

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

*DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE DI BASE
E DELLO SVILUPPO*

Tesi di dottorato

*“Correlazione genotipo-fenotipo in pazienti con
malformazioni della corteccia cerebrale”*

CANDIDATO:

Dr.ssa Elena Parrini

RELATORE:

Prof. Renzo Guerrini

INDICE

RIASSUNTO	<i>Pag. VII</i>
INTRODUZIONE	<i>Pag. 1</i>
1.1 Le malformazioni corticali	<i>Pag. 1</i>
1.2 La migrazione neuronale	<i>Pag. 1</i>
1.3 Disturbi della migrazione neuronale di origine genetica	<i>Pag. 3</i>
1.4 Spettro lissencefalia-eterotopia a banda sottocorticale (SBH)	<i>Pag. 5</i>
<i>1.4.1 Definizione e istopatologia</i>	<i>Pag. 5</i>
<i>1.4.2 Patogenesi delle lissencefalie e modelli animali</i>	<i>Pag. 9</i>
<i>1.4.3 Epidemiologia, caratteristiche cliniche e consulenza genetica</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>1.4.4 Sindrome di Miller-Dieker</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>1.4.5 Lissencefalia X-linked con agenesia del corpo calloso e genitali ambigui (XLAG)</i>	<i>Pag. 14</i>
<i>1.4.6 Lissencefalia autosomica recessiva con ipoplasia cerebellare</i>	<i>Pag. 16</i>
1.5 Eterotopia periventricolare	<i>Pag. 17</i>
1.6 Polimicrogiria (PMG)	<i>Pag. 26</i>
<i>1.6.1 Polimicrogiria bilaterale perisilviana (BPP)</i>	<i>Pag. 27</i>
<i>1.6.2 Polimicrogiria bilaterale frontoparietale (BFPP)</i>	<i>Pag. 28</i>
1.7 La metodica DHPLC	<i>Pag. 30</i>
<i>1.7.1 Principio di funzionamento della DHPLC in condizioni non denaturanti (50°C)</i>	<i>Pag. 31</i>
<i>1.7.2 Principio di funzionamento della DHPLC in condizioni parzialmente denaturanti (50°C -70°C)</i>	<i>Pag. 32</i>

<i>1.7.3 Principio di funzionamento della DHPLC in condizioni completamente denaturanti (70°C)</i>	<i>Pag. 35</i>
1.8 Alcune applicazioni della DHPLC	<i>Pag. 36</i>
<i>1.8.1 Identificazione di un mosaico che non viene individuato con sequenziamento diretto</i>	<i>Pag. 36</i>
<i>1.8.2 Analisi dei frammenti di DNA mediante DHPLC</i>	<i>Pag. 37</i>
<i>1.8.3 Analisi dei microsatelliti tetranucleotidi mediante DHPLC</i>	<i>Pag. 37</i>
<i>1.8.4 Reazione di Primer Extension associata a DHPLC</i>	<i>Pag. 38</i>
<i>1.9 Comparazione della DHPLC con le altre metodiche utilizzate per la ricerca di mutazioni</i>	<i>Pag. 38</i>
1.10 La metodica MLPA	<i>Pag. 40</i>
<i>1.10.1 Determinazione del dosaggio genico</i>	<i>Pag. 40</i>
<i>1.10.2 La metodica MLPA</i>	<i>Pag. 41</i>
<i>1.10.3 Vantaggi e svantaggi della metodica MLPA</i>	<i>Pag. 44</i>
MATERIALI E METODI	<i>Pag. 45</i>
2.1. Analisi molecolare dei geni LIS1, DCX, FLNA e GPR56	<i>Pag. 45</i>
<i>2.1.1 Raccolta dei campioni</i>	<i>Pag. 45</i>
<i>2.1.2 Estrazione del DNA da sangue periferico</i>	<i>Pag. 45</i>
<i>2.1.3 Quantificazione del DNA genomico</i>	<i>Pag. 46</i>
<i>2.1.4 Reazione di PCR del geni LIS1, DCX, FLNA e GPR56 nei pazienti con disturbi della migrazione neuronale</i>	<i>Pag. 46</i>
<i>2.1.5 Analisi su DHPLC dei prodotti di PCR</i>	<i>Pag. 51</i>
<i>2.1.6 Purificazione dei prodotti di PCR pre-sequenziamento</i>	<i>Pag. 53</i>
<i>2.1.7 Reazione di sequenziamento dei prodotti di PCR purificati</i>	<i>Pag. 53</i>
<i>2.1.8 Precipitazione della reazione di sequenziamento</i>	<i>Pag. 54</i>
<i>2.1.9 Analisi su sequenziatore automatico</i>	<i>Pag. 55</i>

2.2. Analisi molecolare di pazienti mosaico per mutazioni di <i>FLNA</i>	<i>Pag. 56</i>
2.2.1 <i>Dati clinici di due pazienti studiati per mosaicismo della mutazione di <i>FLNA</i></i>	<i>Pag. 56</i>
2.2.2 <i>Estrazione del DNA dai linfociti, bulbi di capello e singolo bulbo di capello</i>	<i>Pag. 57</i>
2.2.3 <i>Reazione di PCR del gene <i>FLNA</i></i>	<i>Pag. 58</i>
2.2.4 <i>Analisi di segregazione di marcatori microsatelliti polimorfici del cromosoma X nel paziente 2</i>	<i>Pag. 58</i>
2.2.5 <i>Analisi del gene amelogenina nel paziente 2</i>	<i>Pag. 59</i>
2.2.6 <i>Analisi di RT-PCR effettuata nel paziente 2</i>	<i>Pag. 60</i>
2.2.7 <i>Reazione di PCR per analisi del mosaicismo del gene <i>FLNA</i></i>	<i>Pag. 61</i>
2.3. Studio del mosaicismo con analisi SNuPE – DHPLC	<i>Pag. 62</i>
2.3.1 <i>Purificazione enzimatica della reazione di PCR</i>	<i>Pag. 62</i>
2.3.2 <i>Reazioni di Single Nucleotide Primer Extension (SNuPE)</i>	<i>Pag. 63</i>
2.3.3 <i>Analisi della reazione SNuPE mediante DHPLC</i>	<i>Pag. 64</i>
2.3.4 <i>Clonaggio dei prodotti di PCR ottenuti da DNA genomico derivato da sangue periferico del paziente 1</i>	<i>Pag. 65</i>
2.4 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con lissencefalia con gradiente P>A	<i>Pag. 67</i>
2.4.1 <i>Analisi di FISH e analisi di mutazione</i>	<i>Pag. 68</i>
2.4.2 <i>Analisi di MLPA</i>	<i>Pag. 68</i>
2.4.3 <i>Analisi MLPA di <i>LIS1</i> mediante foglio elettronico</i>	<i>Pag. 71</i>
2.4.4 <i>Caratterizzazione del punto di rottura</i>	<i>Pag. 73</i>
2.4.5 <i>Analisi bioinformatica</i>	<i>Pag. 73</i>
2.5 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con SBH diffusa o con gradiente A>P	<i>Pag. 74</i>
2.5.1 <i>Analisi mediante MLPA</i>	<i>Pag. 74</i>
2.5.2 <i>Analisi multiplex PCR semi-quantitativa fluorescente PCR (SQF-PCR)</i>	<i>Pag. 76</i>

2.5.3 <i>Analisi mediante Southern blot</i>	Pag. 76
RISULTATI	Pag. 77
3.1 Valutazione dello spettro clinico, neuroradiologico e molecolare di 182 pazienti con eterotopia periventricolare (PH)	Pag. 77
3.1.1 <i>Classi fenotipiche di PH</i>	Pag. 77
3.1.2 <i>PNH bilaterale classica</i>	Pag. 79
3.1.2 <i>PNH posteriore bilaterale con malformazioni dell'ippocampo e ipoplasia cerebellare</i>	Pag. 80
3.1.3 <i>PNH bilaterale posteriore e polimicrogiria</i>	Pag. 82
3.1.4 <i>PNH bilaterale frontale-perisilviana e polimicrogiria</i>	Pag. 82
3.1.5 <i>PNH bilaterale posteriore associata a idrocefalo</i>	Pag. 84
3.1.6 <i>PNH bilaterale associata a microcefalia</i>	Pag. 84
3.1.7 <i>PNH bilaterale con displasia frontonasale</i>	Pag. 84
3.1.8 <i>PNH bilaterale associata a anomalie degli arti</i>	Pag. 85
3.1.9 <i>PNH bilaterale associata a sindrome di Ehlers-Danlos</i>	Pag. 86
3.1.10 <i>PNH bilaterale associata a sindrome X-fragile</i>	Pag. 86
3.1.11 <i>Altre forme sindromiche di PNH bilaterale</i>	Pag. 86
3.1.12 <i>PNH unilaterale diffusa estesa ai corni temporali</i>	Pag. 87
3.1.13 <i>PH lineare diffusa</i>	Pag. 87
3.1.13 <i>PH con aspetto "ribbon-like"</i>	Pag. 88
3.2 Analisi di mutazione di FLNA	Pag. 88
3.2.1 <i>Nuove mutazioni di FLNA</i>	Pag. 91
3.2.1.a <i>Casi familiari</i>	Pag. 91
3.2.1.b <i>Casi familiari</i>	Pag. 93

3.2.1.c Mutazioni di FLNA in una famiglia con PNH e sindrome di Ehlers-Danlos	Pag. 93
3.3 Analisi statistica	Pag. 94
3.4 Studio di mosaicismo nel paziente 1	Pag. 96
3.4.1 Analisi del gene FLNA mediante DHPLC e sequenziamento	Pag. 96
3.4.2 Analisi di clonaggio dei prodotti di PCR nel paziente 1	Pag. 97
3.5 Studio di mosaicismo nel paziente 2	Pag. 99
3.5.1 Analisi del gene FLNA mediante DHPLC e sequenziamento	Pag. 99
3.5.2 Analisi dei marcatori polimorfici presenti sul cromosoma X	Pag.100
3.5.3 Analisi del gene amelogenina nel paziente 2	Pag. 101
3.5.4 Analisi di RT-PCR nel paziente 2	Pag. 102
3.5.5 Analisi di mosaicismo nel paziente 2 mediante SNuPE e DHPLC	Pag. 103
3.6 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con lissencefalia con gradiente P>A	Pag. 105
3.6.1 Pazienti studiati	Pag. 105
3.6.2 Analisi mediante FISH e analisi di mutazione	Pag. 107
3.6.3 Analisi mediante MLPA	Pag. 107
3.6.4 Caratterizzazione dei punti di rottura	Pag. 108
3.7 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con SBH diffusa o con gradiente A>P	Pag. 111
3.7.1 Paziente 1	Pag. 111
3.7.2 Paziente 2	Pag. 113
3.7.3 Paziente 3	Pag. 115
3.7.4 Paziente 4	Pag. 115
3.8 Analisi mediante DHPLC di pazienti con polimicrogiria bilaterale frontoparietale (BFPP)	Pag. 116

<i>3.8.1 Paziente 1</i>	<i>Pag. 117</i>
<i>3.8.2 Paziente 2</i>	<i>Pag. 119</i>
<i>3.8.3 Paziente 3</i>	<i>Pag. 120</i>
<i>DISCUSSIONE</i>	<i>Pag. 122</i>
4.1 Eterotopia nodulare periventricolare	<i>Pag. 122</i>
<i>4.1.1 Fenotipi associati con mutazioni di FLNA</i>	<i>Pag. 123</i>
<i>4.1.2 PNH bilaterale classica non associata a mutazioni di FLNA</i>	<i>Pag. 125</i>
<i>4.1.3 Principali fenotipi non associati a mutazioni di FLNA</i>	<i>Pag. 126</i>
<i>4.1.4 Fenotipi minori di PH</i>	<i>Pag. 128</i>
<i>4.1.5 Mosaicismo somatico in pazienti con PNH</i>	<i>Pag. 128</i>
4.2. Lissencefalia	<i>Pag. 132</i>
4.3 Eterotopia a banda sottocorticale	<i>Pag. 135</i>
4.4 Polimicrogiria bilaterale fronto-parietale (BFPP)	<i>Pag. 137</i>
<i>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</i>	<i>Pag. 140</i>

RIASSUNTO

Lo studio delle malformazioni corticali ne ha evidenziato, soprattutto negli ultimi anni, l'alta frequenza in soggetti con ritardo mentale, ritardo dello sviluppo ed epilessia, specialmente in età pediatrica. In particolare la diagnostica per immagini costituisce il principale mezzo per l'identificazione e la classificazione delle diverse sindromi malformative, permettendo un rapido inquadramento diagnostico. La genetica molecolare e l'analisi di linkage rappresentano gli strumenti più importanti per identificare alterazioni in geni noti e per indirizzare lo studio su nuovi loci, al fine di delineare i fattori genetici di rischio per le sindromi identificate. Negli ultimi dieci anni l'avvento della diagnostica mediante neuro-immagini ad alta risoluzione ha consentito l'individuazione o l'ulteriore caratterizzazione di vari tipi di malformazioni corticali. Le variazioni nella distribuzione e profondità dei solchi corticali, nello spessore della corteccia cerebrale, nei confini fra sostanza bianca e sostanza grigia e nell'intensità di segnale permettono il riconoscimento di differenti pattern malformativi. Uno sviluppo anomalo corticale rappresenta una maggiore causa di epilessia, che costituisce generalmente il fenotipo clinico caratteristico di questi pazienti. Le più gravi malformazioni possono tuttavia manifestarsi con quadri di grave ritardo dello sviluppo e precoce insorgenza delle crisi, con conseguente svantaggio riproduttivo. Recentemente è stato dimostrato che diversi geni sono coinvolti nel processo di migrazione neuronale, attraverso cui si formano i sei strati definitivi della corteccia cerebrale. In particolare è stato visto che i geni implicati in questo processo sono *FLNA*, richiesto per l'allontanamento dei neuroni dalla zona ventricolare, *LIS1* e *DCX*, necessari per la successiva migrazione di questi neuroni verso la corteccia, e i geni *RELN*, *DAB1*, *VLDLR*, *APOER2*, *CDK5* e *P35* che permettono il passaggio dei neuroni attraverso la piastra corticale. Lo studio dei geni che guidano la migrazione neuronale è di fondamentale importanza per la comprensione delle anomalie dello sviluppo corticale che spesso sono associate a gravi forme di epilessia e di ritardo mentale.

In questo studio è stata effettuata un'analisi clinica, neuroradiologica e molecolare di pazienti con malformazioni della corteccia cerebrale determinate da disturbi della migrazione neuronale (lissencefalie, eterotopia nodulare periventricolare) e da anomalie dell'organizzazione corticale (polimicrogirie). È stata eseguita una

analisi di mutazione mediante DHPLC e sequenziamento diretto dei geni che sono responsabili di tali malformazioni: *LISI*, *DCX*, *FLNA*, *GPR56*. Inoltre, l'elevata sensibilità e la natura quantitativa della metodica dHPLC ci hanno consentito di caratterizzare due casi di mosaicismo somatico del gene *FLNA*. La DHPLC rappresenta quindi una valida metodica da utilizzare quando si deve effettuare, in un numero elevato di individui, un'analisi di mutazione rapida e sensibile di un gene di grandi dimensioni come *FLNA*. I risultati da noi ottenuti evidenziano inoltre come tale metodica sia di grande utilità per l'identificazione e la caratterizzazione di mutazioni presenti sotto forma di mosaico somatico. Infine l'utilizzo di una nuova metodica definita MLPA ci ha permesso di identificare delezioni e duplicazioni genomiche in pazienti con lissencefalia e eterotopia a banda sottocorticale che erano risultati negativi all'analisi di mutazione dei geni *LISI* e *DCX* effettuata con le metodiche standard.

I risultati ottenuti sono stati utilizzati per effettuare correlazioni genotipo-fenotipo all'interno della casistica di pazienti con malformazioni della corteccia cerebrale pervenuti al nostro centro. In particolare, la tipologia di mutazioni da noi individuate (mutazioni missenso, mutazioni troncanti, delezioni o duplicazioni) e la loro localizzazione all'interno della proteina (ad esempio mutazioni in regioni conservate o in domini coinvolti in meccanismi funzionali importanti) sono stati correlati con i dati neuroradiologici, il livello cognitivo e la presenza di epilessia.

I risultati di questo studio sono importanti per formulare linee guida cliniche e genetiche per il trattamento dei pazienti con malformazioni corticali e per offrire una adeguata consulenza genetica alle famiglie dei pazienti affetti.

INTRODUZIONE

1.1 Le malformazioni corticali

Le malformazioni della corteccia cerebrale rappresentano una delle principali cause di ritardo dello sviluppo ed epilessia (Guerrini *et al.*, 1996; Barkovich *et al.*, 1996; Barkovich *et al.*, 2001). Le malformazioni più gravi si manifestano con ritardo dello sviluppo ed epilessia ad esordio precoce resistente al trattamento farmacologico. Le malformazioni più lievi vengono generalmente diagnosticate quando i pazienti si sottopongono ad osservazione in seguito ad una prima crisi epilettica. L'utilizzo della Risonanza Magnetica (MRI) è di fondamentale importanza nello studio delle malformazioni corticali, in quanto permette di apprezzare le variazioni nella distribuzione e nella profondità dei solchi corticali, lo spessore della corteccia cerebrale e le zone di passaggio dalla materia bianca a quella grigia. Ciò rende possibile l'associazione del quadro neuroradiologico ad un particolare pattern malformativo. Le malformazioni corticali spesso sono dovute a disturbi della migrazione neuronale, un processo che avviene durante le fasi iniziali dello sviluppo embrionale.

1.2 La migrazione neuronale

Durante l'embriogenesi, i neuroni abbandonano la regione proliferativa del telencefalo in corso di sviluppo e vanno a disporsi, con un processo definito migrazione neuronale, nella piastra corticale che rappresenta la loro sede definitiva. Al termine del processo di migrazione i neuroni si organizzano in sei strati che vanno a costituire la corteccia cerebrale dell'adulto (Gleeson and Walsh, 2000b). Inizialmente le cellule del neuro-epitelio del tubo neuronale embrionale, i precursori dei neuroni e della glia, vanno incontro a numerosi cicli di proliferazione a livello della zona ventricolare (parte più profonda del cervello) fino a che non abbandonano la zona ventricolare ed iniziano

il processo di formazione della corteccia cerebrale (Rakic, 1972). Lo sviluppo corticale è un processo complesso che può essere suddiviso in tre fasi. Il primo stadio è caratterizzato dalla formazione di una pre-piastra (Preplate, PP), una struttura transitoria che nell'uomo si forma intorno alla 8^a-9^a settimana dello sviluppo embrionale, mentre nello stadio successivo si ha la formazione di una piastra corticale (Cortical-Plate, CP) con una proliferazione di neuroblasti che dalla zona ventricolare (VZ) migrano lungo le fibre della glia radiale attraverso le cellule sparse della zona intermedia (IZ). I neuroni, durante la migrazione, penetrano nella pre-piastra, la suddividono in sub-piastra (Subplate, SP) e zona marginale (Marginal zone, MZ) e si vanno a localizzare in mezzo a questi due strati andando a formare la piastra corticale. I neuroni che si generano successivamente attraversano la sub-piastra e si posizionano nella parte più superficiale (vicino alla zona marginale) della piastra corticale che si sta formando. In questo modo i neuroni che si trovano verso la parte esterna della piastra corticale sono quelli che si sono generati per ultimi. I neuroni che hanno raggiunto per primi la piastra corticale sono generalmente di colore più chiaro rispetto a quelli che sono arrivati successivamente. Lo stadio di piastra corticale viene raggiunto tra la 10^a e la 18^a settimana dello sviluppo embrionale. L'ultima fase dello sviluppo embrionale è lo stadio adulto in cui si ha la laminazione della piastra corticale in una struttura a sei strati e la perdita della maggior parte delle cellule della zona marginale e della sub-piastra. Una volta che la migrazione neuronale è completata le cellule della glia radiale perdono la loro struttura morfologica estesa e si condensano in astrociti (Marin-Padilla, 1978; Angevine and Sidman, 1961; Sidman and Rakic, 1973; Gleeson and Walsh, 2000b; Fox and Walsh, 1999) (Fig. 1.1).

