (2018). Epilepsy genetics: Current knoelwdge, applications, and future directions. ***Clin Genet*** [Epub ahead of print].
79. Nieh SE, Sherr EH (2014). Epileptic encephalopathies: new genes and new pathways. ***Neurotherapeutics*** 11(4):796-806.

80. Numis AL, Angriman M, Sullivan JE, Lewis AJ, Striano P, Nabbout R, Cilio MR (2014). KCNQ2 encephalopathy: delineation of the electroclinical phenotype and treatment response. ***Neurology*** 82, 368-370.
81. Ohtahara S, Yamatogi Y (2003) Epileptic encephalopathies in early infancy with suppression-burst. ***J Clin Neurophysiol*** 20(6):398-407.
82. Orhan G, Bock M, Schepers D, Ilina EI, Reichel SN, Loffler H, Jezutkovic N, Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, Danker T, Guenther E, Scheffer IE, De Jonghe P, Lerche H, Maljevic S (2014). Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. ***Ann Neurol*** 75:382-394.
83. Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains at the axon. ***J Neurosci*** 26: 2599-2613.
84. Peretz A, Pell L, Gofman Y, Haitin Y, Shamgar L, Patrich E, Kornilov P, Gourgy-Hacohen O, Ben-Tal N, Attali B (2010). Targeting the voltage sensor of Kv7.2 voltage-gated KC channels with a new gating-modifier. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 107:15637-15642.
85. Plouin P (1994) Benign familial neonatal convulsions. In: Idiopathic Generalized Epilepsies: Clinical, Experimental and Genetic Aspects, edited by Malafosse A, Hirsch E, Marescaux C, Broglin D, Bernasconi R. London: John Libbey, p. 39-44.
86. Pisano T, Numis AL, Heavin SB, Weckhuysen S, Angriman M, Suls A, Podesta B, Thibert RL, Shapiro KA, Guerrini R, Scheffer IE, Marini C, Cilio MR (2015). Early and effective treatment of KCNQ2 encephalopathy. ***Epilepsia*** 56:685-691.
87. Posor Y, Eichhorn-Grunig M and Haucke V (2014). Phosphoinositides in endocytosis. ***Biochim Biophys Acta*** 1851, 794-804.
88. Rauch A, Wieczorek D, Graf E et al (2012). Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. ***Lancet*** 380(9854):1674-1682.
89. Regev N, Degani-Katzav N, Korngreen A, Etzioni A, Siloni S, Alaimo A, Chikvashvili D, Villarroel A, Attali B, Lotan I (2009) Selective interaction of syntaxin 1A with KCNQ2: possible implications for specific modulation of presynaptic activity. ***Plos One*** 4(8):e6586.

90. Sachyani D, Dvir M, Strulovich R, Tria G, Tobelaim W, Peretz A, Pongs O, Svergun D, Attali B, Hirsch JA. (2014). Structural basis of a Kv7.1 potassium channel gating module: studies of the intracellular C-terminal domain in complex with calmodulin. ***Structure*** 22, 1582-1594.
91. Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N (2012) Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. ***Ann Neurol*** 72:298-300.
92. Samanta D, Ramakrishnaiah R, Willis E, Frye RE (2015). Myoclonic epilepsy evolved into West syndrome: a patient with a novel de novo KCNQ2 mutation. ***Acta Neurol Belg*** 115:475-8.
93. Sands TT, Balestri M, Bellini G, Mulkey SB, Danhaive O, Bakken EH, Taglialatela M, Oldham MS, Vigevano F, Holmes GL, Cilio MR (2016). Rapid and safe response to low-dose carbamazepine in neonatal epilepsy. ***Epilepsia*** 57(12):2019-2030.
94. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. ***Nature*** 384:80-83.
95. 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 Classificationand Terminology. ***Epilepsia*** 58(4):512-521.
96. Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grötzinger J, Schwake M (2005). Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K^+ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. ***J Neurosci*** 25:5051-5060.
97. Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K^+ channels causes. ***Nature*** 396(6712):687-690.
98. Seebohm G, Pusch M, Chen J, Sanguinetti MC (2003). Pharmacological activation of normal and arrhythmia-associated mutant KCNQ1 potassium channels. ***Circ Res*** 93(10):941-947.