Recentemente è stato dimostrato che diversi geni sono coinvolti nel processo di migrazione neuronale (Walsh and Reid, 1995). Durante lo stadio di piastra corticale il gene *FLNA* è richiesto per l'allontanamento dei neuroni dalla zona ventricolare, mentre i geni *LIS1* e *DCX* sono necessari per la successiva migrazione di questi neuroni verso la corteccia. Infine i geni *Reelin*, *DAB1*, *VLDLR* ed *APOER2* sono necessari perché permettono il passaggio dei neuroni attraverso la sub-piastra mentre i geni *CDK5* e *P35* permettono ai neuroni di penetrare all'interno della piastra corticale (Fig. 1.1).

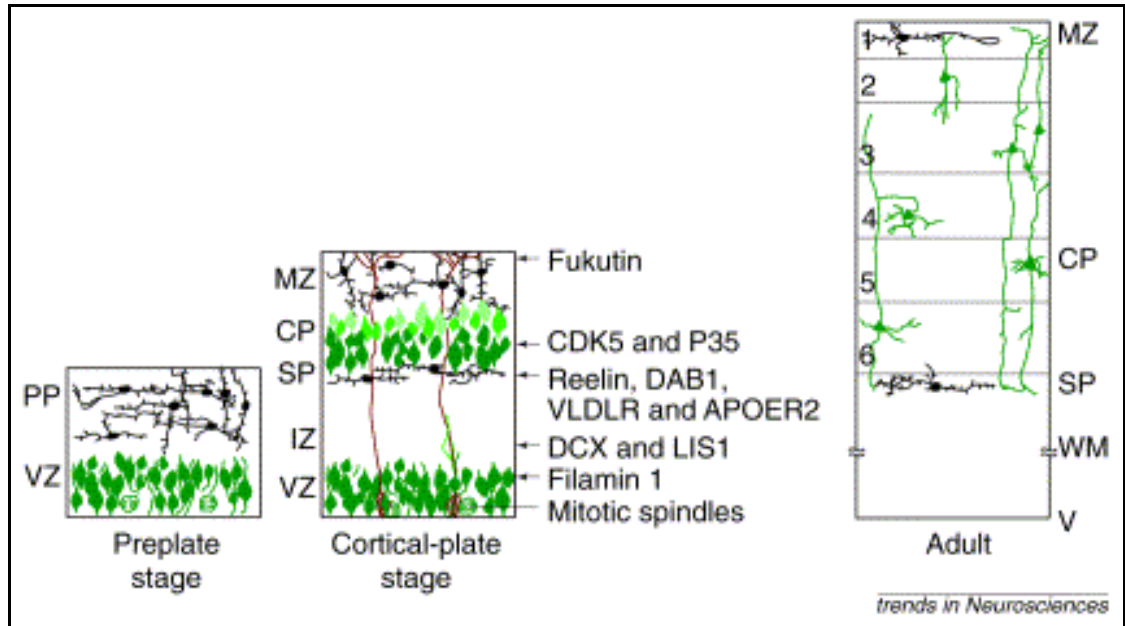


Figura 1.1. Stadi della migrazione neuronale durante lo sviluppo della corteccia cerebrale. Stadio 1 (Preplate stage): formazione della pre-piastra (Preplate, PP); Stadio 2 (Cortical-plate stage): formazione della piastra corticale (Cortical-plate, CP) interposta tra la sub-piastra (Subplate, SP) e la zona marginale (Marginal zone, MZ). I neuroni migrano dalla zona ventricolare (VZ) lungo le fibre della glia radiale (fasci marrone); Stadio 3 (Adult): formazione dei sei strati definitivi della corteccia cerebrale.

1.3 Disturbi della migrazione neuronale di origine genetica

Lo studio dei geni che guidano la migrazione neuronale è stato di fondamentale importanza per la comprensione delle anomalie dello sviluppo corticale che spesso sono associate a gravi forme di epilessia e di ritardo mentale (Brodtkorb *et al.*, 1992).

Il disturbo della migrazione neuronale di origine genetica più noto e meglio caratterizzato è quello ritrovato nel topo mutante naturale *reeler* in cui gli strati della corteccia cerebrale risultano invertiti rispetto al topo wild-type ed il cervelletto è significativamente poco sviluppato. Il difetto principale che si osserva nel topo *reeler* è dovuto al fatto che i nuovi neuroni che vanno a costituire la piastra corticale non si inseriscono nella pre-piastra ma si dispongono sotto di essa andando a definire una successione invertita dei sei strati della corteccia con i neuroni che migrano per ultimi che vanno a disporsi nello strato più profondo (Goffinet, 1984; Ogawa *et al.*, 1995) (Fig. 1.2). D'Arcangelo e collaboratori (1995) hanno clonato il gene *reelin*, le cui

alterazioni causano il topo mutante *reeler*. Tale gene codifica per una grande proteina extracellulare secreta dalle cellule di Cajal-Retzius della pre-piastra e della zona marginale (D'Arcangelo *et al.*, 1997). Hong e collaboratori (2000) hanno associato mutazioni nel gene *reelin* ad una forma recessiva di lissencefalia con ipoplasia del cervelletto. Recentemente sono state identificate diverse mutazioni in altri geni, quali *DABI*, *VLDLR* e *APOER2*, che determinano un fenotipo molto simile a quello del topo *reeler* dimostrando il coinvolgimento di questi geni nei disturbi della migrazione neuronale (Sheldon *et al.*, 1997; Hiesberger *et al.*, 1999).

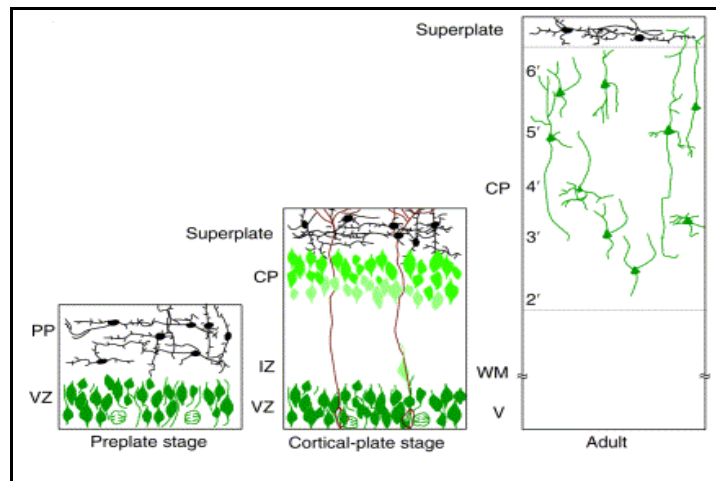


Figura 1.2. Meccanismo che determina il fenotipo del topo *reeler*. I neuroni che dovrebbero costituire la piastra corticale non penetrano attraverso la pre-piastra ma si dispongono sotto di essa. Non si forma la zona marginale, mentre le cellule della pre-piastra si organizzano in una struttura definita super-piastra (Superplate, SP). Nello stadio adulto del topo *reeler* si possono osservare i sei strati invertiti della corteccia cerebrale.

1.4 Spettro lissencefalia-eterotopia a banda sottocorticale (SBH)

1.4.1 Definizione e istopatologia

Il termine lissencefalia (LIS) deriva dal greco dove “lissos” significa sottile mentre “enkephalos” significa cervello. La lissencefalia è un disturbo della migrazione neuronale caratterizzato da circonvoluzioni corticali assenti (agiria) o diminuite (pachigiria) e da una superficie corticale liscia (Matell, 1893, Friede 1989). Sono stati osservati e descritti diversi tipi di lissencefalia. La forma più comune, nota come lissencefalia classica o di tipo 1, è caratterizzata da una corteccia spessa 10-20mm senza altre malformazioni associate.

La citoarchitettura della corteccia lissencefalia è costituita da quattro strati primitivi che includono: strato marginale esterno (strato 1) che contiene neuroni di Cajal-Retzius, uno strato cellulare superficiale (strato 2) che corrisponde alla corteccia vera e propria, uno strato a cellule variabili e sparse (strato 3) e uno strato di cellule profonde (strato 4) composto da neuroni medio-piccoli che costituiscono più della metà del manto corticale (Fig. 1.3). La sostanza bianca, che risulta notevolmente ridotta in volume, può contenere neuroni singoli o gruppi di neuroni che vanno a formare regioni di aree eterotopiche (Golden and Harding, 2004).

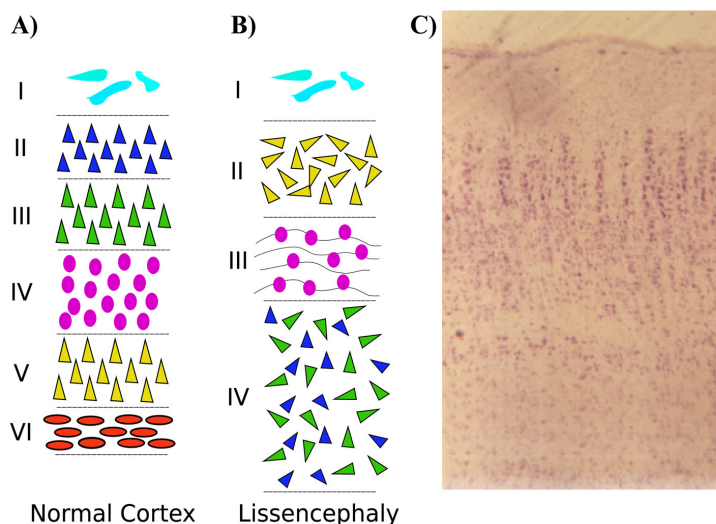


Figura 1.3. Schema della normale organizzazione corticale a 6 strati (A) e dell'organizzazione corticale nella lissencefalia (4 strati non organizzati) (B). (C) Sezione istopatologica di un paziente con lissencefalia.

L'eterotopia a banda sottocorticale (SBH) è un disturbo della migrazione neuronale che fa parte dello spettro delle lissencefalie, in cui bande bilaterali di sostanza grigia si vanno a localizzare all'interno della sostanza bianca tra la corteccia e i ventricoli laterali (Barkovich, 2000). L' SBH può apparire come una banda spessa di tessuto eterotopico o come “isole” di neuroni di sostanza grigia orientata radialmente e separata dalla sostanza bianca. Le cellule piramidali nella banda eterotopica possono apparire più piccole del normale se comparate con quelle della corteccia sovrastante. Quest' ultima appare strutturalmente normale con l'eccezione della presenza di solchi poco profondi (Barkovich, 2000; D'Agostino *et al.*, 2002).

Le due forme più frequenti appartenenti allo spettro lissencefalia-eterotopia a banda sottocorticale sono la lissencefalia causata da mutazioni del gene *LIS1* (Reiner *et al.*, 1993) e la lissencefalia causata da mutazioni del gene *DCX* (Des Portes *et al.*, 1998a; Gleeson *et al.*, 1998).

Le alterazioni in questi due geni determinano una migrazione neuronale incompleta dalla zona ventricolare verso la piastra corticale (Hirotune *et al.*, 1998). Nei pazienti di entrambi i sessi con mutazione del gene *LIS1* e nei maschi con mutazione nel gene *DCX* in cui tutti i neuroni esprimono l'allele mutato, si ha un difetto della migrazione neuronale generalizzato con la conseguente formazione di una corteccia costituita solamente da quattro strati per altro non ben organizzati (Fig. 1.4.b-c). Nelle femmine con mutazione del gene *DCX* si ha invece una corteccia cerebrale normale costituita da sei strati e in aggiunta è possibile osservare, subito sotto la corteccia cerebrale, una sottile banda di materia bianca, seguita poi da una banda di materia grigia eterotopica di spessore e estensione variabile (Fig. 1.4.d-e). Tale eterotopia a banda sottocorticale (SBH) o “doppia corteccia” (DC) è la conseguenza di un mosaicismismo naturale che si ha nelle femmine in seguito al meccanismo di inattivazione del cromosoma X (Gleeson *et al.*, 2000c; Gleeson and Walsh, 2000b).

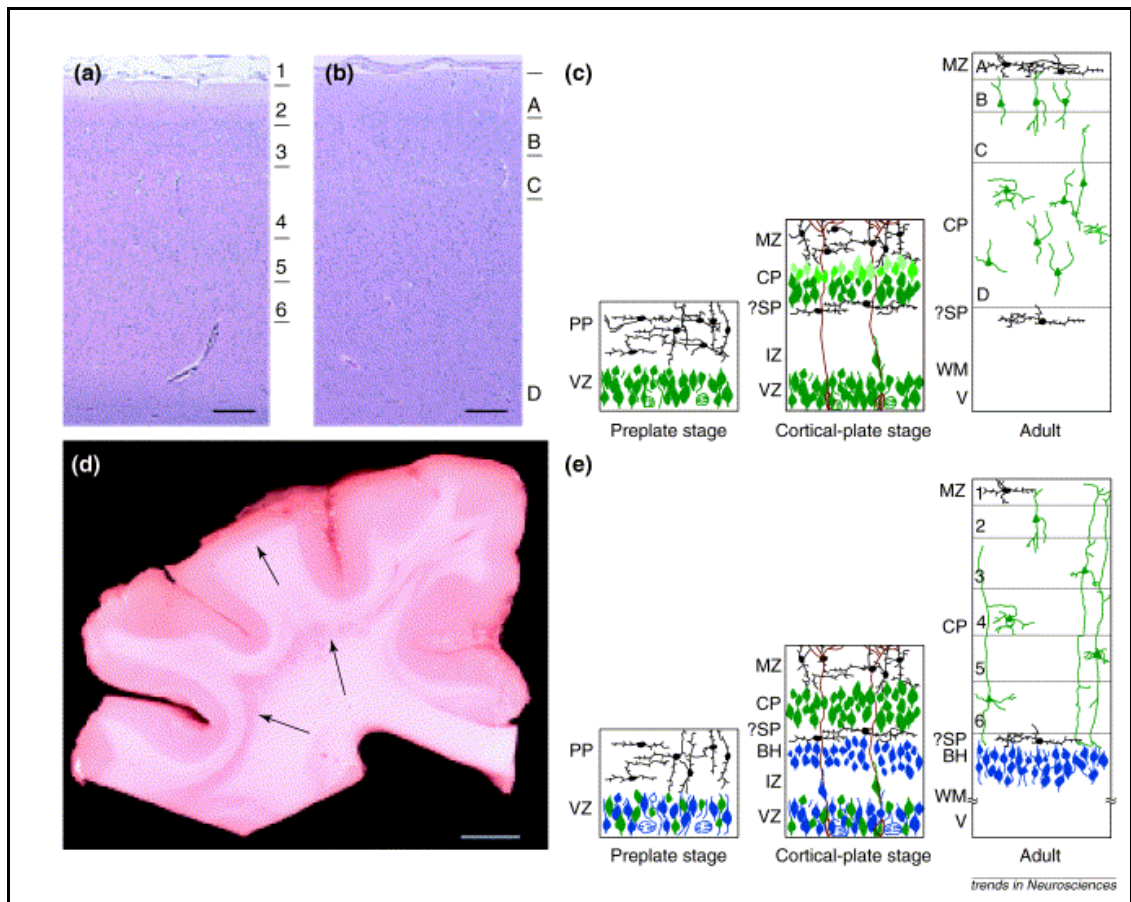


Figura 1.4. (a-b) Campioni citologici di corteccia cerebrale in un bambino normale di due anni (a) e in un bambino di due anni con lissencefalia (b). Nel campione normale si possono osservare i sei strati della corteccia, mentre nel campione con lissencefalia si osservano solo quattro strati di cellule neuronali peraltro senza una organizzazione corrispondente a quella dei sei strati normali. (c) Modello che rappresenta la formazione di quattro strati corticali non ben organizzati nei pazienti di entrambi i sessi con mutazione del gene *LISI* e nei maschi con mutazione nel gene *DCX*. (d) Campione patologico della corteccia cerebrale di una paziente con eterotopia a banda sottocorticale (le frecce indicano i neuroni eterotopici all'interno della sostanza bianca). (e) Modello che rappresenta lo sviluppo anormale della corteccia nelle femmine con eterotopia a banda sottocorticale. Si osserva una popolazione di neuroni che esprime il gene *DCX* normale (cellule in verde) e che migra correttamente a formare i sei strati della corteccia cerebrale; mentre una popolazione di neuroni che esprime il gene *DCX* mutato (cellule in blu) non migra verso la piastra corticale ma rimane a formare una banda eterotopica (BH) all'interno della sostanza bianca.

I pazienti con lissencefalia X-linked (associata a mutazioni del gene *DCX*) mostrano alla Risonanza Magnetica un quadro malformativo più grave in regione anteriore, mentre i pazienti con lissencefalia isolata (associata a mutazioni del gene *LIS1*) hanno un quadro più grave in sede occipitale (Fig. 1.5).

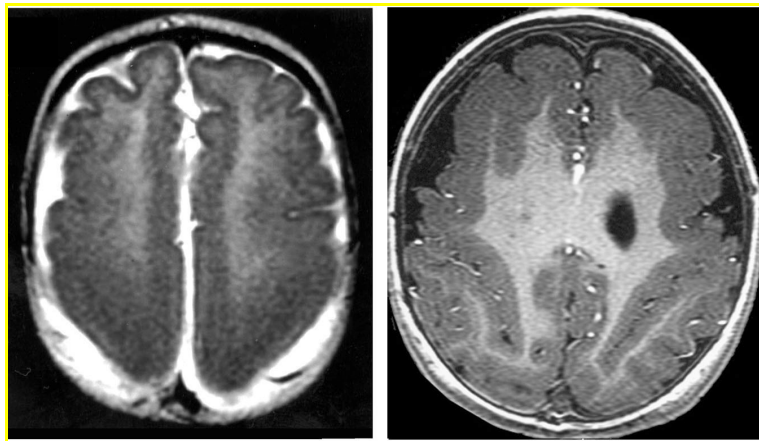


Figura 1.5. (A) RMI di un paziente portatore di una mutazione nel gene *LIS1*. (B) RMI di un paziente portatore di una mutazione del gene *DCX*. Si nota chiaramente il gradiente di gravità della malformazione che nel caso di *LIS1* è più grave in sede occipitale mentre nel caso di *DCX* è più grave in sede frontale.

Tra i pazienti con lissencefalia isolata il 40% presenta una delezione che comprende il gene *LIS1*, il 25% presenta una mutazione intragenica (20% mutazioni troncanti e 5% mutazioni missenso) (Pilz *et al.*, 1998). I pazienti con mutazioni missenso generalmente presentano malformazioni cerebrali meno gravi quali la pachigiria e raramente SBH e possono presentare anche lieve deficit cognitivo (Cardoso *et al.*, 2000). Mutazioni troncanti determinano invece fenotipi malformativi gravi quali la lissencefalia grave associata a ritardo mentale (Cardoso *et al.*, 2000). Recentemente sono stati descritte mutazioni di *LIS1* sotto forma di mosaico in pazienti con SBH nelle regioni posteriori del cervello (Sicca *et al.*, 2003).

Mutazioni del gene *DCX* principalmente causano SBH (Des Portes *et al.*, 1998b). Gli individui di sesso femminile con mutazioni in *DCX* hanno eterotopia a

banda/pachigiria prevalentemente in sede anteriore (Des Portes *et al.*, 1998b) (Fig. 1.5.b). In ogni modo, sono state descritti rari casi di donne portatrici di mutazioni missenso in *DCX* che presentavano un quadro di risonanza magnetica normale. Ciò era dovuto all'effetto di una inattivazione sbilanciata del cromosoma X a favore dell'allele normale o al fatto che la mutazione aveva conseguenze funzionali non gravi (Guerrini *et al.*, 2003). Mutazioni nelle regioni codificanti di *DCX* sono state trovate in tutte le famiglie riportate in letteratura, incluse quelle in cui le femmine avevano SBH e i maschi lissencefalia, e nell' 80% di casi sporadici femminili con SBH e nel 25% di casi sporadici maschili con SBH (Matsumoto *et al.*, 2001). Delezioni genomiche di *DCX* sono state trovate in casi sporadici di femmine con SBH e in maschi con lissencefalia X-linked (Sakamoto *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001). Mutazioni sotto forma di mosaico di *DCX* sono presenti nel 10% dei casi con SBH o lissencefalia X-linked (Gleeson *et al.*, 2000c). Infine sono stati descritti maschi emizigoti con mutazioni di *DCX* associate a lissencefalia classica e raramente a SBH predominante in sede anteriore (Pilz *et al.*, 1999).

Recentemente è stato dimostrato che una mutazione nel gene *Tuba 1* (*guanosine triphosphate binding pocket alpha-tubuline*) genera un topo mutante con anomalie della architettura laminare dell'ippocampo e della corteccia, accompagnate da alterazioni della migrazione neuronale (Keays *et al.*, 2007). Inoltre sono state identificate mutazioni nell'omologo umano *TUBA1A* (*TUBA3*) in due pazienti con lissencefalia. Il primo paziente presentava lissencefalia classica con una spessa corteccia disorganizzata, epilessia, grave ritardo mentale e problemi motori. Il secondo paziente presentava un fenotipo meno grave con pachigiria nelle regioni temporali e intorno al solco rolandico, accompagnate da una organizzazione anomala dell'ippocampo (Keays *et al.*, 2007). Successivamente sono state descritte altri 5 pazienti con lissencefalia e pachigiria variabile che presentavano mutazioni *de novo* in *TUBA1A* (Poirier *et al.*, 2007).

1.4.2 Patogenesi delle lissencefalie e modelli animali

Il gene *LIS1* codifica per una proteina di 45kD (PAFAH1B1) che funziona come subunità regolatoria del Platelet-activating factor—Acetylhydrolase /PAF-AH), un enzima che degrada il lipide bioattivo PAF. Il topo omozigote mutante per PAFAH1B1

muore allo stadio di trofoblasto, mentre il topo eterozigote è pressoché normale, anche se presenta a livello istopatologico una disorganizzazione della laminazione corticale dose dipendente e difetti ippocampali e cerebellari (Hirotune *et al.*, 1998). E' stato osservato che in seguito a trattamento con un agonista di PAF si ha una riduzione, in vitro, della migrazione delle cellule granulari cerebellari; ciò implica che la proteina LIS1 ha un ruolo essenziale nella migrazione (Hirotune *et al.*, 1998). E' stato visto che la proteina LIS1 co-localizza con i microtubuli e ne promuove la loro stabilizzazione. Una corretta migrazione neuronale in *Aspergillus nidulans* dipende da NudF, un ortologo di LIS1. NudF si associa nel lievito con NudC, il cui omologo umano in unione con LIS1 regola l'attività della dineina durante la mitosi delle cellule dei vertebrati, suggerendo che la lissencefalia classica è causata dalla perdita di funzionalità della dineina la quale è importante perché necessaria per la traslocazione nucleare (Xiang *et al.*, 1995; Vallee *et al.*, 2000; Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). Questa ipotesi è supportata dal fatto che LIS1 interagisce anche con NUDEL e mNudE per regolare la funzione motrice della dineina citoplasmatica e la localizzazione dentro le cellule. La perdita di funzione di NUDEL, di LIS1 o della dineina va a danneggiare il network di microtubuli associati al centrosoma e al nucleo. Ciò porta ad alterazioni nella traslocazione nucleare, nella migrazione cellulare e nel corretto posizionamento durante lo sviluppo corticale (Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). Inoltre, il pathway di LIS1/NUDEL è stato associato al pathway di Reelin/Cdk5/p35. La fosforilazione di NUDEL da parte di Cdk5 sembra controllare la sua corretta localizzazione cellulare e questo influenza quindi la funzione motrice della dineina (Niethammer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000) (Fig. 1.6).

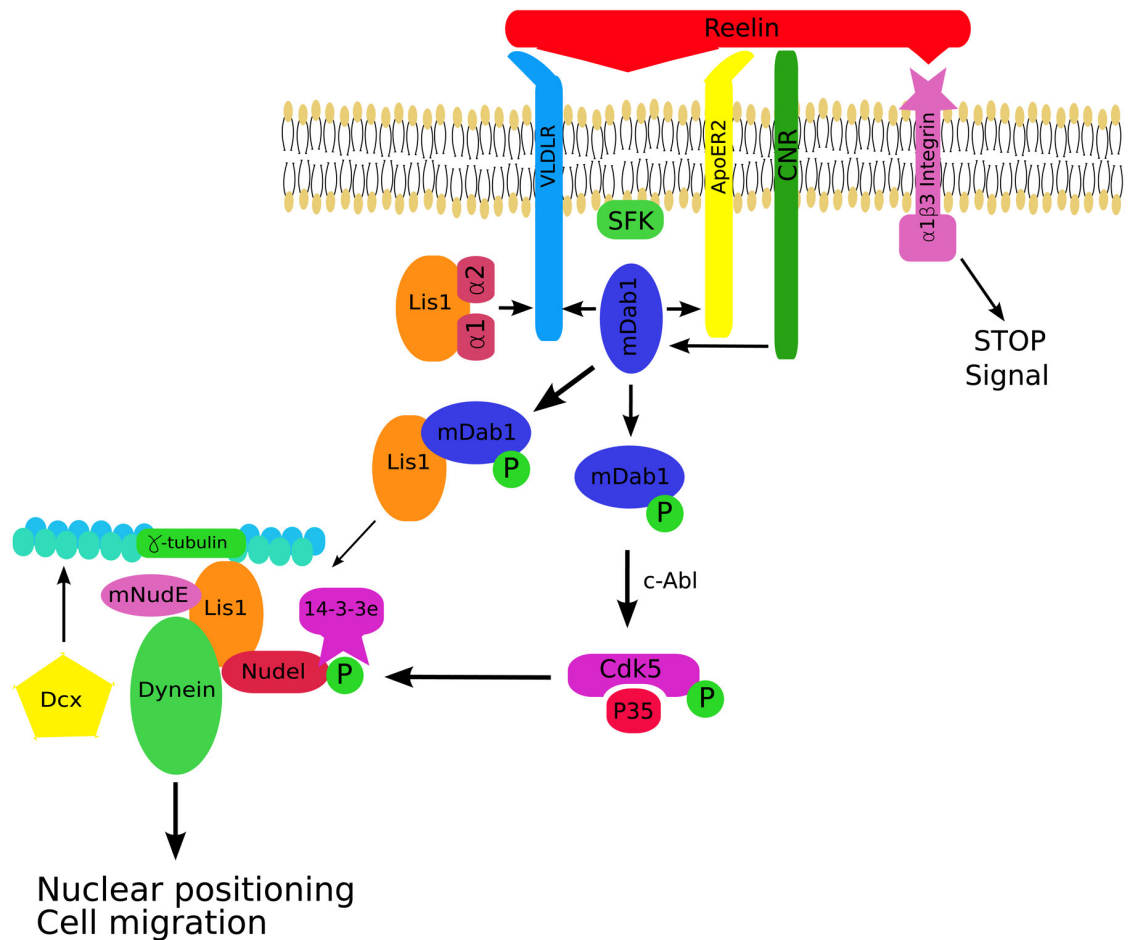


Figura 1.6. Pathways di LIS1 e Reelin e loro coinvolgimento nella migrazione neuronale. La proteina Reelin che si trova fuori dalla cellula si lega ad uno dei tre complessi recettoriali: cadherin-related neuronal receptor (Cnr), VldIR/ApoER2 o β 3integrin. Questo legame attiva mDab1, che a sua volta può attivare il complesso Cdk5/p35. Cdk5 può fosforilare diversi targets intracellulari tra cui Nudel; il quale una volta fosforilato forma un complesso con Lis1, mNudE, le dineine e i microtubuli. Questo complesso è necessario per la migrazione neuronale e il posizionamento nucleare. Si ipotizza inoltre che Dcx interagisca con Lis1 e moduli la funzione dei microtubuli. Infine, il legame di Reelin a VldR e ApoER2 causa l'attivazione della famiglia delle chinasi src (SFK) e la fosforilazione della proteina Dab1. In seguito all'attivazione di Reelin, Dab1 fosforilata interagisce con Lis1. Lis1 inoltre lega le subunità catalitiche del complesso Pafah1b (a1 e a2) e i componenti citoplasmatici del complesso della dineina. Le subunità catalitiche a1 e a2 del complesso Pafah1b inoltre si legano a VldIR e competono con Dab1 per il legame al recettore. Il legame delle subunità catalitiche di Pafah1b a VldIR potrebbe liberare la proteina Dab1 fosforilata (P-Dab) e promuovere così la sua interazione con Lis1 (Golden and Harding, 2004).

Il gene *DCX* mappa sul cromosoma Xq22.3q24 (Ross *et al.*, 1997; Des Portes *et al.*, 1998b; Gleeson *et al.*, 1998; Sossey-Alaoui *et al.*, 1998) e codifica per una proteina espressa nei neuroblasti che migrano, esclusivamente nel cervello fetale (Sapir *et al.*, 2000; Gleeson *et al.*, 2000a). La proteina DCX contiene due domini ripetuti in tandem e conservati da un punto di vista evolutivo (doublecortin domains), ciascuno dei quali si lega alla tubulina, e non direttamente ai microtubuli, andando a giocare un ruolo chiave nella polimerizzazione e stabilizzazione dei microtubuli. Esperimenti di mutagenesi in topi in cui la proteina DCX veniva distrutta hanno dimostrato che questi topi non presentavano un difetto a livello di corteccia (Corbo *et al.*, 2002). Recentemente, utilizzando RNA interference, è stata ridotta la funzionalità di Dcx in un modello animale che risultava avere SBH simile a quella osservata nell'uomo (Bai *et al.*, 2003). Questo modello ha permesso di esaminare direttamente il ruolo di DCX nella migrazione radiale e nella morfogenesi cellulare durante lo sviluppo corticale. In particolare, è stato dimostrato che DCX è necessaria per tutti i neuroni che durante la migrazione radiale passano dalla zona interventricolare alla piastra corticale (Bai *et al.*, 2003).

Le proteine Lis1 e Dcx mostrano una localizzazione sovrapponibile e possono interagire tra loro. E' stato dimostrato che Dcx e Lis1 coimmunoprecipitano dal lisato cerebrale e se purificate si legano in maniera cooperativa ai microtubuli (Caspi *et al.*, 2000). Studi su neuroni cerebellari di topo hanno dimostrato che Lis1 e Dcx interagiscono con la dineina per mediare l'interazione nucleo-centrosoma durante la migrazione neuronale, suggerendo che tale interazione può essere cruciale per la migrazione neuronale (Caspi *et al.*, 2000). Inoltre, LIS1 e DCX interagiscono fisicamente sia *in vivo* che *in vitro*, suggerendo che l'aggiunta di DCX e LIS1 alla tubulina aumenta la polimerizzazione dei microtubuli. In studi di competizione *in vitro*, quando LIS1 viene aggiunto per primo, DCX compete con LIS1 per il legame ai microtubuli, mentre quando DCX viene aggiunto per primo, favorisce il legame di LIS1 ai microtubuli (Caspi *et al.*, 2000). L'interazione di DCX e LIS1 è quindi importante per regolare il ruolo dei microtubuli nello sviluppo della corteccia cerebrale. L'interazione di DCX e LIS1 con i microtubuli può spiegare le notevoli somiglianze tra i fenotipi lissencefalici che risultano dalle mutazioni in uno dei due geni (Reiner, 2000).

1.4.3 Epidemiologia, caratteristiche cliniche e consulenza genetica

La lissencefalia classica è una malformazione corticale classica con una prevalenza di 11.7 per milioni di nati. Tutti gli individui affetti presentano ritardo dello sviluppo precoce, ipotonia diffusa, quadriparesi spastica, opistotono e ritardo mentale più o meno grave. L'aspettativa di vita dei pazienti con lissencefalia non supera i venti anni. L'epilessia è presente nel 90% dei casi con insorgenza prima dei 6 anni nel 75% dei casi. Circa l'80% dei bambini presentano spasmi infantili e crisi epilettiche di diverso tipo. Poiché la maggior parte degli studi clinici e neurofisiologici in bambini con lissencefalia è stata effettuata prima che fosse possibile effettuare una diagnosi genetica differenziale tra la forma autosomica di lissencefalia e quella X-linked, non è chiaro se queste due forme hanno diversi pattern elettroclinici (Guerrini and Carrozzo, 2001; Guerrini and Filippi, 2005).

Ad oggi, tutte le mutazioni riportate di *LIS1* sono de novo. Ad ogni modo, nel caso in cui venga identificata una mutazione in *LIS1* in un bambino con lissencefalia è corretto effettuare analisi di mutazione in entrambi i genitori, dato che potrebbe essere presente in uno dei due la mutazione sotto forma di mosaico germinale (rischio di ricorrenza dell'1%) (Guerrini and Carrozzo, 2001; Guerrini and Filippi, 2005).

Nel caso in cui venga identificata una mutazione del gene *DCX* in un maschio con lissencefalia, l'analisi molecolare di *DCX* deve essere estesa anche alla madre del probando, anche se essa presenta una risonanza magnetica normale (Guerrini *et al.*, 2003). Se la madre è portatrice della mutazione la trasmetterà con eredità mendeliana. Se la madre non è portatrice può comunque trasmetterla sotto forma di mosaico germinale. Per tale motivo, è corretto effettuare una diagnosi prenatale a ogni gravidanza di una donna che ha un bambino con caratteristiche di lissencefalia dovuta a mutazioni di *DCX* (Guerrini and Carrozzo, 2001; Guerrini and Filippi, 2005).

1.4.4 Sindrome di Miller-Dieker

Diverse sindromi malformative sono state associate alla lissencefalia, tra queste la più nota è la sindrome di Miller-Dieker che è causata da ampie delezioni

comprendenti il gene *LIS1* e i geni contigui contenuti nella regione cromosomica 17p13.3 (Dobyns *et al.*, 1993). I pazienti con sindrome di Miller-Dieker (MDS) presentano lissencefalia classica accompagnata da dismorfismi facciali caratteristici, tra cui fronte prominente, leggero ipertelorismo, pieghe dell'epicanto, naso corto, e narici anteverse. I bambini affetti presentano anche ritardo grave, epilessia e problemi di nutrizione. Le delezioni della regione 17p13.3 comprendono oltre a *LIS1* anche i geni *CRK* e *14-3-3*, i quali possono contribuire a determinare il quadro di lissencefalia più grave e le caratteristiche dismorfiche osservate nella MDS (Cardoso *et al.*, 2003).

1.4.5 Lissencefalia X-linked con agenesia del corpo calloso e genitali ambigui (XLAG)

La lissencefalia X-linked con agenesia del corpo calloso e genitali ambigui (XLAG) è una grave sindrome malformativa osservata solo nei maschi (Dobyns *et al.*, 1999). Lo spettro anatomoclinico include lissencefalia con gradiente P>A e un moderato incremento dello spessore corticale (6-7mm rispetto ai 15-20 osservati nella lissencefalia classica) (Fig. 1.7). Inoltre i pazienti presentano assenza del corpo calloso, microcefalia, epilessia dalla nascita, disfunzioni ipotalamiche e genitali ambigui con micropene e criptorchidismo (Bonneau *et al.*, 2002). Studi neuropatologici hanno evidenziato una lamina nazione anomala della corteccia, con un pattern che suggerisce distruzione della migrazione sia radiale che tangenziale, gangli basali displastici, bulbi olfattori displastici e completa agenesia del corpo calloso (Bonneau *et al.*, 2002).



Figura 1.7. Immagine di risonanza magnetica di un bambino di 1 anno con XLAG associata a mutazione nel gene ARX. Il paziente presenta lissencefalia, assenza del corpo calloso e ventriculomegalia.

Mutazioni del gene *ARX* (X-linked aristaless-related homeobox gene) sono state identificate in individui con XLAG. Le donne portatrici di mutazioni *ARX* generalmente hanno livello cognitivo normale e risonanza magnetica normale o parziale agenesia del corpo calloso (Kato *et al.*, 2004). Il gene *Arx* murino e umano sono espressi ad alti livelli nel telencefalo dorsale e ventrale, incluse la zona ventricolare e germinale delle eminenze ganglionali. In particolare, il gene *Arx* murino è espresso in maniera nelle linee neurali GABAergiche sia durante lo sviluppo che nell'età adulta (Kitamura *et al.*, 2002; Ohira *et al.*, 2002). I topi senza *Arx* mostrano migrazione tangenziale anomala e differenziazione anomala degli interneuroni GABAergici nelle eminenze ganglionali e nella neocorteccia (Kitamura *et al.*, 2002). Questo suggerisce che le diverse mutazioni di *ARX* possono alterare la funzionalità del sistema GABAergico a diversi livelli, causando le caratteristiche cliniche dei pazienti XLAG e in particolare possono spiegare l'encefalopatia epilettica neonatale osservata spesso nei maschi affetti.

I pazienti XLAG presentano prevalentemente mutazioni troncanti di *ARX*, mentre più rare mutazioni missense nei domini homeobox della proteina sono state trovate in pazienti con fenotipo XLAG meno grave (Stromme *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2004).

1.4.6 Lissencefalia autosomica recessiva con ipoplasia cerebellare

Una forma di lissencefalia autosomica recessiva associata a gravi anomalie del cervelletto e dell'ippocampo è stata mappata sul cromosoma 7q22 e sono state trovate mutazioni del gene *RELN* in pazienti con questo tipo di lissencefalia (Hong *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2001). Un fenotipo simile è stato precedentemente descritto come sindrome di Norman-Roberts. Il gene *RELN* codifica per una proteina della matrice extracellulare di 388kD che è coinvolta nella migrazione neuronale attraverso il legame con la proteina VLDLR (very low density lipoprotein receptor), con il recettore dell'apolipoproteina E, l'integrina $\alpha3\text{-}\beta1$ e il recettore per le caderine (CNR) (Hiesberger *et al.*, 1999).

Nel topo, le mutazioni di *Reln* causano ipoplasia cerebellare e anomalie della migrazione neuronale. In questi topi i neuroni non riescono a raggiungere la loro corretta localizzazione nel cervello in via di sviluppo, distruggendo l'organizzazione della corteccia cerebrale e cerebellare. L'ordine degli strati corticali risulta essere invertito (Caviness, 1982). Per tale motivo si ipotizza che *Reln* controlli le interazioni tra le cellule che sono critiche per il posizionamento corretto di queste ultime nel cervello (D'Arcangelo, 2006). È stato dimostrato che esiste una interazione tra i pathways di segnale di *Reln* e *Lis1* (Assadi *et al.*, 2003). L'interazione di *Reln* con le CNRs fosforila il messaggero citoplasmatico *mDab1* probabilmente attraverso il recettore VLDL (D'Arcangelo *et al.*, 1997; Senzaki *et al.*, 1999). L'*mDab1* fosforilato può interagire con diverse proteine, tra cui *Src*, coinvolta nel rimodellamento del citoscheletro, o con il protooncogene *c-Abl*. *c-Abl*, una volta attivato, fosforila e attiva *Cdk5* (Zukerberg *et al.*, 2000). *Cdk5* e *p35* (un'altro attivatore di *Cdk5*) sono a loro volta coinvolti nel guidare i neuroni nella loro corretta localizzazione nella corteccia cerebrale (Gilmore *et al.*, 1998). Inoltre, è stato dimostrato che entrambe le subunità alfa del *Pafah1b* legano il recettore VLDL, suggerendo che il complesso *Pafah1b* modula il pathway di *Reln*. Il legame delle subunità catalitiche di *Pafah1b* al recettore VLDL può liberare *mDab1* e promuovere la sua interazione con *Lis1* (D'Arcangelo *et al.*, 1997)(Fig. 1.6).

1.5 Eterotopia periventricolare

L'eterotopia periventricolare (periventricular heterotopia, PH) (OMIM, 2007) è un disturbo della migrazione neuronale in cui agglomerati di neuroni sono localizzati lungo le pareti dei ventricoli laterali (Fig. 1.8 e Fig.1.9.a), con distribuzione, estensione e gravità molto variabili, in associazione o meno con altre malformazioni del sistema nervoso centrale (ipoplasia cerebellare con mega cisterna magna e agenesia del corpo calloso) (Poussaint *et al.*, 2000; Barkovich, 2000). Il termine eterotopia indica la presenza di agglomerati di neuroni morfologicamente normali presenti però in una sede atipica.