99. Soldovieri MV, Castaldo P, Iodice L, Miceli F, Barrese V, Bellini G, Miraglia del Giudice E, Pascotto A, Bonatti S, Annunziato L, Taglialatela M (2006). Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a KCNQ2 C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions. ***J Biol Chem*** 281:418-428.

100. Soldovieri MV, Miceli F, Taglialatela M (2011). Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. ***Physiology*** 26(5): 365-376.

101. Soldovieri MV, Boutry-Kryza N, Milh M, Doummar D, Heron B, Bourel E, Ambrosino P, Miceli F, De Maria M, Dorison N, Auvin S, Echenne B, Oertel J, Riquet A, Lambert L, Gerard M, Roubergue A, Calender A, Mignot C, Taglialatela M, Lesca G (2014). Novel KCNQ2 and KCNQ3 mutations in a large cohort of families with benign neonatal epilepsy: first evidence for an altered channel regulation by syntaxin-1A. ***Hum Mutat*** 35:356-367.

102. Soldovieri MV, Ambrosino P, Mosca I, De Maria M, Moretto E, Miceli F, Alaimo A, Iraci N, Manocchio L, Medoro A, Passafaro M, Taglialatela M. (2016). Early-onset epileptic encephalopathy caused by a reduced sensitivity of Kv7.2 potassium channels to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. ***Sci Rep*** 6:38167.

103. Storm JF (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. ***ProgBrain Res*** 83:161-187.

104. Suh BC and Hille B. (2007). Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. ***J Physiol*** 582**,** 911-916.

105. von Deimling M, Helbig I, Marsh ED (2017). Epileptic Encephalopathies-Clinical Syndromes and Pathophysiological Concepts. ***Curr Neurol Neurosci Rep*** 17(2):10.

106. Tatulian L, Delmas P, Abogadie FC and Brown DA (2001). Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. ***J Neurosci*** 21, 5535-5545.

107. Telezhkin V, Thomas AM, Harmer SC, Tinker A & Brown DA (2013). A basic residue in the proximal C-terminus is necessary for efficient activation of the M-channel subunit Kv7.2 by PI(4,5)P2. ***Pflugers Arch*** 465, 945-953.

108. Tobelaim WS, Dvir M, Lebel G, Cui M, Buki T, Peretz A, Marom M, Haitin Y, Logothetis DE, Hirsch JA, Attali B (2017a). Ca^{2+}-Calmodulin and PIP_2 interactions at the proximal C-terminus of Kv7 channels. ***Channels (Austin*)** 11(6):686-695.

109. Tobelaim WS, Dvir M, Lebel G, Cui M, Buki T, Peretz A, Marom M, Haitin Y, Logothetis DE, Hirsch JA, Attali B (2017b). Competition of calcified calmodulin N lobe and PIP2 to an LQT mutation site in Kv7.1 channel. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 114(5):E869-E878.

110. Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY (2006). How does voltage open an ion channel? ***Annu Rev Cell Dev Biol*** 22: 23-52.

111. Topsakal V, Pennings RJ, te Brinke H, Hamel B, Huygen PL, Kremer H, Cremers CW, (2005). Phenotype determination guides swift genotyping of a DFNA2/KCNQ4 family with a hot spot mutation (W276S). ***Otol Neurotol*** 26:52-58.

112. Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS (2000). Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991. ***Mol Pharmacol*** 57: 1218-1223.

113. Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, Audenaert D, Deconinck T, Claes LR, Deprez L, Smets K, Hristova D, Yordanova I, Jordanova A, Ceulemans B, Jansen A, Hasaerts D, Roelens F, Lagae L, Yendle S, Stanley T, Heron SE, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, de Jonghe P (2012). KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. ***Ann Neurol*** 71(1):15-25.

114. Weckhuysen S, Ivanovic V, Hendrickx R, Van Coster R, Hjalgrim H, Møller RS, Grønborg S, Schoonjans AS, Ceulemans B, Heavin SB, Eltze C, Horvath R, Casara G, Pisano T, Giordano L, Rostasy K, Haberlandt E, Albrecht B, Bevot A, Benkel I, Syrbe S, Sheidley B, Guerrini R, Poduri A, Lemke JR, Mandelstam S, Scheffer I, Angriman M, Striano P, Marini C, Suls A, De Jonghe P (2013). Extending the KCNQ2 encephalopathy spectrum: clinical and neuroimaging findings in 17 patients. ***Neurology*** 81(19):1697-1703.