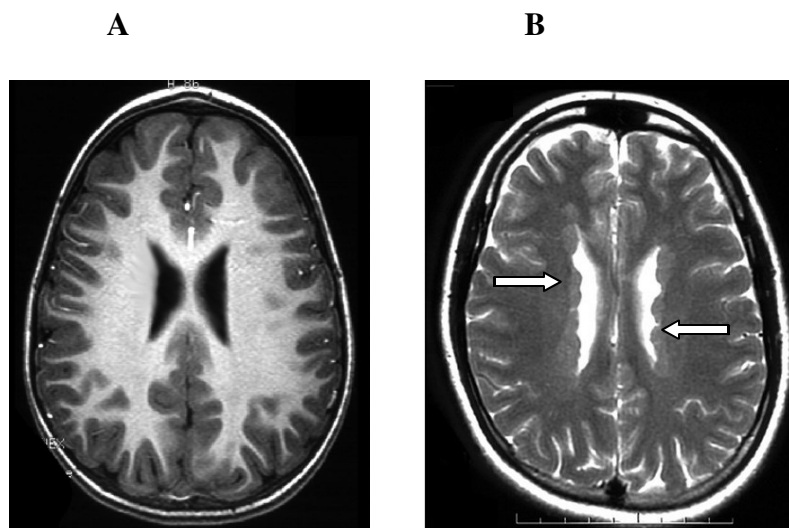


Figura 1.8. (A) MRI di un cervello normale e (B) di un cervello di un paziente affetto da eterotopia periventricolare dovuta a mutazione di *FLNA*. Le frecce bianche indicano i noduli presenti in sede periventricolare.

La MRI mostra che i gruppi di neuroni eterotopici presentano lo stesso segnale di quelli presenti nella corteccia normale. L'attività metabolica dei neuroni eterotopici è identica a quella generata dai neuroni presenti nella sostanza grigia (Falconer, 1990). E'

stato dimostrato che l'attività epilettica può insorgere sia dalla corteccia eterotopica che dalla corteccia cerebrale sovrastante (Munari, 1996).

Sebbene la maggior parte dei pazienti con PNH arrivano all'attenzione del medico in seguito all'insorgenza di crisi epilettiche, lo spettro delle manifestazioni che di un paziente con PNH è ampio (Parrini *et al.*, 2006).

Sono state descritte una forma di PH X-linked dominante, familiare e sporadica (Eksioglu *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1998; Sheen *et al.*, 2001; Moro *et al.*, 2002), di gran lunga più frequente, e forme recessive (Nezelof *et al.*, 1976; Palm *et al.*, 1986; Vles *et al.*, 1990; Vles *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1996; Dobyns *et al.*, 1996; Guerrini *et al.*, 1998; Guion-Almeida *et al.*, 1999; Sheen *et al.*, 2003a). Recentemente è stata descritta (Sheen *et al.*, 2004a) una forma recessiva di PH associata a microcefalia causata da mutazioni nel gene *ARFGEF2* (*ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor-2*) localizzato in 20q11.21-13.2. *ARFGEF2* codifica per la proteina BIG2 (brefeldin A-inhibited GEF2) di circa 200 kDa, espressa nel sistema nervoso centrale che risulta essere coinvolta nel traffico vescicolare. Sheen e collaboratori (2004a) hanno dimostrato che tale meccanismo gioca un ruolo chiave nella regolazione della proliferazione e migrazione neuronale, durante lo sviluppo della corteccia cerebrale. Infatti mutazioni in *ARFGEF2* portano a un traffico vescicolare non corretto che impedisce a molecole polarizzate quali la E-Caderina e la beta-catenina di raggiungere la superficie cellulare con conseguente distruzione della proliferazione e migrazione durante lo sviluppo corticale. I bambini con questa forma recessiva di PNH presentano microcefalia, ritardo grave e epilessia a insorgenza precoce.

Recentemente sono stati descritti casi di PNH e riarrangiamenti cromosomici quali le duplicazioni delle regioni 5p15.1 e 5p15.33 (Sheen *et al.*, 2003b), la delezione della regione 1p36 (Neal *et al.*, 2006) e la delezione della regione 7q11.23 (Ferland *et al.*, 2006). Inoltre la PNH è stata osservata anche in pazienti con idrocefalo, malformazioni frontonasali, ritardo mentale grave e sindattilia, sindrome di Ehlers-Danlos, sindrome dell' X-Fragile o nefrosi (Parrini *et al.*, 2006). In alcune di queste sindromi la malformazione corticale può essere dovuta a piccoli riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono il gene *FLNA* e/o altri geni non noti.

Nell'eterotopia periventricolare X-linked le femmine, in seguito al fenomeno di inattivazione del cromosoma X (Eksioglu *et al.*, 1996) sono mosaici naturali per due popolazioni di neuroni: una che possiede un allele normale e che migra correttamente a formare la piastra corticale, ed una che possiede un allele mutato e che rimane localizzata nella zona ventricolare (Fig. 1.9.b) (Gleeson and Walsh, 2000b).

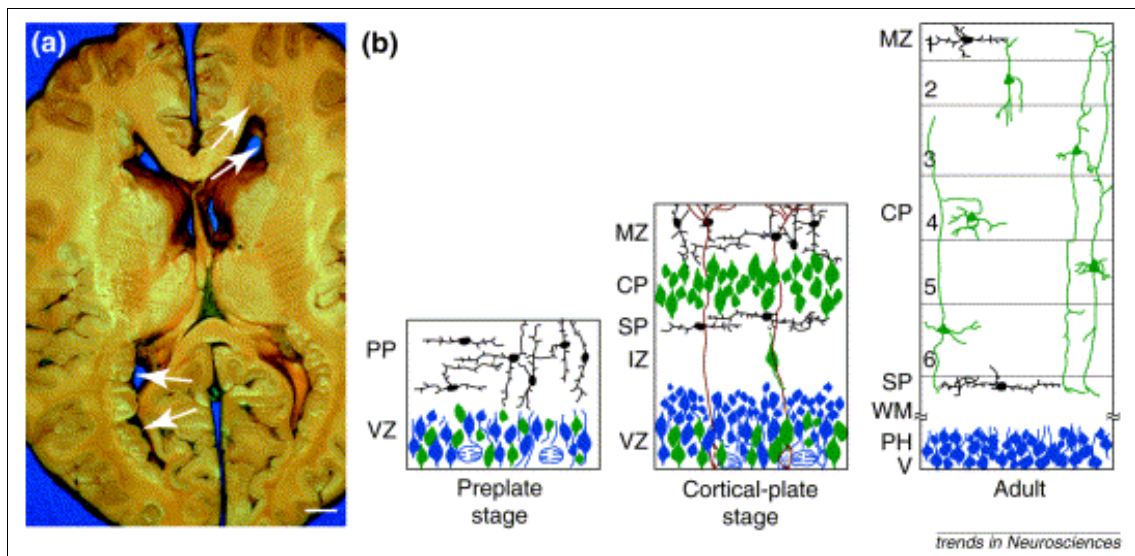


Figura 1.9. (a) Campione anatomico-patologico di una donna con eterotopia periventricolare in cui si osservano i noduli eterotopici lungo i ventricoli (freccie bianche). (b) Modello che spiega lo sviluppo anomale della corteccia cerebrale nell' eterotopia periventricolare. In seguito al fenomeno di inattivazione del cromosoma X nelle femmine, si osserva una popolazione di neuroni che esprime il gene *FLNA* normale (cellule in verde) e una popolazione di neuroni che esprime il gene *FLNA* mutato (cellule in blu). I neuroni che esprimono il gene normale migrano a formare la piastra corticale, mentre quelli con il gene mutato rimangono nella zona ventricolare a formare i noduli eterotopici (PH) lungo la parete laterale dei ventricoli (V).

La forma di PH X-linked dominante è causata da mutazioni del gene *Filamin A* (*FLNA*) (Fox *et al.*, 1998) inizialmente identificato e clonato da Gorlin e collaboratori (1990) e localizzato sul cromosoma Xq28 (Maestrini *et al.*, 1992; Eksioglu *et al.*, 1996) (Fig. 1.10).

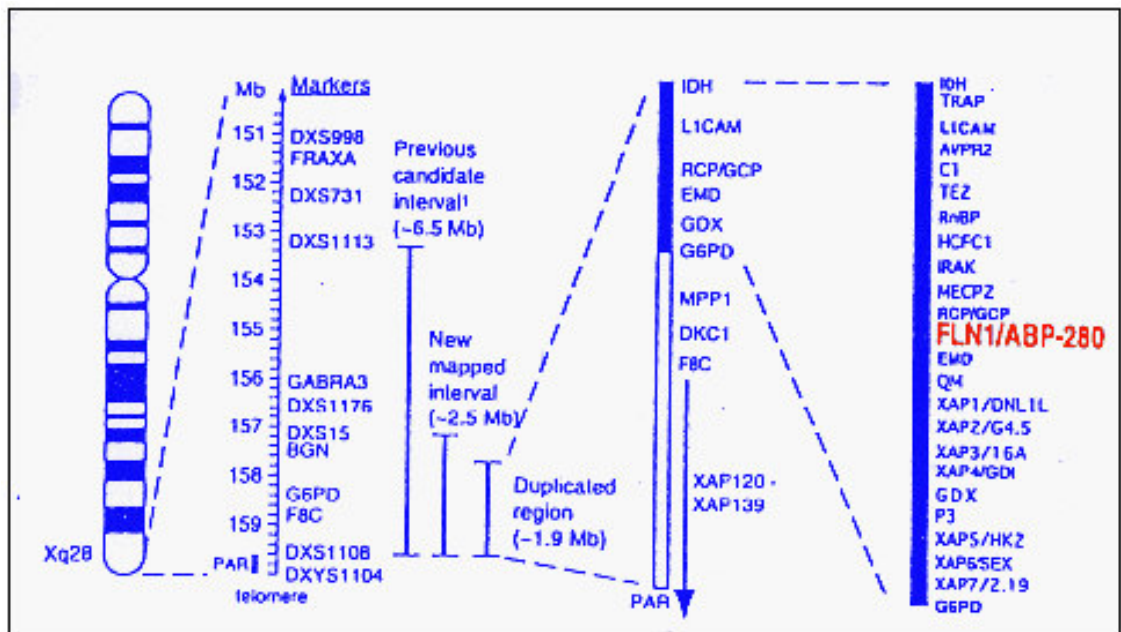


Figura 1.10. Mappa fisica e genetica del locus in Xq28 per l'eterotopia periventricolare

Il gene *FLNA* e' composto da 47 esoni, copre una sequenza genomica di 26kbp ed ha un Open Reading Frame (ORF) di 7.9kb (Patrosso *et al.*, 1994).

FLNA codifica per una fosfoproteina dimerica citoplasmatica di 2647 aminoacidi e di 280 KDa, conosciuta come FLNA (o FLN1, Actin-Binding Protein 280, ABP-280, filamina non muscolare), caratterizzata da tre domini funzionali principali (Fig. 1.11) (Gorlin *et al.*, 1990).

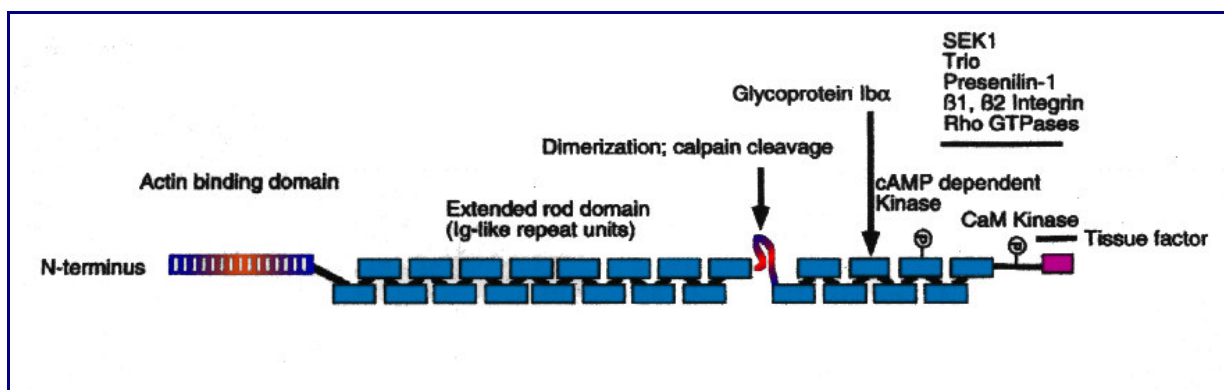


Figura 1.11. Modello schematico della proteina FLNA in cui sono rappresentati, da sinistra verso destra, i tre domini: il dominio N-terminale, il rod-domain e il dominio C-terminale. Sono inoltre indicate alcune delle molecole con cui FLNA interagisce

Il primo dominio, localizzato nella regione amino-terminale, è quello responsabile del legame con l'actina ed è molto simile a quello delle altre proteine leganti l'actina come ad esempio la distrofina (Van der Flier *et al.*, 2001). Il secondo dominio è composto da 24 ripetizioni di 96 aminoacidi. Questo dominio, denominato rod-domain, è interrotto tra le ripetizioni 15 e 16 e tra le ripetizioni 23 e 24 da due corte sequenze aminoacidiche di 20-40 residui ciascuna. Queste interruzioni formano delle anse flessibili e rappresentano i siti di taglio proteolitico (hinge regions) (Van der Flier *et al.*, 2001). A livello delle ripetizioni 17-19 è localizzato il sito di legame per la Glicoproteina Iba α , una subunità del recettore per il fattore von Willebrand (vWF) coinvolto nell'aggregazione delle piastrine (Berndt *et al.*, 1985; Englund *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 1998; Van der Flier *et al.*, 2001). La porzione carbossi-terminale della proteina contiene il sito di omodimerizzazione e i siti di legame con diverse proteine intracellulari tra cui le integrine $\beta 1$ e $\beta 2$, il fattore tissutale e la presinilina 1 (Gorlin *et al.* 1990; Van der Flier *et al.*, 2001) (Tabella 1.1).

Tabella 1.1. Proteine intracellulari che interagiscono con la proteina FLNA

PROTEINA	REPEAT DI FLNA
<i>Proteine transmembrana</i>	
GP-1b α	17-19
Integrine β 1A, β 1D, 3, 7	20-24
Fc γ PI	n.d.
Fattore Tissutale (TF)	23-24
Recettore 3 della Dopamina D2	16-19
(D)-Preselinina 1,2	21-24
Recettore della Furina	13-14
Calveolina 1	22-24
Kv4.2 canale del Potassio	C-term
<i>Proteine segnale</i>	
RalA, RhoA, Rac1, Cdc42	24
SEK 1	22-23
TRAF2	15-19
Trio	23-24
Recettore per gli Androgeni (AR)	16-19
<i>Proteine citoplasmatiche</i>	
cvHSP	23-24
Granzyme B	20-24

n.d.= non determinato; C-term = Carbossi – terminale

La distruzione mirata del gene omologo di *FLNA* in *Dictyostelium Amoebae* distrugge il network dei filamenti di actina, blocca la formazione degli pseudopodi e compromette la motilità cellulare (Saxe, 1999). Il citoscheletro di actina è fondamentale per la corretta migrazione dei neuroni ed è stato ipotizzato che FLNA possa avere un ruolo nel promuovere la formazione del network di actina legando il complesso Cdk5/p35/Rac/Pak1 che è un modulatore della migrazione neuronale (Nikolic *et al.*, 1998). Il legame di FLNA con molteplici recettori di membrana e con l'actina permette la formazione di links cruciali per la trasduzione del segnale al citoscheletro, con rilevanti conseguenze funzionali in fenomeni biologici quali la migrazione neuronale, l'angiogenesi e la coagulazione (Fox *et al.*, 1998) (Fig. 1.12).

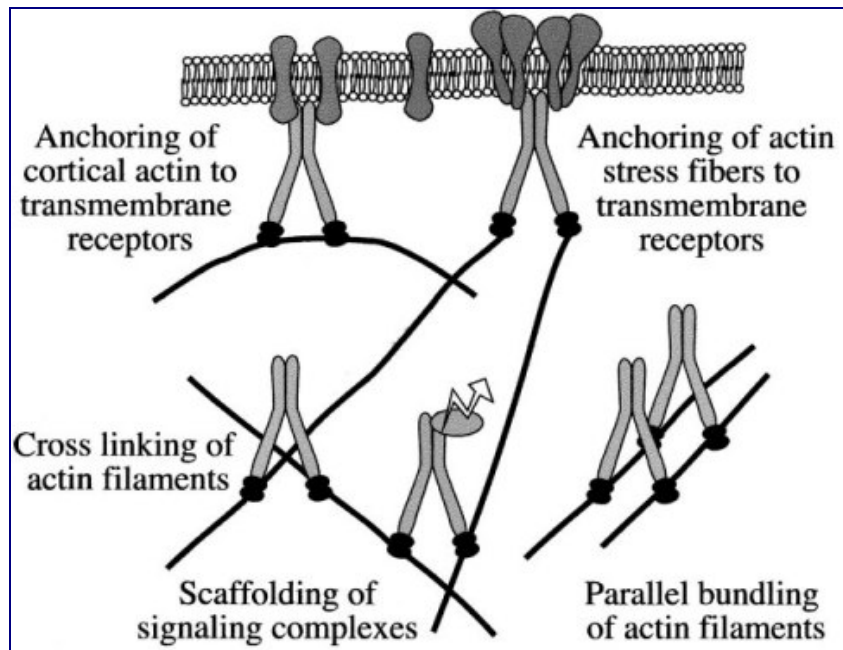


Figura 1.12. Modello schematico di come i dimeri di FLNA legano i filamenti di actina in fasci paralleli o networks di fibre perpendicolari mediando l'interazione dei recettori della membrana citoplasmatica con il citoscheletro di actina.

Ad oggi sono state identificate tre isoforme del gene *filamina*: *FLNA*, *FLNB* e *FLNC* che presentano una elevata omologia di sequenza tra di loro (intorno al 70%) ad eccezione delle due anse flessibili in cui l'omologia è più bassa (45%) (Van der Flier *et al.*, 2000). Mentre il gene *FLNA* mappa sul cromosoma X, i geni *FLNB* e *FLNC* sono localizzati su due cromosomi autosomici: *FLNB* in 3p14.3 e *FLNC* in 7q32-35. Le proteine *FLNA* e *FLNB* sono espresse ubiquitariamente in tutti i tessuti, mentre l'espressione di *FLNC* è ristretta al solo muscolo scheletrico e cardiaco (Van der Flier *et al.*, 2000). Inoltre la proteina *FLNA* è fortemente espressa durante la migrazione corticale (Maestrini *et al.*, 1993). Le proteine *FLNA* e *FLNB* colocalizzano all'interno dei precursori neuronali e per tale motivo è stata ipotizzata l'eterodimerizzazione di queste due isoforme (Sheen *et al.*, 2002). E' stato dimostrato che gli omologhi di *FLNA* sono coinvolti nella regolazione della stabilità cellulare, nella protrusione e nella

motilità attraverso vari sistemi biologici. L'ortologo murino Filamin A è molto espresso nel soma cellulare e durante i processi della migrazione neuronale ed è ampiamente distribuito lungo il manto corticale raggiungendo i livelli più alti nella zona ventricolare della corteccia durante la neurogenesi (Golden and Harding, 2004). Probabilmente FLNA influenza la migrazione dei neuroblasti durante lo sviluppo corticale dei vertebrati e quindi la PNH sarebbe una conseguenza dalla distruzione di tale processo. Un modello sulla funzione di FLNA postula che nei neuroni senza FLNA manchi una parte del motore che ne determina la migrazione e che quindi questi neuroni rimangono bloccati nella zona ventricolare. Un modello alternativo propone invece che FLNA funzioni precocemente durante lo sviluppo corticale come un componente dello switch che è necessario per un neurone per diventare competente per poi migrare dalla zona ventricolare alla corteccia. In questo ultimo modello FLNA funziona sempre facendo da legame tra il network di actina e la matrice cellulare ma mantiene un contatto statico tra un neurone fermo nella regione ventricolare e una cellula della glia radiale vicina. Come detto precedentemente FLNA è importante per la coagulazione e lo sviluppo vascolare. Il deficit di queste funzioni può spiegare la morte in epoca prenatale di alcuni maschi con mutazioni in *FLNA* (Sheen *et al.*, 2001). Questa ipotesi è stata confermata dall'osservazione di un bambino con PNH e mutazione di *FLNA* morto subito dopo la nascita in seguito a grave emorragia generalizzata (Guerrini *et al.*, 2004). La letalità dei maschi può essere dovuta anche a malformazioni cardiovascolari e intestinali. La perdita completa di *Flna* nei topi causa morte a livello embrionale, difetti cardiaci strutturali che coinvolgono sia ventricoli che gli atri, e anomalie vascolari (Feng *et al.*, 2006). Nonostante questi difetti generalizzati dello sviluppo, la migrazione e la motilità di diversi tipi cellulari, incluse le cellule della cresta neurale che non hanno *Flna*, non sembrano essere alterate (Feng *et al.*, 2006). Inoltre le cellule endoteliali in cui manca *Flna* possono presentare difetti a livello di interazione cellula-cellula, suggerendo che FLNA è importante nell'interazione cellula-cellula e durante lo sviluppo di molti organi (Feng *et al.*, 2006).

L'eterotopia periventricolare X-linked dominante si osserva prevalentemente in soggetti di sesso femminile (in ragione della alta letalità prenatale o neonatale nei maschi) con un rischio di ricorrenza del 50% nelle figlie di donne affette (Dobyns *et al.*, 1996). Le pazienti affette presentano generalmente epilessia e livello cognitivo borderline o normale. Anomalie cardiovascolari e della coagulazione sono state più volte

segnalate ma non caratterizzate in dettaglio. E' stato ipotizzato che anomalie cardiovascolari e della coagulazione possano essere responsabili della letalità embrionale o neonatale precoce nei maschi emizigoti (Fox *et al.*, 1998).

La maggior parte delle mutazioni di *FLNA* descritte sembrano causare un'interruzione precoce della proteina. Tuttavia mutazioni missenso e troncanti distali sono state recentemente osservate in casi sporadici e familiari ed in individui maschi affetti (Sheen *et al.*, 2001; Moro *et al.*, 2002). Sheen e collaboratori (2001) riportano mutazioni di *FLNA* in due maschi adulti con PH: il primo individuo, deceduto all'età di 36 anni per improvvisa rottura dell'aorta, era portatore di una mutazione nonsense nel dominio distale di legame della proteina con i recettori di membrana ed il secondo mostrava una mutazione missenso nella quinta ripetizione del rod-domain. Recentemente è stato confermato (Guerrini *et al.*, 2004) che maschi con eterotopia periventricolare associata a mutazioni del gene *FLNA* non muoiono necessariamente in epoca perinatale, ma possono sopravvivere ed avere dei figli. Tali dati fanno supporre che uno spettro più ampio di fenotipi clinici possa essere associato a differenti mutazioni e che mutazioni in maschi emizigoti non siano invariabilmente accompagnate ad esito infausto in epoca prenatale o neonatale se associate ad un danno funzionale parziale di *FLNA*.

Inoltre è stato dimostrato che mutazioni missense localizzate in specifiche regioni del gene *FLNA* possono causare malformazioni congenite afferenti allo spettro della sindrome Oto-Palato-Digitale (OPD tipo 1 e 2), Displasia Frontometafisaria e Sindrome di Melnick-Needles) (Robertson *et al.*, 2003), che può includere alterazioni delle strutture cranio-facciali, scheletriche, cerebrali, viscerali, urogenitali e cardiache.

La consulenza genetica può essere effettuata nei casi familiari di PNH con modello di ereditarietà X-linked. La PNH classica con ipoplasia cerebellare è più frequente negli individui di sesso femminile ed è più probabile che sia associata a mutazioni di *FLNA* di quanto lo siano i casi atipici. Tra le donne portatrici della mutazione di *FLNA* circa la metà hanno mutazioni *de novo* mentre le rimanenti hanno mutazioni ereditate. Sebbene la trasmissione della mutazione da madre a figlia sia quella più comune, è stato visto che anche una trasmissione da padre a figlia è possibile. Nel caso in cui nessuno dei due genitori di un probando con mutazione di *FLNA* abbia

epilessia o deficit cognitivo, la madre dovrebbe essere analizzata per prima per vedere se ha una risonanza magnetica alterata o se è portatrice della mutazione. Se la madre risultasse non avere la mutazione e se il probando è una figlia femmina allora diventerebbe necessario effettuare l'analisi di mutazione anche nel padre. Dato che mosaicismi germinale di *FLNA* non è mai stato descritto, il rischio di ricorrenza per un fratello o una sorella di un paziente con mutazione in *FLNA* sembra essere molto basso se i genitori non sono portatori della mutazione.

1.6 Polimicrogiria (PMG)

La polimicrogiria è una malformazione corticale caratterizzata da un numero eccessivo di circonvoluzioni piccole e prominenti separate da solchi poco profondi e allargati che conferiscono alla superficie corticale un aspetto nodoso (Friede *et al.*, 1989). Alla risonanza magnetica si possono osservare i ripiegamenti della corteccia tipici della polimicrogiria e l'ispessimento irregolare dovuto all'impaccamento delle microcirconvoluzioni, anche se le forme meno gravi sono più difficili da riconoscere al neuroimaging (Guerrini *et al.*, 1992). Sono state descritte due diverse tipologie istologiche di polimicrogiria. Nella polimicrogiria non stratificata lo strato molecolare è continuo e non segue il profilo delle circonvoluzioni; i neuroni sottostanti hanno una distribuzione radiale senza una organizzazione laminare (Guerrini and Filippi, 2005). Nella polimicrogiria a 4 strati è presente uno strato di necrosi laminare intracorticale che determina un danno alla migrazione tardiva con conseguente distruzione dell'organizzazione corticale (Harding and Copp, 1997). Le due tipologie di polimicrogiria non hanno necessariamente un'origine distinta e possono coesistere in aree corticali contigue (Harding and Copp, 1997).

Sono state descritte diverse sindromi con caratteristiche di polimicrogiria bilaterale tra cui la polimicrogiria bilaterale perisilviana (Kuziniecky *et al.*, 1993), la polimicrogiria bilaterale parasaggitale parietooccipitale (Guerrini *et al.*, 1997), la polimicrogiria bilaterale frontale e frontoparietale (Guerrini *et al.*, 2000; Piao *et al.*, 2004), la polimicrogiria perisilviana unilaterale e la polimicrogiria multilobare (Guerrini *et al.*, 1998) (Fig. 1.13). Queste diverse forme di polimicrogiria possono rappresentare

entità distinte che riflettono l'influenza di geni dello sviluppo espressi in diverse regioni cerebrali.

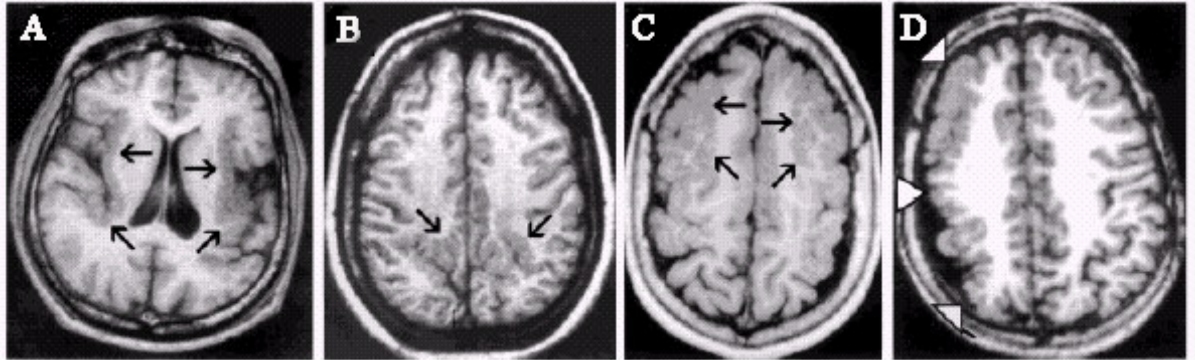


Figura 1.13. (A) Polimicrogiria bilaterale perisilviana, (B) Polimicrogiria bilaterale parasaggittale parietooccipitale, (C) Polimicrogiria bilaterale frontale, (D) Polimicrogiria unilaterale perisilviana)

1.6.1 Polimicrogiria bilaterale perisilviana (BPP)

Nella *polimicrogiria bilaterale perisilviana* (BPP) la polimicrogiria è limitata alle aree corticali che circondano la scissura silviana. Questa malformazione generalmente causa ritardo mentale da lieve a moderato, epilessia variabile e difficoltà nel linguaggio. La maggior parte dei casi sono sporadici sebbene siano state descritte numerose famiglie con polimicrogiria, che presentavano diversi modelli di ereditarietà tra cui X-linked, autosomico dominante e autosomico recessivo (Guerreiro *et al.*, 2000). Recentemente è stato descritto un maschio Australiano di 15 anni con una mutazione nel gene *SRPX2* localizzato in Xq22, epilessia rolandica e BPP (Roll *et al.*, 2006). La stessa mutazione è stata trovata anche nella madre e nella zia non affette, così come in due zie materne con lieve ritardo mentale ma risonanza magnetica normale. Una diversa mutazione di *SRPX2* è stata trovata in una famiglia francese che presenta epilessia rolandica, disprassia orale e del linguaggio e ritardo mentale di grado variabile (Roll *et al.*, 2006). *SRPX2* codifica per una proteina secreta caratterizzata da un peptide segnale e tre motivi “sushi-repeats”. L'espressione di *SRPX2* è stata dimostrata nella maggior

parte dei tessuti umani tra cui il cervello fetale e adulto ed in particolare nei neuroni perikarya dell'area rolandica (Roll *et al.*, 2006). Nel cervello murino la proteina SrpX2 compare nei neuroni alla nascita suggerendo che SRPX2 può giocare un ruolo importante nello sviluppo e nella funzione della regione perisilviana critica per il linguaggio e lo sviluppo cognitivo. Ad oggi l'associazione tra SRPX2 e la BPP non è stata confermata in altri casi.

1.6.2 Polimicrogiria bilaterale frontoparietale (BFPP)

La *polimicrogiria bilaterale frontale* è stata descritta in bambini con ritardo dello sviluppo, quadriparesi spastica lieve ed epilessia (Guerrini *et al.*, 2000). La *polimicrogiria bilaterale frontoparietale (BFPP)* è invece una forma di polimicrogiria che si estende dalla regione frontale fino ai lobi parietali (Fig. 1.14A). Studi di linkage in famiglie consanguinee in cui la BFPP era trasmessa con modello autosomico recessivo hanno portato alla localizzazione sul cromosoma 16q12.2-21 del gene responsabile (Piao *et al.* 2002; Chang *et al.*, 2003) (Fig. 1.14B).

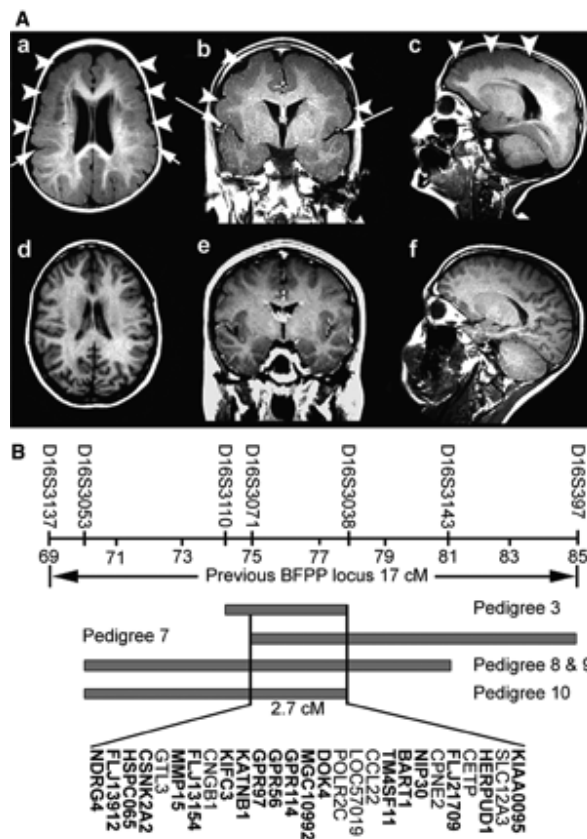


Figura 1.14. A) Immagini di risonanza magnetica di pazienti con BFPP (a-b-c) e individui sani (d-e-f): (a-d) assiali, (b-e) coronali, (c-f) sagittali. Le frecce indicano le regioni affette da polymicrogyria. Queste regioni sono caratterizzate da una corteccia sottile e giunzioni irregolari che creano un apparente ispessimento della corteccia. Si osserva una maggior gravità della PMG in sede frontale rispetto alla sede parietale (a). B) Schema della regione critica di 2.7cM sul cromosoma 16 contenente i geni candidati per la BFPP tra cui *GPR56*.

Sono state trovate 11 mutazioni del gene *GPR56* in 29 pazienti appartenenti a 18 famiglie con BFPP (Piao *et al.*, 2004; Piao *et al.*, 2005). Le principali caratteristiche cliniche della BFPP includono ritardo mentale grave, ritardo dello sviluppo, problemi di movimenti e di linguaggio ed epilessia di grado variabile. Le principali tipologie di epilessia erano crisi focali e assenze atipiche (Piao *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2003). *GPR56* è un membro della famiglia delle “G-protein-coupled receptors” (GPCRs), che rappresentano la più ampia famiglia di recettori del genoma umano e sono coinvolte nel riconoscimento e nella traduzione dei messaggi di piccole molecole come residui amminoacidici, nucleotidi, peptidi e proteine. Controllano inoltre l'attività enzimica, canali

ionici e il trasporto di vescicole attraverso la catalisi dello scambio GDP-GTP sulle proteine G eterotrimeriche (Bockaert *et al.*, 1999). Le GPCRs hanno in comune un dominio centrale costituito da 7 eliche transmembrana (da TM-I a TM-VII) connesse da tre anse intracellulari e tre extracellulari (Baldwin,1993). Due residui cisteina, che sono conservati nella maggior parte delle GPCRs, formano un ponte disulfidico probabilmente importante per la stabilizzazione di un numero ristretto di conformazioni delle 7 eliche transmembrana (Bockaert *et al.*, 1999).

GPR56 è un membro della famiglia B delle GPCRs (secretin-like receptors), nella quale il dominio N terminale e le anse extracellulari giocano un ruolo nel legame degli ormoni di peso molecolare quali il glucagone, la secretina e la latrotossina. L'unità di legame N-terminale consiste di 4 cisteine che probabilmente formano ponti disolfuro e domini simili alla mucina (Liu *et al.*, 1999; Fredriksson *et al.*, 2003). Il dominio N terminale presenta il 64% di omologia tra uomo e topo contro l'8% di omologia che motra invece il resto della proteina. Il fatto che GPR56 sia espresso nelle cellule progenitrici neuronali a tutti gli stadi dell'embriogenesi e che la sua assenza di espressione sia associata a sviluppo corticale anomalo della corteccia frontoparietale suggerisce che GPR56 giochi un ruolo essenziale nell'organizzazione della corteccia cerebrale nell'uomo (Piao *et al.*, 2004). Questi dati e il fatto che le regioni corticali più gravemente affette nella BFPP siano estremamente sottili implicano che GPR56 possa regolare lo sviluppo corticale (Piao *et al.*, 2004).

1.7 La metodica DHPLC

Una nuova tecnica nota come Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) sviluppata recentemente da Oefner e Underhill (Underhill *et al.*, 1997; Xiao and Oefner, 2001; Oefner and Huber, 2002), permette di riconoscere sostituzioni di singole basi, così come piccole inserzioni o delezioni all'interno di un amplicone in modo rapido, specifico e sensibile. L'analisi mediante DHPLC fornisce un risultato che indica solamente la presenza o l'assenza di un mismatch. Solo attraverso il successivo sequenziamento diretto è possibile stabilire la localizzazione e la tipologia dell'alterazione riscontrata.

1.7.1 Principio di funzionamento della DHPLC in condizioni non denaturanti (50°C)

Lo sviluppo della metodica DHPLC è stato consentito dalla sintesi di una nuova fase stazionaria composta da particelle di poli-stirene-divinilbenzene non porose e alchilate di 2-3 μm di diametro, capaci di separare frammenti di DNA se utilizzate in una cromatografia liquida inversa a coppia ionica (Huber *et al.*, 1993a). Le colonne preparate con questa nuova fase stazionaria permettono, in condizioni non denaturanti, di ottenere la separazione di frammenti di DNA a doppio filamento (dsDNA) in base alla loro taglia, con una risoluzione paragonabile a quella ottenuta mediante elettroforesi capillare (Huber *et al.*, 1993b). Per permettere il legame del DNA, carico negativamente, alla fase stazionaria utilizzata nella colonna, neutra e idrofobica, è necessario introdurre il trietilenammonio acetato o TEAA, una molecola ponte che presenta uno ione anfifilico (ione trietilenamminico) e uno ione idrofilico (ione acetato) ed è quindi capace di interagire sia con il DNA che con la fase stazionaria.

Con l'aumentare della lunghezza del DNA aumenta anche il numero delle cariche negative presenti e di conseguenza il numero di molecole di TEAA che si troveranno ad interagire con il DNA. Ogni molecola di TEAA viene trattenuta dalla superficie idrofobica della fase stazionaria e di conseguenza la forza di legame della molecola di DNA alla fase stazionaria è direttamente proporzionale alla sua lunghezza. L'interazione idrofobica tra la fase stazionaria e la catena alchilica del TEAA viene indebolita con l'aumentare della percentuale di aceto nitrile (ACN) presente nella fase mobile (rapporto tra Buffer A e B di cui segue la composizione). Di conseguenza le molecole di DNA più corte saranno rilasciate prima delle molecole più lunghe a causa del loro minor contenuto di molecole di TEAA. E' per questa ragione che il tempo di ritenzione è direttamente proporzionale alla taglia del frammento di DNA.

Un esempio di efficienza di separazione di frammenti di dsDNA ottenuti dalla digestione enzimatica di pUC18 e pBR322 con Hae II e Msp I è mostrata in Figura 1.15.

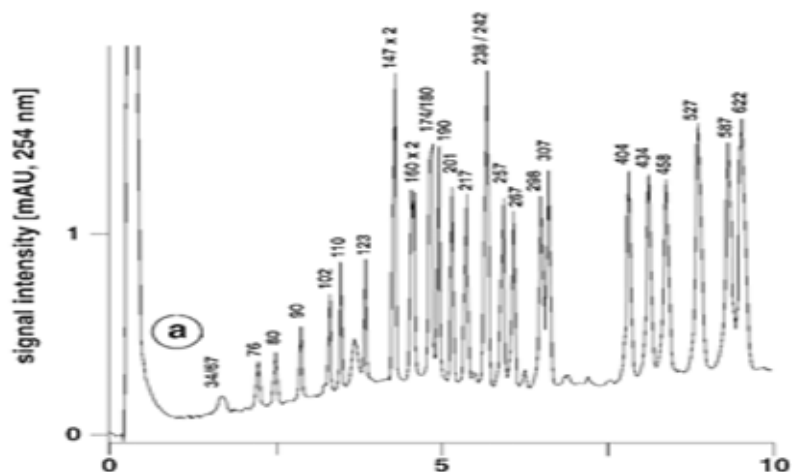


Figura 1.15. Risoluzione dei frammenti di dsDNA ottenuti dalla digestione enzimatica con HaeIII e MspI di pUC18 e pBR322.