115. Wenk MR *et al.* (2001). PIP kinase Igamma is the major PI(4,5)P(2) synthesizing enzyme at the synapse. ***Neuron*** 32**:**79-88.

116. Winks JS *et al.* (2005). Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. ***J Neurosci*** 25:3400-3413.

117. Wong W, Scott JD (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 5(12):959-970.

118. Wuttke TV, Seebohm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H (2005). The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. ***Mol Pharmacol*** 67(4):1009-1017.

119. Xiong Q, Gao Z, Wang W, Li M (2008). Activation of Kv7 (KCNQ) voltage-gated potassium channels by synthetic compounds. ***Trends Pharmacol Sci*** 29(2):99-107.

120. Xu Q, Chang A, Tolia A, Minor DL Jr (2013). Structure of a Ca(2+)/CaM:Kv7.4 (KCNQ4) B-helix complex provides insight into M current modulation. ***J Mol Biol*** 425(2):378-94.

121. Yue C, Yaari Y (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. ***J Neurosci*** 24(19):4614-4624.

122. Yus-Najera E, Santana-Castro I, Villarroel A (2002). The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. ***J Biol Chem*** 277(32):28545-28553.

123. Zaczek R, Chorvat RJ, Saye JA, Pierdomenico ME, Maciag CM, Logue AR, Fisher BN, Rominger DH, Earl RA (1998) Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: comparison to linopirdine. ***J PET*** 285(2):724-730.

124. Zaika O, Hernandez CC, Bal M, Tolstykh GP and Shapiro MS (2008). Determinants within the turret and pore-loop domains of KCNQ3 K^+ channels governing functional activity. ***Biophys J*** 95:5121-5137.

125. Zaydman MA. *et al.* (2013). Kv7.1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 110, 13180-13185.

126. Zaydman MA and Cui J (2014). PIP_2 regulation of KCNQ channels: biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating. ***Front Physiol*** 5, 195.

127. Zhang HL Craciun LC, Mirshahi, T, Rohacs, T, Lopes CMB, Jin TH, Logothetis DE (2003). PIP_2 activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents**.** ***Neuron*** 37, 963-975.

128. Zhang Q, Zhou P, Chen Z, Li M, Jiang H, Gao Z & Yang H (2013). Dynamic PIP_2 interactions with voltage sensor elements contribute to KCNQ2 channel gating***. Proc Natl Acad Sci USA*** 110, 20093-20098.

129. Zhang M, Meng XY, Cui M, Pascal JM, Logothetis DE, Zhang JF (2014). Selective phosphorylation modulates the PIP_2 sensitivity of the CaM-SK channel complex. ***Nat Chem Biol*** 10(9):753-759.

130. Zhou P, Yu H, Gu M, Nan FJ, Gao Z, Li M (2013). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate alters pharmacological selectivity for epilepsy-causing KCNQ potassium channels. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 110**,** 8726-8731.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Maurizio Taglialatela per tutte le opportunità che mi ha dato in questo percorso di Dottorato, per la sua disponibilità e per i suoi indispensabili insegnamenti.

Un ringraziamento speciale è rivolto alla Dott.ssa Maria Virginia Soldovieri per essere stata una guida attenta, costante e sempre presente. Grazie per avermi trasmesso passione e dedizione verso la ricerca e per essere un vero esempio di professionalità.

Grazie al Dott. Paolo Ambrosino per la sua immancabile disponibilità e fiducia nei miei confronti, e per il suo profondo interesse affinchè questo lavoro riuscisse nel migliore dei modi.

Un immenso grazie va ai miei genitori, a mio fratello Gilberto e a Denny per l'immenso amore di cui mi circondano: siete la mia forza, il mio punto di riferimento, il mio Tutto.

Grazie a Nonno Angelo e agli altri nonni che sento sempre accanto: custodirò per sempre l'ineguagliabile affetto e l'infinita dolcezza che mi hanno dimostrato e la saggezza dei loro preziosi insegnamenti di vita.