1.7.2 Principio di funzionamento della DHPLC in condizioni parzialmente denaturanti (50°C-70°C)

Al di sopra di 50°C la separazione del DNA non è più dipendente dalla taglia in quanto entrano in gioco altri fattori legati alla composizione in basi del frammento di dsDNA. La coppia di basi AT ad esempio forma solo due legami a idrogeno mentre la coppia GC ne forma tre. Un frammento ricco di coppie di basi AT si denaturerà ad una temperatura inferiore rispetto a quella necessaria per la denaturazione di un frammento ricco di coppie di basi GC. I frammenti più ricchi in AT tendono quindi ad avere un tempo di ritenzione inferiore rispetto a quelli con forte composizione in coppie GC. Per questo motivo è possibile evidenziare un diverso tempo di ritenzione tra due frammenti identici in tutto tranne che in un singolo cambio di una coppia di basi (ad esempio una coppia GC sostituita con una AT) (Xiao and Oefner, 2001).

Se si amplifica mediante PCR il DNA di un individuo che è eterozigote per una mutazione o polimorfismo a singolo nucleotide, si ottengono due popolazioni di frammenti amplificati (ampliconi) che presentano un rapporto 1:1 di allele mutante e allele normale. Gli ampliconi, che rappresentano i due cromosomi, vengono denaturati e lentamente rinaturati. Durante questo passaggio si formano nuovamente gli

homoduplexes originali, ma si formano anche gli heteroduplexes contenenti il mismatch che risultano essere il frutto dell'appaiamento tra il filamento senso e antisense di entrambi gli homoduplexes (Fig. 1.16).

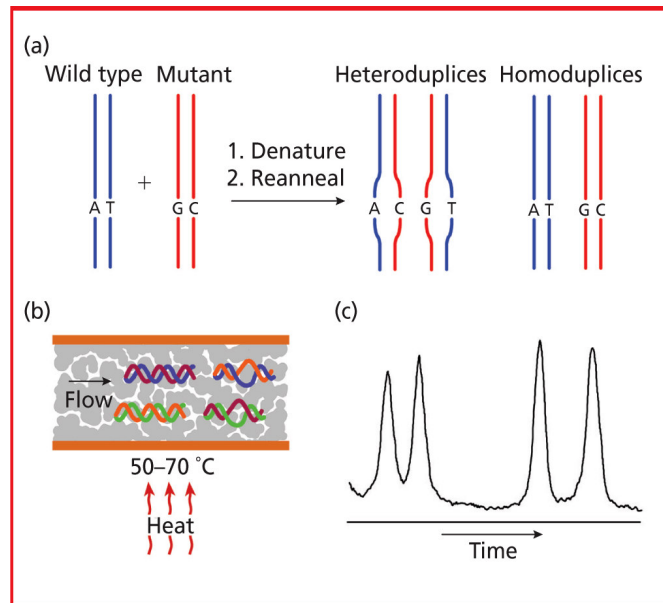


Figura 1.16. (a) Schema della formazione delle quattro specie molecolari ottenute mediante denaturazione e lenta rinaturazione di ampliconi contenenti un cambio nucleotidico. (b) Schema della separazione a livello della colonna. (c) Profilo di eluizione delle quattro specie molecolari.

Per ottenere questo tipo di mismatch in campioni dove si sospetta la presenza di un cambio nucleotidico in omozigosi, è necessario effettuare un mescolamento tra gli ampliconi in analisi, e quelli provenienti da un DNA di controllo.

L'analisi su DHPLC viene eseguita ad una temperatura tale (50°C-70°C) da denaturare parzialmente gli ampliconi contenenti il mismatch (heteroduplexes). Gli heteroduplexes vengono discriminati dai corrispondenti homoduplexes grazie alla cromatografia liquida inversa a coppia ionica descritta precedentemente. Questa procedura che sfrutta una temperatura parzialmente denaturante è nota anche come Temperature Modulated Heteroduplex Chromatography (TMHC) o Analisis (TMHA)

(Kuklin *et al.*, 1997). La capacità di discriminazione degli heteroduplexes dagli homoduplexes è legata alla temperatura di analisi utilizzata (Fig. 1.17).

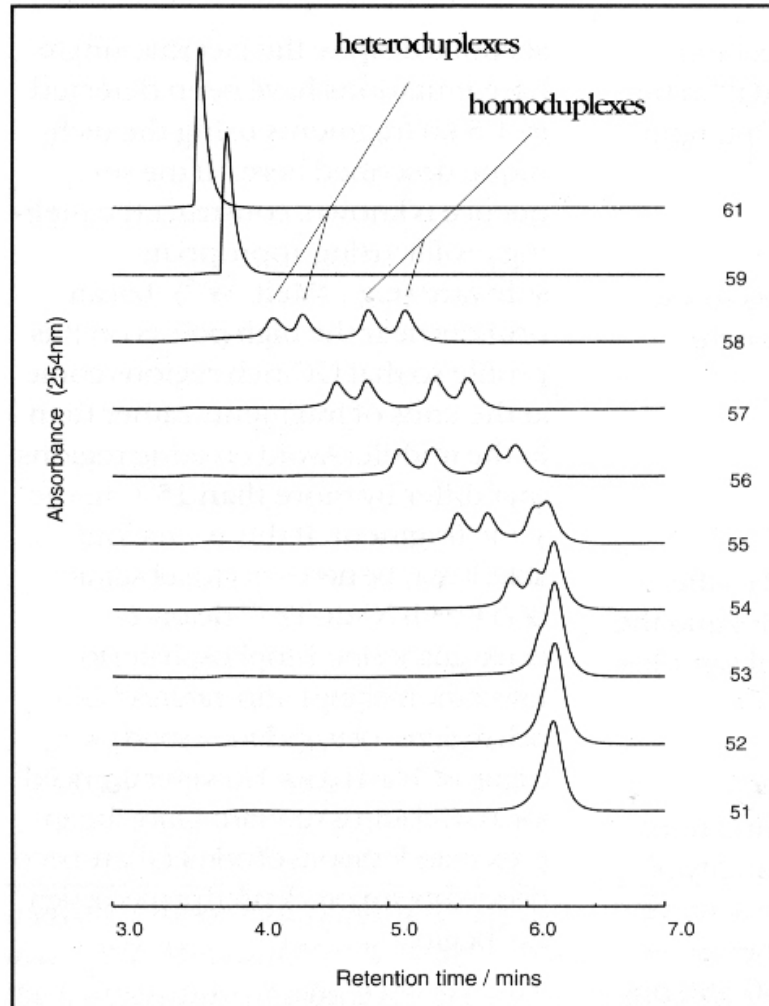


Figura 1.17. Risoluzione degli heteroduplexes dagli homoduplexes mediante un incremento della temperatura di analisi. Il campione mostrato è un frammento di 209 bp ottenuto dal locus *DYS271* che presenta una mutazione A→G nella posizione 168.

In condizioni non denaturanti (51°C) le quattro specie di ampliconi presentano lo stesso tempo di ritenzione, ma con il crescere della temperatura il picco generato dagli heteroduplexes inizia a presentarsi prima di quello generato dagli homoduplexes. Ciò avviene perché gli heteroduplexes iniziano a denaturarsi nelle regioni adiacenti al

mismatch e quindi presentano una porzione minore di dsDNA rispetto agli homoduplexes che a tale temperatura ancora non si denaturano. Il ssDNA, presentando una carica negativa minore rispetto al dsDNA, interagisce con un numero minore di particelle di TEAA e presenta quindi un tempo di ritenzione più breve rispetto a quello degli homoduplexes non ancora denaturati.

La scelta della temperatura ottimale di analisi di un amplicone può essere determinata o attraverso un approccio empirico o, se la sequenza del frammento è nota, attraverso un approccio *in silico*. La temperatura ottimale di analisi è compresa generalmente tra i 48°C ed i 68°C e dipende dalla composizione in basi del frammento da analizzare. Frammenti ricchi di basi AT richiedono temperature più basse di analisi (poco al di sopra dei 48°-50°C), al contrario frammenti ricchi di basi GC richiedono temperature più alte (intorno ai 68°C). Con l'approccio empirico si procede iniettando ripetutamente nel DHPLC lo stesso campione e aumentando gradualmente ogni volta la temperatura di analisi; alternativamente è stato sviluppato alla Stanford University un algoritmo di libero utilizzo (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) capace di analizzare la temperatura di denaturazione di un frammento sulla base della sua sequenza permettendo di calcolare il profilo delle temperature di melting (alla quale si ha il 50% di dissociazione del dsDNA) lungo tutto il frammento in analisi.

1.7.3 Principio di funzionamento della DHPLC in condizioni completamente denaturanti (70°C)

Il DHPLC può essere utilizzato anche in condizioni completamente denaturanti. A temperature elevate (70°C) è possibile effettuare una discriminazione tra due filamenti di ssDNA della stessa lunghezza che differiscono tra di loro per un singolo nucleotide (Oefner, 2000). Le limitazioni di questa applicazione sono legate alla massima lunghezza del frammento analizzabile che è di circa 100 paia basi e all'impossibilità di risolvere un cambio nucleotidico C→G. L'analisi può essere inoltre complicata dalla presenza di una seconda variazione presente nel frammento. Tutti questi problemi possono essere ovviati con il ricorso a tecniche come il mini-sequencing conosciuto anche come Primer Extension o Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE) che permettono di analizzare lo stato di un singolo nucleotide di

interesse (etero o omozigote) in modo rapido e specifico. Gli ampliconi da utilizzare nella reazione di Primer Extension vengono preparati eseguendo una PCR sul DNA della regione contenente il singolo nucleotide di interesse. Successivamente si procede effettuando una reazione di mini-sequencing con un oligonucleotide complementare alle basi del filamento antisenso o alle basi del filamento senso che precedono il nucleotide da analizzare. Il primer, in presenza degli appropriati ddNTP, viene esteso di una sola base complementare a quella presente nel sito polimorfico. I due alleli, analizzati in condizioni completamente denaturanti, presentano, a causa del diverso ddNTP incorporato, differenze nel tempo di ritenzione (Hoogendoorn *et al.*, 1999).

Se si analizzano degli oligonucleotidi isomerici che differiscono esclusivamente per il nucleotide presente all'estremità 3', è possibile prevedere l'ordine di eluizione in base al nucleotide incorporato. La timina ha il tempo di ritenzione più lungo a causa del suo gruppo metilico, la guanina, che presenta un gruppo amminico ed un gruppo carbonilico, viene eluita prima dell'adenina che presenta solo il gruppo amminico, mentre la citosina viene eluita per prima perché è la base meno idrofobica. Ricapitolando l'ordine atteso di eluizione è $C < G < A < T$ (Oefner, 2000).

La natura quantitativa del metodo permette di procedere alla quantificazione dei due diversi alleli e quindi di eseguire questa analisi in pool di DNA di controllo.

1.8 Alcune applicazioni della DHPLC

1.8.1 Identificazione di un mosaico che non viene individuato con sequenziamento diretto

Il sequenziamento diretto non offre un'alta specificità e sensibilità nella scoperta di mutazioni puntiformi se queste sono presenti sotto forma di mosaico. L'analisi mediante DHPLC dei geni TSC1 e TSC2 ha evidenziato la maggior affidabilità del DHPLC rispetto al sequenziamento diretto nella ricerca di mutazioni presenti in mosaico (Jones *et al.*, 2001). In alcuni casi infatti i profili alterati nascondono delle mutazioni presenti sotto forma di mosaico che non vengono rivelate dal sequenziamento diretto.

1.8.2 Analisi dei frammenti di DNA mediante DHPLC

Il DHPLC permette di separare, con elevata velocità, frammenti di dsDNA compresi tra 50 e 2000 bp circa. E' possibile effettuare anche una buona attribuzione della taglia tramite uno standard composto da frammenti di lunghezza nota. Le applicazioni più interessanti di questa metodica di separazione, sono la possibilità di quantificare il frammento di interesse e, attraverso il recupero della frazione che lo contiene, procedere con tutte le applicazioni successive come il sequenziamento o il clonaggio (Hecker *et al.*, 2000). L'efficienza del recupero può raggiungere il 90%. La migliore risoluzione dei frammenti marcati con fluorescenza si ottiene quando questi hanno dimensioni comprese tra le 100 e le 700 bp.

1.8.3 Analisi dei microsatelliti tetranucleotidi mediante DHPLC

Il DHPLC ha fornito risultati interessanti anche nell'analisi di microsatelliti tetranucleotidici come dimostrato ad esempio per il sistema *HUMTH01* che viene utilizzato molto in medicina forense (Devaney *et al.*, 2000). E' stato possibile assegnare una taglia ai frammenti del microsatellite incogniti mediante un'interpolazione con due frammenti di 147bp e 184bp che si localizzavano a monte e a valle del range allelico del marcatore (Fig. 1.18).

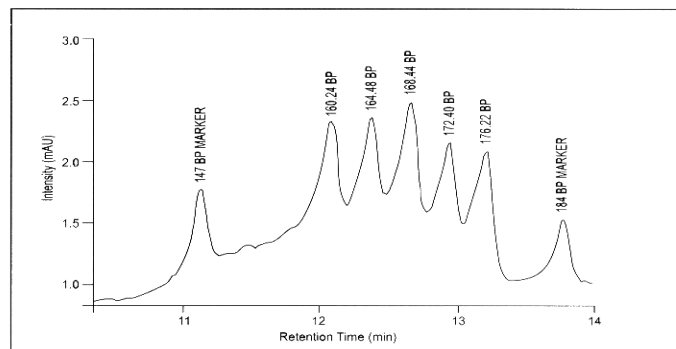


Figura 1.18. Attribuzione delle taglie alleliche del marcatore HUMTH01 (alleli 6, 7, 8, 9 e 10) effettuata utilizzando i due frammenti di riferimento di 147bp e 184bp.

1.8.4 Reazione di primer extension associata a DHPLC

La primer extension associata al DHPLC è stata proposta da Hoogendoorn e collaboratori (2000) come metodica economica, veloce ed accurata per stimare la frequenza allelica di uno SNP a partire da DNA proveniente da un pool di individui. La metodica richiede una quantificazione accurata della quantità di DNA genomico di partenza di ogni singolo campione utilizzato per effettuare il pool. Il metodo più idoneo allo scopo è quello di utilizzare il PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA) che, associato ad un lettore di fluorescenza come il Labsystem Fluoroskan Ascent (Lifesciences International, Basingstoke UK), permette una quantificazione estremamente precisa del DNA. I risultati ottenuti hanno dimostrato come questo metodo, che presenta un'elevata sensibilità e specificità, sia utilizzabile per compiere studi di associazione tra polimorfismi e malattie complesse.

1.9 Comparazione della DHPLC con le altre metodiche utilizzate per la ricerca di mutazioni

L'applicazione più utilizzata della DHPLC consiste nell'analisi di mutazione. Il primo gene analizzato con la DHPLC è stato il gene del canale del calcio *CACLNIA4* (Ophoff *et al.*, 1996). Attualmente i geni studiati con questa tecnica sono più di 150 e la lista viene continuamente aggiornata sul server ([Http://insertion.stanford.edu/pub.html](http://insertion.stanford.edu/pub.html)) della Stanford University. La prima pagina di questa lista è mostrata a titolo di esempio (Tabella 1.2.). I geni più studiati con l'utilizzo di questa metodica sono *BRCA1*, *BRCA2* coinvolti nel cancro della mammella e *ATM* (Xiao and Oefner, 2001). Questi geni sono molto grandi (da 5592 nt a 10257 nt), e privi di hot spots di mutazione, ciò rende la loro analisi molto laboriosa e dispendiosa.

<i>Gene</i>	<i>MIM#</i>	<i>Disease</i>	<i>Reference</i>
<i>IC7</i>	109170	Immune response	Ribas et al. [2001]
<i>ABCA4 (ABCR)</i>	601691	Macular degeneration	Rivera et al. [2000] Gerth et al. [2002] Rudolph et al. [2002]
<i>ABCB1</i>	171050	Parkinson's disease	Furuno et al. [2002]
<i>ABCG1</i>	603076	Bipolar affective disorder	Kirov et al. [2001]
<i>ABCG2 (BCRP)</i>	603756	Drug efflux transporter	Backstrom et al. [2003]
<i>ADRB2</i>	109690	Asthma, chronic obstructive pulmonary disease, congestive heart failure	Yoshida et al. [2002] Lynch et al. [2002]
<i>AGXT</i>	259900	Hyperoxaluria type 1	Pirulli et al. [2001]
<i>AHRR</i>	606517	Micropenis	Fujita et al. [2002]
<i>AIP1L1</i>	604392	Leber congenital amaurosis, retinitis pigmentosa	Hanein et al. [2002] Kaliq et al. [2003]
<i>AKT1</i>	164730	Type II diabetes	Matsubara et al. [2001]
<i>ALAD</i>	125270	Lead poisoning	Niu et al. [2001]
<i>ALAP</i>	145500	Essential hypertension	Yamamoto et al. [2002]
<i>ALG3</i>	601110	Congenital disorder of glycosylation	Schollen et al. [2002]
<i>ALG6</i>	604566	Congenital disorder of glycosylation	Schollen et al. [2002]
<i>ALS2</i>	205100	Amyotrophic lateral sclerosis 2	Hadano et al. [2001]
<i>APC</i>	175100	Adenomatous polyposis, desmoid tumor	Wu et al. [2001] Eccles et al. [2001] Al-Tassan et al. [2002] Gavert et al. [2002] Jones et al. [2002] Smith et al. [2002] Young et al. [2002] Emmerson et al. [2003] Heinritz et al. [2003]
<i>APCS</i>	104770	Type 2 diabetes mellitus	Wolford et al. [2003]
<i>APM1</i>	605441	Type 2 diabetes	Vasseur et al. [2002]
<i>APOD</i>	107740	Lipid metabolism	Desai et al. [2002]
<i>APOH</i>	138700	Regulation of β 2-glycoprotein I expression	Mehdi et al. [2003]
<i>AR</i>	313700	Micropenis	Ishii et al. [2001] Muroya et al. [2001]
<i>ARIX (PHOX2A)</i>	602753	Congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM2)	Nakano et al. [2001]
<i>ARX</i>	300382	X-linked mental retardation	Bienvenu et al. [2002]
<i>ASAH</i>	228000	Prostate cancer	Seelan et al. [2000]
<i>ATM</i>	208900	Ataxia-telangiectasia Hereditary breast and ovarian cancer Sporadic breast cancer	Thorntenson et al. [2000, 2001, 2003] Teraoka et al. [2001] Atencio et al. [2001] Iannuzzi et al. [2002] Offit et al. [2002] Bernstein et al. [2003] Pause et al. [2003]

Tabella 1.2. Prima pagina dell'elenco alfabetico dei geni studiati con la metodica DHPLC presente sul server della Stanford University ([Http://insertion.stanford.edu/pub.html](http://insertion.stanford.edu/pub.html))

Sebbene il sequenziamento diretto sia ritenuto la tecnica di riferimento per la ricerca di mutazioni, nei casi in cui è frequente il riscontro di mosaicismo, come ad esempio la sclerosi tuberosa e le mitocondriopatie, è stato dimostrato che il DHPLC ha una capacità superiore rispetto al sequenziamento diretto di identificare una mutazione (Jones *et al.*, 2001).

Il metodo per la ricerca di mutazioni più comunemente utilizzato è la Single-Strand Conformation Analysis (SSCA) o Polymorphism (SSCP). Ciò è dovuto in

particolare modo al basso costo di esecuzione. La sensibilità di questo metodo è compresa tra il 50-95% (Jones *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1999; Eng *et al.*, 2001) e migliora se viene accoppiata all'elettroforesi capillare (F-SSCP Fluorescent Single-Strand Conformation) (Dobson-Stone *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2000), ma la necessità di usare una marcatura fluorescente e di una procedura di purificazione prima di poter eseguire l'analisi, la rendono laboriosa e costosa. L'analisi degli eteroduplexes mediante la Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) su gel nativo, ha mostrato una sensibilità simile se non leggermente inferiore a quella della SSCA (Jones *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 1999; Eng *et al.*, 2001). La Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) presenta invece una sensibilità nettamente superiore alle metodiche SSCP e CSGE. Skopek e collaboratori (1999) hanno riportato una minore performance della DDGE rispetto alla DHPLC in una regione che presentava una elevata temperatura di melting. In conclusione l'analisi mediante DHPLC può essere considerato come uno dei metodi più sensibili per la ricerca di mutazioni. Tecniche più recenti quali i Microarray con Ibridazione del DNA Immobilizzato, sebbene promettenti, presentano tuttora problemi di falsi positivi e hanno ancora un costo per campione analizzato molto alto (Wang *et al.*, 1998; Hacia *et al.*, 1999).

Infine, un ulteriore vantaggio del metodo è legato alla minima necessità di manipolazione del campione. Inoltre nelle patologie che presentano mosaicismi somatici o eteroplasmia mitocondriale, il DHPLC ha mostrato una sensibilità superiore anche al sequenziamento diretto. Tuttavia in questi casi può essere necessario proseguire con il clonaggio per avere una conferma definitiva di presenza o assenza di mutazione.

1.10 La metodica MLPA

1.10.1 Determinazione del dosaggio genico

La determinazione del dosaggio genico ha molte implicazioni sia cliniche che di ricerca. La rilevazione di alterazioni del dosaggio genico può essere necessaria per scopi terapeutici, prognostici o diagnostici. Ad esempio, il gene *ERBB2* è soggetto ad

amplificazione del numero di copie in diverse tipologie di carcinoma del seno e dell'ovaio. Il riscontro di un numero elevato di copie è indice di prognosi sfavorevole (Harries and Smith, 2002). La determinazione del dosaggio genico ha avuto negli ultimi anni un notevole utilizzo nella diagnosi di malattie genetiche. La grandezza dei frammenti di DNA che possono essere deleti o duplicati e quindi generare la malattia, variano da singoli esoni (poche centinaia di nucleotidi) a intere regioni genomiche. Ci sono diverse malattie monogeniche in cui le delezioni o duplicazioni di parte o dell'intero gene sono responsabili della patologia. La presenza di delezioni/duplicazioni è già stata identificata in un'ampia serie di malattie come ad esempio la distrofia muscolare di Duchenne, l'atrofia muscolare spinale, la malattia di Charcot-Marie-Tooth etc. (Sellner and Taylor, 2004). Le piccole delezioni e inserzioni, nell'ordine di pochi nucleotidi, possono essere facilmente identificate mediante PCR e metodiche di analisi di mutazione come il sequenziamento mentre le grandi delezioni, nell'ordine della megabase, sono individuabili mediante tecniche citogenetiche come ad esempio l'analisi FISH. Le delezioni e duplicazioni di media taglia costituiscono un problema in quanto non vengono individuate né dalle metodiche basate su PCR né da quelle citogenetiche. A causa di questo problema tecnico, è possibile che per molti geni la proporzione delle delezioni e delle duplicazioni sia stato sottodiagnosticato nel passato, specialmente nei casi in cui la diagnosi clinica era chiara ma priva di un riscontro molecolare (Sellner and Taylor, 2004).

Recentemente è stata sviluppata una nuova metodica definita Multiple-ligation probe amplification (MLPA) che permette di dare una misura delle copie di un prodotto genico e di identificare delezioni o duplicazioni di media taglia (Schouten *et al.*, 2002).

1.10.2 La metodica MLPA

La metodica MLPA si basa su una quantificazione comparativa di sonde che si legano in maniera specifica al DNA genomico e che vengono amplificate mediante una reazione di PCR che utilizza primers universali.

L' MLPA è una metodica che permette di amplificare in multiplex fino a 45 sequenze nucleotidiche specifiche utilizzando una singola coppia di primers. I prodotti risultanti possono essere discriminati mediante elettroforesi. L'insieme dei 45 prodotti è

progettato in modo da far sì che la lunghezza di ciascun prodotto di amplificazione sia unica. La lunghezza di ogni prodotto differisce per 6-9 nucleotidi in lunghezza. La taglia di tutti i prodotti varia in un range compreso tra 120 e 480 nucleotidi permettendo la loro separazione su sequenziatori di DNA (Gille *et al.*, 2002; Hogervorst *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003).

Una reazione PCR multiplex classica, richiede la presenza di una coppia di primer per ciascun frammento che essere amplificato. Questi primers sono presenti in eccesso molare e causano diversi problemi. In particolare, poichè la differenza nell'efficienza di amplificazione propria di ogni singola coppia di primers varia, è molto difficile utilizzare la multiplex PCR per ottenere la quantificazione relativa di ciascuna sequenza bersaglio. La reazione MLPA permette di evitare questo problema utilizzando una singola coppia di primers per l'amplificazione di tutti i prodotti. L'amplificazione MLPA (fino a 45 prodotti diversi con una singola coppia di primers), è resa possibile dal fatto che non viene utilizzato il DNA genomico come stampo ma solamente le sonde che sono state aggiunte al campione. Queste sonde MLPA consistono di due differenti oligonucleotidi, ciascuno dei quali contiene la sequenza complementare di uno dei due primers universali utilizzati. Solamente quando entrambe le sonde che contengono le due sequenze complementari ai primers universali si vanno ad ibridare al DNA genomico bersaglio è possibile ligarle. Solamente le sonde ligate tra loro possono poi essere amplificate esponenzialmente mediante PCR. Il numero dei prodotti di ligazione delle sonde dipende dal numero di sequenze bersaglio presenti nel campione. Sebbene la reazione di amplificazione MLPA sia molto riproducibile, ci saranno sempre alcune sequenze la cui amplificazione sarà differente nell'ordine dell'1-2% in termini di efficienza di amplificazione che porteranno questi prodotti a differire, al termine della reazione, in termini di quantità di prodotto ottenuto. Per questo motivo il profilo ottenuto non è da solo sufficiente per capire se sia presente un cambio nel numero di copie e si rende necessario il confronto con un profilo ottenuto da un controllo. Questa comparazione permette di calcolare l'area relativa di ciascun prodotto di amplificazione che rifletterà quindi il numero relativo di copie della sequenza bersaglio presenti nel campione e riconosciute da quella specifica coppia di sonde. Una delezione di uno o più esoni mostrerà così un'area del picco relativa pari a circa la metà di quella del picco di controllo (Fig. 1.19) (Gille *et al.*, 2002; Hogervorst *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Sellner and Taylor, 2004).

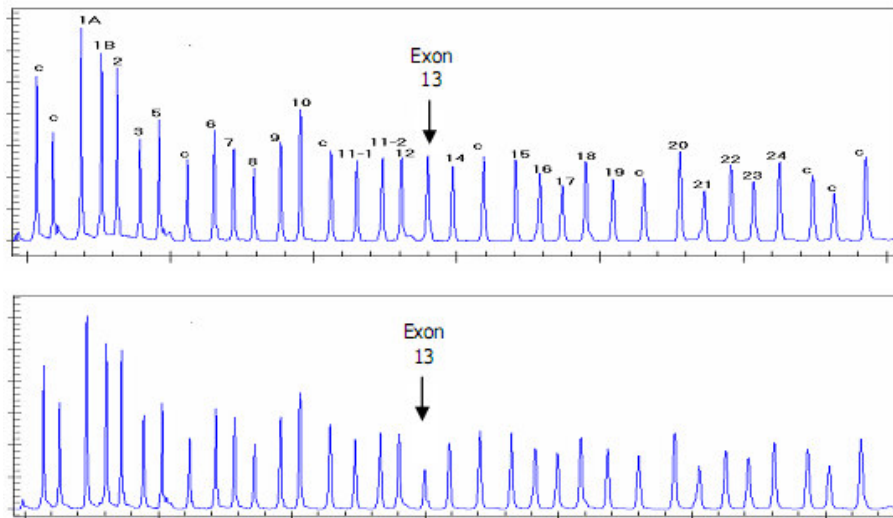


Figura 1.19. Esempio di analisi con MLPA del gene BRCA1 in cui possiamo vedere un controllo (sopra) e un paziente con una delezione dell'esone 13 (sotto).

Quindi, per ottenere la valutazione del numero di copie di 45 sequenze, dovrà essere utilizzata una miscela di 45 coppie di sonde, ciascuna coppia specifica per una di queste sequenze. Ciascuna coppia di sonde è costituita da due oligonucleotidi che si ibridano uno vicino all'altro e da una parte terminale di sequenza che viene riconosciuta dalla coppia di primers universali utilizzati nell'amplificazione. Dopo l'ibridazione con il bersaglio, le due sonde vengono ligate enzimaticamente ma solo quando entrambe sono ibridate a siti adiacenti. La reazione di ligazione è così specifica che permette di differenziare sequenze che differiscono anche di un solo nucleotide se questo è vicino al sito della ligazione. Il prodotto di ligazione risultante contiene entrambe le sequenze riconosciute dai primers universali e quindi può essere amplificato durante la reazione di PCR, contrariamente a quanto succede alla singola sonda che non essendo stata sottoposta a ligazione, non può essere amplificata perché contiene solo una sequenza complementare ad uno dei due primers universali (Gille *et al.*, 2002; Hogervorst *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Sellner and Taylor, 2004).

1.10.3 Vantaggi e svantaggi della metodica MLPA

La metodica MLPA presenta molti vantaggi ma anche alcuni svantaggi. I principali vantaggi sono i seguenti (Sellner and Taylor, 2004):

- E' metodica che può essere utilizzata per diverse applicazioni, in base al tipo di sonde che vengono utilizzate.
- E' una reazione in multiplex in cui si possono avere informazioni fino a 45 targets.
- E' una metodica relativamente economica e riproducibile.
- E' una metodica che richiede poco DNA di partenza (20ng).
- E' in grado di identificare sequenze anche di 60bp e quindi rivelare delezioni/duplicazioni anche di un singolo esone.

Gli svantaggi sono:

- E' più sensibile alla contaminazione rispetto ad una PCR classica.
- Non è in grado di identificare mutazioni puntiformi.
- Non può essere utilizzata per fare indagini su singola cellula.

In questo elaborato saranno esposti i risultati ottenuti dallo screening mediante Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) e sequenziamento diretto dei geni *LISI*, *DCX*, *FLNA* e *GPR56* in una coorte di pazienti con malformazioni della corteccia cerebrale quali la lissencefalia, l'eterotopia a banda sottocorticale, l'eterotopia periventricolare e la polimicrogiria bilaterale frontoparietale. Saranno inoltre presentati i risultati ottenuti dall'applicazione della DHPLC in due casi di mosaicismo somatico del gene *FLNA* utilizzando diversi approcci metodologici. Infine saranno presentati i risultati ottenuti dall'utilizzo della metodica Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) nella ricerca di delezioni/duplicazioni genomiche dei geni *LISI* e *DCX*.

MATERIALI E METODI

2.1 Analisi molecolare dei geni *LIS1*, *DCX*, *FLNA* e *GPR56*

2.1.1 Raccolta dei campioni

Il materiale biologico pervenuto al nostro laboratorio per compiere le indagini molecolari dei geni *LIS1*, *DCX*, *FLNA* e *GPR56* consisteva in campioni di DNA, campioni di sangue con EDTA come anticoagulante, bulbi di capello e, nei casi destinati all'allestimento delle linee cellulari, in campioni di sangue periferico in lio eparina.

Abbiamo raccolto, presso il Laboratorio di Neurogenetica dell'IRCCS Fondazione Stella Maris – U.O. di Neuropsichiatria Infantile, negli anni 2003, 2004, 2005, e presso il Laboratorio di Neurogenetica dell'AOU Meyer, negli anni 2006 e 2007, casi di lissencefalia, eteropia a banda sottocorticale, eteropia periventricolare e polimicrogiria bilaterale frontoparietale sia familiari che sporadici provenienti dal nostro istituto e da altri istituti italiani e internazionali.

2.1.2 Estrazione del DNA da sangue periferico

Il sangue venoso periferico è stato congelato a -20°C al momento dell'arrivo. Al momento dell'estrazione il sangue è stato fatto scongelare ed è stato messo in una provetta tipo Falcon da 50 mL. La lisi degli eritrociti è stata ottenuta mediante l'aggiunta del Lysis Buffer (0.32 M Saccarosio; 10mM Tris-HCl 7.5; 5mM MgCl₂; 1% Triton X-100). Dopo un'incubazione di 15 minuti a 4°C è stata eseguita una centrifugazione a 3000g a 4°C per 15 minuti. Il pellet così ottenuto è stato trasferito in una provetta Tipo Eppendorf da 2 mL e sottoposto ad un lavaggio con soluzione fisiologica. Dopo una centrifugazione a 3000g per un minuto, il sovrantante è stato

rimosso e al pellet sono stati aggiunti 750 µL di DNAzol (MRC Inc., USA) e 20 µL di Proteinasi K (20mg/mL). Il DNAzol è una soluzione a base di Guanidina Isotiocianato che permette l'idrolisi dell'RNA e una precipitazione selettiva del DNA. Il campione è stato sottoposto a mescolamento mediante Vortex e a successiva incubazione O/N (Over Night) a temperatura ambiente (RT). Il giorno successivo sono stati aggiunti altri 500 µL di DNAzol. La precipitazione del DNA è stata ottenuta mediante l'aggiunta di circa 500 µL di etanolo assoluto. Il DNA precipitato sotto forma di una nubecola è stato prelevato con un'ansa sterile da batteriologia ed è stato messo in una soluzione di lavaggio di etanolo al 70%. Dopo questo lavaggio il DNA è stato nuovamente prelevato mediante un'ansa e solubilizzato con l'aggiunta di una quantità appropriata di NaOH 8mM. A solubilizzazione avvenuta l'NaOH è stato neutralizzato con l'aggiunta di Tampone HEPES. Il DNA così ottenuto è stato stoccato a 4°C.

2.1.3 Quantificazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato quantificato mediante diluizione 1:300 e lettura spettrofotometrica a 260nm. Per valutare la qualità del DNA genomico ottenuto, è stato calcolato anche il rapporto tra la lettura a 260nm (Acido Nucleico) e quella a 280nm (Proteine) che per il DNA deve essere vicino al valore di 1,8.

2.1.4 Reazione di PCR del geni LIS1, DCX, FLNA e GPR56 nei pazienti con disturbi della migrazione neuronale

Le sequenze oligonucleotidiche (Direzione 5' verso 3') relative alle coppie di primer utilizzate per amplificare gli esoni dei geni *LIS1*, *DCX*, *FLNA* e *GPR56* sono riportate nelle tabella 2.1, 2.2, 2.3, 2.4.

Tabella 2.1. Elenco delle coppie di primer utilizzati per amplificare i 10 esoni codificanti del gene *LISI*

Ex.	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ex.
1	Non Tradotto	Non Tradotto	1
2F	TGTGGAAGACACTTAGTGGCATA	AAGAGACCTCCCAAAGCTGTA	2R
3F	TGAAAAGAGTATCTTCAG	AAAATTGTGCGTAACTGTT	3R
4F	TTGTCTTGAGGATCATAGTTAAG	TGCAGAAGAATGTTATTTTCAGA	4R
5F	CATAGTTGCAAAATAAAGGCAGT	ATCTCGGCTCACTGCAAACCT	5R
6F	CCAGACTGGCCTGCTGAGT	CATGGTATGCTCTTCCACCA	6R
7F	TGAAACCCCATGGTAAAATCC	GGCTGGTCTTCAATTCCTGA	7R
8F	CCATTCTCTTCATCCCAGTACA	CAGGGAATTAGCAAAGTTATCTAAGG	8R
9F	AGCCAGACTCCGTCTGAAAA	TTTTAAAGCCAGATAATTCAGATT	9R
10F	AATAGATGCTATTTAAACATTTTGCC	GTTTGTCTGGCACTCCAAAATC	10R
111F	GGTCTCACTATGTTTGTTGTCCA	GGTATCATCAGAGTGCATCCAG	11R

Ex= esone

Tabella 2.2. Elenco delle coppie di primer utilizzati per amplificare i 6 esoni codificanti del gene *DCX*

Ex.	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ex.
1F	TTTGTGAACAAATGGAACCG	GTGCTTTTCCCCTTTGACAT	1R
2F	GGAGGGGATGCACACATTAG	TCACAGTGAAAACAAAGGAACA	2R
3AF	TTTGTGAACAAATGGAACCG	ATGAAGGGGGAGTGTTCATCA	3AR
3BF	GGAGGGGATGCACACATTAG	TTGGCACTGTTCAGACAGAGGAGA	3BR
4F	CTTCACCCCATCCCTTTCT	TAACCAATGATGCCACCTCC	4R
5AF	GGAATTGCACCTAAGGTTGG	CCACTGCGGATGATGGTAAC	5AR
5BF	AAAACATCTGCCAATATGAAAGC	GGAAGAGTCCGTCAACAAGAA	5BR
6F	GGCCTAGATGGGAAGCTTTT	CACCATACAAACCCATGGAA	6R
7F	ATGGTTATTGCGGTTTCCAG	TGCATGCAGAAAGTATTGTCC	7R
8F	CCAAATCACTTGGTTGTCTGTG	TGGCCTTAATGTGCTGTTGA	8R
9F	CAAGGGTACCTCCCTGTACATT	AGCCCTGTTGGACACTTGAG	9R

Ex= esone

Tabella 2.3. Elenco delle coppie di primer utilizzati per amplificare i 47 esoni codificanti del gene *FLNA*

Ex.	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ex.
1	Non Tradotto	Non Tradotto	1
2AF	CCGCATTTAAAGGGCTCGCT	CACAACCAGCGGCCACT	2AR
2BF	GGCTTATCGCGCTGTTGGAG	CGTGCGTCCTTCCATCTCC	2BR
3F	GTGCTGCCAGACCCTGACC	GAGACTGGGCTGGGGTAC	3R
4F	GGCGCAGAGGCAGGAGAG	GTAGGGGACCGGATCGGC	4R
5F	GGATCGGCAGTTGGGAGAG	CCGTGTGCCAACGTCTTCC	5R
6F	AAGGGTGGAGGGGTGAGG	CTTTCAGTGGGGCTGCTCTT	6R
7F	CTTTCAGTGGGGCTGCTCTT	GACCTCAGGCAGTGGCTGG	7R
8F	AGGCTTGTGACCTCAGGCAG	CTGGTCTGTGGGGAGAGCC	8R
9F	CTGAGCAGGTGCCTCGTG	CCTGACTGCCCTCTGCTGT	9R
10F	CTCTGAGGGACCCACCAATC	GGATGGGTGGCGGCAGC	10R
11F	CCGGGTTCACTGCTGGGC	GCATCCCTCTCCAGCTCT	11R
12F	GTGGTGATCCTCGGTGTTCC	GACAGACGATGGCAAGGACG	12R
13F	GGGCACTGAGGGGACTGGT	CCTAAGTCTCGCCCTGCTGC	13R
14F	GGTGGGGATGGCACTCTGT	ACTGACCAGCAGGCCACC	14R
15F	TTCGGGTCCAAGTCCAGGTA	AACCTCCACCGGCCTTTAGT	15R
16F	TTGTGTGCCTGCCAGTGTAG	TCTCAGCCTCCGCTCCTC	16R
17F	GGTGTCCCTGCGAGGTCT	TCTGCCCTCCTCTAAGGCC	17R
18F	GCTCCTGGCCGCTAAGATG	GCATCAAGGGTAGGAGGGCT	18R
19F	GGGGCATCAAGGGTAGGA	TACAGTCACCGAGTCCCCAG	19R
20F	GGGAGCAATTCTGGTGTCTCTAA	GGATTGGCTGAGCTGGGTGT	20R
21F	GGATTGGCTGAGCTGGGTGT	CTTCTCCAGACCTGCCCTAAA	21R
22AF	TCTGGGATCGGGGCATAGTG	ACAACATCAACATCCTCTTCGCT	22AR
22BF	TGCTTGACAATGGGGATGG	ATCTGCTCGGAGGCGGG	22BR
23F	ACGGGGGACAGGGACCAG	GACTCCCACAGGCTGGCAG	23R
24F	CCTCCTGACCTGGCCTGC	GGAACCCAGGAATGACCG	24R
25F	GCTGGTGGGCCTGGGAAC	TCTGCTCGTCCCCACCCT	25R
26F	CGTCCCCACCCTGTCTCAT	GCAGTGTCTGTTTGAGGGC	26R
27F	GAATGGAGGCCAGGAGACTA	ACTGCTCACAACACCAATCCCT	27R
28F	GGCTGGATGCTGAGAACCTG	AGTGTGGGCTGCGGGTGG	28R
29F	TGCCTCCCCTGCCTCTGC	TGTGCCTGTGTGCAAGGGC	29R
30F	GCTTGGGTTGTGCCTGTGTG	AATGCCCTCCTGCCCAGA	30R
31F	AGGCGGACGGGAACAACC	TGACAACAGACTCTCCAGCAGC	31R
32F	CAACAGACTCTCCAGCAGCTC	TACCATGTGTGAGGAGGGACC	32R
33F	GTGAGGAGGGACCCAGAT	AGACTGTGCCAATGAGCTGC	33R
34F	GCCAGACTGTGCCAATGAGC	ACTCCACCGCCACCACCTC	34R
35F	CACACGAGGCTGCCATTCC	TCTTGACCTGCTCTGTGCC	35R
36F	GAGTGTCCCCAGCATAGTCC	ACAGAAACGGGTGGCAGGGT	36R

37F	TGGCTGGACGCACACTGAT	G TTCAGAAAGGAGGCAGCCT	37R
38F	CATGCCCTCCCTGACTGACA	G CATAGCACCGAGGCTCAGG	38R
39F	CCGAGGCTCAGGGGTATCC	A TGTGACTGGAGGGGCGTG	39R
40F	GCGTGGGCCGTGCTTTCT	T CAAGCAGCCCCAAGAGGAG	40R
41F	CCCAGGGCTGCTGCTCAC	A GTGCTCGCTCTCCTGCGT	41R
42F	AGCAGCCTTCAGTGAGGACA	G TATTGGACCCAGGGCTGG	42R
43F	GCTGATGAGCCGGTCTTACAC	G GACAGACCAGAGCCACCG	43R
44F	CAAGCACCCCATCTAACCAT	T GTAAGCAGCCAAGACGGG	44R
45F	CCCAGGCCACAGCATGA	G CTCTTGGTGACAACAGGAGG	45R
46F	AGTCTGGCTCTGCCTGACCT	C ACCACAGCCACCTCTTAGC	46R
47F	CCTCTTAGCCCCACCCACTC	C TCCCACCAAATGAGGCCA	47R
48F	GGCTGGGACCTGGGACTGA	C TACCCAAGCAGCCCCGC	48R

Ex= esone

Tabella 2.4. Elenco delle coppie di primer utilizzati per amplificare i 13 esoni codificanti del gene *GPR56*

Ex.	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	Ex.
1	ATGCCCACTGGCCTCCT	AGCCGAGCTGTAAGTGCCTA	1
2AF	AATCTCAGGCTCCAGGTTCA	TGTAATCTCCCAGCATGTCG	2AR
2BF	CCATCGAGAACTCCGAAGAG	CCCAGTCCACTTTGCATTTT	2BR
3F	GTGGTAGGGGGCAGAATGG	CAGTAGCCCCTACTCCAGGTC	3R
4F	CTGCCTCAGTCTCCCTGGT	GCTTCAGGGAGTGCTCACA	4R
5F	GGATCTAGGGGTCCGCATT	TGCCTTCTTCCACCTCTGT	5R
6F	GAGAGGGTAAGGGGCTTCTG	TCATTATAAAGACAAATGAGTCTGGAG	6R
7F	TCTGCCTGGCCTGTAAAGTT	GCCATCGCTCTCTCTCAA	7R
8F	TGACACAGTCGTGCTTTTGG	CCTTGGAGAGCTGTTATGAGG	8R
9F	ACCAGGGACCCCAGGTTAG	CCATGACCGGAGATGTGTG	9R
10AF	TGCAGCCACAGGAATAGGAT	AAGTGCAGGAAGATGGCACT	10AR
10BF	GACACGAGCTTCCTGCTCA	TAGGTGGAGAGGCAGAACCA	10BR
11F	GCTTCAGGAGCCCAAACCT	GCTGCACTCTGGCCTCTGT	11R
12F	ACAACCACAGCCCAGGAAAT	GCCCTTGCTCCATGTGTAGA	12R
13F	TGCTTGGCAAACACTATGGA	CATGGTCGTTGGGCTTTC	13R

Ex= esone

La DNA polimerasi utilizzata per l'amplificazione è la Taq GOLD DNA Polymerase (Applied Biosystem, Foster City CA), una polimerasi di tipo Hot-Start che permette di ottenere una forte riduzione nella formazione di ampliconi aspecifici e primer-dimer. La temperatura di annealing dei vari esoni è compresa tra i 56°C e i 68°C, con una richiesta media di MgCl₂ di 2mM. Il protocollo della reazione è riportato nella tabella 2.5.

Tabella 2.5. Reagenti utilizzati nella reazione di PCR

REAGENTE	CONCENTRAZIONE	VOLUME FINALE
Buffer GOLD	10X	2,5 ul
dNTPs	200 uM	0,25 ul
MgCl ₂	25mM	2 ul
Primer Forward	25pM/ul	0.5 ul
Primer Reverse	25pM/ul	0.5 ul
Taq GOLD	5U/ul	0,2 ul
H ₂ O		15.05 ul
DNA genomico		50 ng

Le reazioni sono state amplificate su termociclatore (GeneAmp 9700, Applied Biosystem, GeneAmp 2720, Applied Biosystem) con il seguente protocollo:

- Denaturazione / Attivazione Enzima: 95° C per 7'
95° C per 30"
- Annealing per 35 cicli: Ta (compresa tra 56°C 2 68° C) per 30"
72° C per 30"
- Estensione finale: 72° C per 10'
- Conservazione: 15° C

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati analizzati su gel di agarosio al 2% in TBE 0,5X. La taglia dei frammenti è stata verificata mediante comparazione con uno standard composto da frammenti di lunghezza nota (1Kb Plus, GIBCO).

Lo screening di mutazione è stata eseguita mediante DHPLC per il gene *FLNA* e sequenziamento diretto per i geni *LIS1*, *DCX* e *GPR56*.

2.1.5 Analisi su DHPLC dei prodotti di PCR

I prodotti di PCR provenienti dai soggetti di sesso maschile sono stati mescolati con un controllo sequenziato e risultato negativo per la presenza di polimorfismi di *FLNA*. Questo ha permesso di evidenziare mutazioni che non sarebbero state altrimenti visualizzabili data la natura emizigote del gene *FLNA* nei maschi.

I campioni sono stati denaturati e lentamente rinaturati su termociclatore con il seguente protocollo:

- 96° per 1'
- Tx per 10" (Tx, inizialmente pari a 96°C, subisce un decremento di 0,5°C fino al raggiungimento di 50°C)

Successivamente i campioni sono stati caricati su DHPLC e analizzati secondo i parametri impostati dal software Wavemaker (Transgenomic, La Jolla CA). La sequenza di ogni amplificato corrispondente ad ogni singolo esone (e rispettive regioni introniche fiancheggianti) è stata analizzata mediante il software WaveMaker per determinare la/e temperatura/e necessaria/e per l'analisi. Questo software, ha impostato automaticamente tutti i gradienti necessari per l'analisi (gradiente di carica e analisi, lavaggio della colonna ed equilibratura).

Le temperature di analisi utilizzate per ogni singolo amplificato sono mostrate nella tabella 2.6.

Tabella 2.6. Elenco delle temperature utilizzate per analizzare gli ampliconi del gene *FLNA*

	1° Temperatura	2° Temperatura	3° Temperatura
exon 2a	66,2	70	
exon 2b	64,9	67,5	
exon 3	63,6	66	
exon 4	65,4	65,9	
exon 5	63,7	64,7	
exon 6	65,3	66,3	
exon 7	64,2		
exon 8	63	64,2	
exon 9	65,8		
exon 10	64,8		
exon 11	63,3	65,3	
exon 12	63,9	65,5	
exon 13	63,5	65,5	
exon 14	64,9		
exon 15	64,3		
exon 16	64	65,2	
exon 17	63,9	65,3	
exon 18	65		
exon 19	62,7		
exon 20	61,8		
exon 21	61,1	64,7	
exon 22a	63,5	66,5	
exon 22b	63,7	65,4	
exon 23	64,2	66,2	
exon 24	63,9	66,4	
exon 25	64		
exon 26	62,9	64	
exon 27	63,8		
exon 28	62,6	66,2	
exon 29	63,4	68	
exon 30	63,9	67,6	
exon 31	63,7		
exon 32	64,8	65,8	
exon 33	63,3		
exon 34	64,9		
exon 35	62,7		
exon 36	63,6		
exon 37	64	65,7	
exon 38	62,9		
exon 39	63,8		
exon 40	62,8	65,2	
exon 41	61,5	63,5	64,6
exon 42	63,5		
exon 43	62,7	64,7	
exon 44	62,4	64,2	
exon 45	62,3	64,3	
exon 46	63,8		
exon 47	63,6	64,6	66,2
exon 48	64,1	66,5	

Con il modello di DHPLC presente nel nostro laboratorio (Wave 3500 Transgenomic, La Jolla CA), il tempo di analisi di ciascun amplificato è di 6 minuti per campione per ogni temperatura richiesta.

I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Wavemaker. Ogni campione con un cromatogramma differente da quello di un controllo negativo è stato sequenziato.

2.1.6 Purificazione dei prodotti di PCR pre-sequenziamento

I prodotti di PCR sono stati purificati dai dNTPs e dai primers che non hanno partecipato alla reazione mediante un kit su colonna (GenElute PCR Purification Kit, SIGMA) che ha permesso di rimuovere anche gli eventuali primer-dimers, grazie ad un cut-off di 100 bp. Questa procedura ha trattenuto tutti i prodotti specifici della reazione di PCR che erano più lunghi delle 100 paia di basi di cut-off della colonna.

Dopo una serie di lavaggi richiesta dal kit, il prodotto purificato è stato eluito in 30 μL di ddH₂O che ha garantito risultati più soddisfacenti del TE nelle reazioni di sequenziamento.

I prodotti di PCR purificati sono stati quantificati su mini-gel di agarosio, utilizzando uno standard a peso molecolare noto (Low Mass DNA Ladder, INVITROGEN). Caricando 4 μL di Standard e 4 μL di prodotto di PCR purificato è stato possibile risalire alla concentrazione in ng/ μL del campione.

2.1.7 Reazione di Sequenziamento dei prodotti di PCR purificati

Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite utilizzando il kit di sequenza BigDye V1.1 (Applied Biosystem, Foster City CA) basato sul metodo di Sanger e su un particolare tipo di fluorescenza denominato Energy-Transfer.

Le reazioni di sequenza sono state effettuate in un volume di 10 μL utilizzando una reazione 0,5X rispetto a quella consigliata (utilizzando una minor quantità di mix di sequenza è stato necessario compensare la reazione con un Sequencing Buffer 5X che ha permesso di ottenere la condizione ottimale di funzionamento per la DNA polimerasi

FS presente nella mix di sequenza). La quantità di PCR (frammenti di circa 300 basi) utilizzata per la reazione di sequenziamento è stata di circa 20-30 ng. I primer utilizzati nella reazione di sequenziamento sono stati diluiti alla concentrazione di 3.2 pM / µl. Il protocollo utilizzato nel nostro laboratorio è schematizzato nella tabella 2.7.

Tabella 2.7. Reagenti utilizzati nella reazione di sequenza

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	VOLUME FINALE
BigDye V1.1	2,5X	1 ul
Sequencing Buffer	5X	1.9 ul
Primer	3.2 pM/ul	1.6 ul
Prodotto di PCR		30 ng
ddH ₂ O		fino a 10ul

La miscela di reazione è stata caricata su termociclatore e sequenziata con questo programma:

- Denaturazione iniziale 94° C per 10''
- Cycle Sequencing (Ta 5'') 60° C per 4'
- Conservazione 10° C ∞

La temperatura di annealing (Ta) del sequenziamento varia in base al frammento da sequenziare, anche se in genere con la temperatura di 58°C sono stati ottenuti risultati soddisfacenti per tutti gli ampliconi di *LIS1*, *DCX*, *FLNA* e *GPR56*.

2.1.8 Precipitazione della reazione di sequenziamento

La reazione di sequenziamento è stata precipitata e purificata dai ddNTPs che, essendo fluorescenti, innalzano notevolmente la fluorescenza di fondo inficiando il

risultato dell'analisi. Il metodo che abbiamo utilizzato è basato su una precipitazione in etanolo / sodio acetato ed è descritto in breve di seguito:

- Si aggiungono 2 μL di Sodio Acetato 3M pH 4,7 e 50 μL di Etanolo 95% ai 10 μL della reazione di sequenziamento.
- Si centrifuga a 15700 g per 15' a 4°C
- Una volta eliminato il sovrnatante si aggiungono 150 μL di Etanolo al 70%
- Si centrifuga nuovamente a 15700g per 5' a 4°C, si elimina il sovrnatante e si asciuga il pellet non visibile per 3'

Per risospendere il pellet della reazione di sequenziamento abbiamo utilizzato la Megabace Loading Solution (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), una soluzione a base di formamide deionizzata, evitando così il passaggio della denaturazione pre-corsa e ottenendo una notevole soppressione del segnale di background.

2.1.9 Analisi su Sequenziatore Automatico

Le sequenze sono state caricate su sequenziatore ABI3100 Avant o ABI3130 (Applied Biosystem) ed analizzate con 4 o 16 capillari. Le sequenze sono state processate con il Sequencing Analysis Software (Applied Biosystem) e analizzate con il programma SeqScape (Applied Biosystem).

2.2 Analisi molecolare di pazienti mosaico per mutazioni di *FLNA*

2.2.1 Dati clinici di due pazienti studiati per mosaicismo della mutazione di *FLNA*

Il paziente 1 (1-II:2) è una donna di 28 anni di origine Caucasica che non presenta una storia familiare di disordini neurologici (Fig. 2.1.A). Nei primi anni di vita presentava uno sviluppo e funzioni cognitive nella norma. All'età di 14 anni sono insorte le prime crisi epilettiche generalizzate difficili da trattare farmacologicamente. Inizialmente è stata fatta una diagnosi di sclerosi tuberosa, ma la Risonanza Magnetica eseguita successivamente ha evidenziato una eteropia periventricolare caratterizzata da noduli eterotopici sottili e non contigui (Fig. 2.1.B). L'esame elettrocardiografico e lo studio della funzione piastrinica sono risultati nella norma. La paziente ha mantenuto le funzioni cognitive nella norma, ha completato l'educazione universitaria e ha avuto una figlia sana.

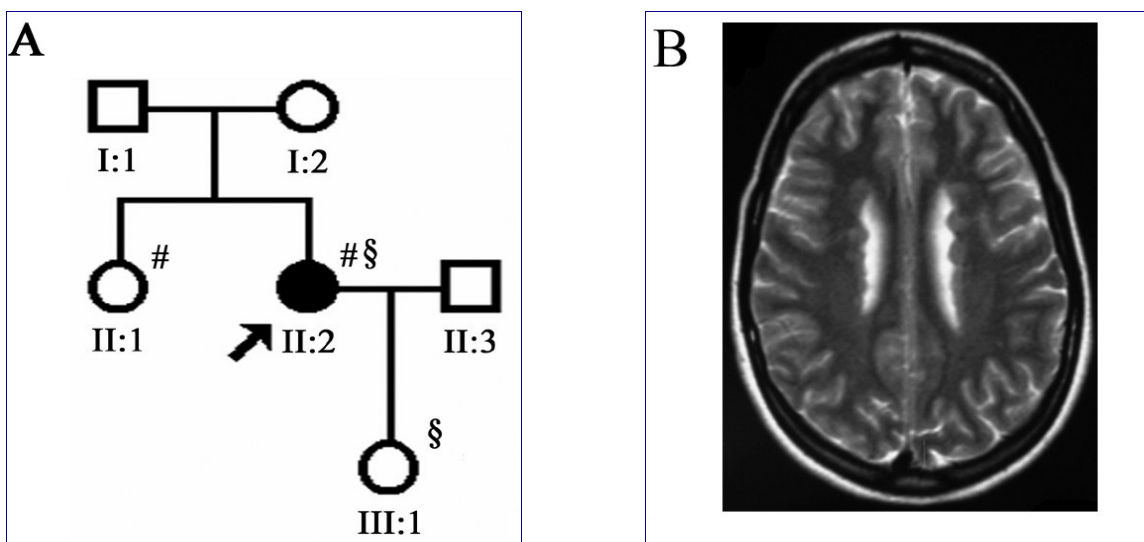


Figura 2.1. A) Albero genealogico della paziente 1. B) Sezione assiale della Risonanza Magnetica della paziente 1. I noduli eterotopici distribuiti lungo le pareti dei ventricoli sono sottili e non contigui.

Il paziente 2 (2-II:1) è un maschio di 49 anni, di origine svizzera che non presenta una storia clinica di malattie neurologiche (Fig. 2.2.A). Il suo sviluppo è stato normale. All'età di 15 anni ha manifestato crisi parziali e successivamente crisi generalizzate che sono poi diventate resistenti al trattamento con farmaci anti-epilettici. All'età di 26 anni ha subito un intervento per la sostituzione della valvola aortica. La risonanza magnetica ha mostrato una eterotopia periventricolare bilaterale classica con ipoplasia del cervelletto (Fig. 2.2.B). Il livello cognitivo è risultato borderline (FSIQ: 72; WAIS). Il paziente ha avuto due figli tra cui una bambina.

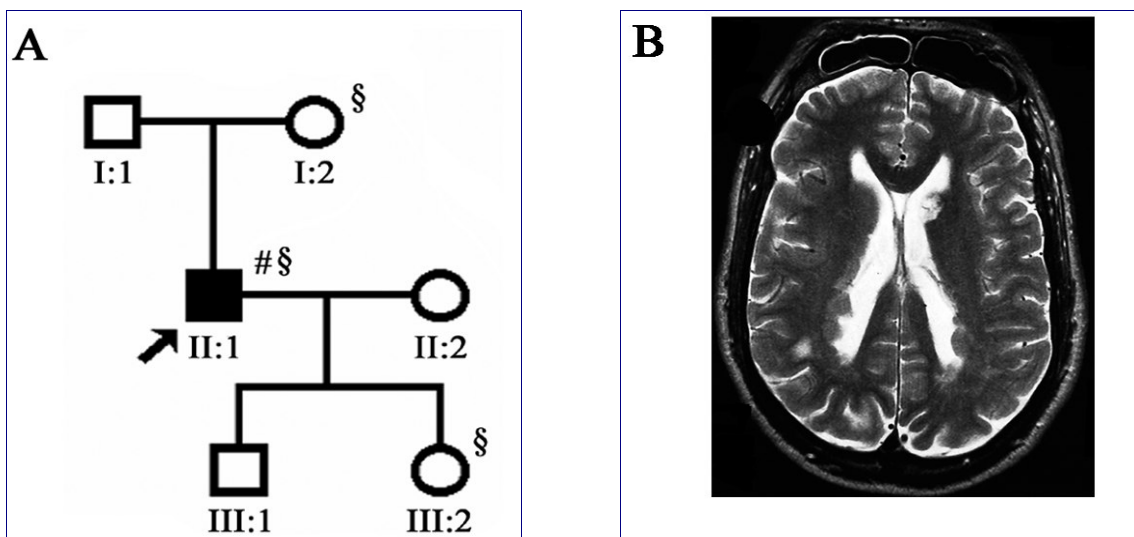


Figura 2.2. A) Albero genealogico del paziente 2. B) Sezione assiale della Risonanza Magnetica del paziente 2. I noduli eterotopici sono distribuiti lungo le pareti dei ventricoli.

2.2.2 Estrazione del DNA dai linfociti, bulbi di capello e singolo bulbo di capello

L'estrazione del DNA linfocitario dei due pazienti è stata eseguita come descritto precedentemente.

I bulbi del paziente 2 per l'estrazione del DNA sono stati separati dai capelli mediante un bisturi sterile. I bulbi così ottenuti sono stati sottoposti a lavaggio con

etanolo all'80% e ad incubazione O/N a RT con 150 µL di DNAzol e 20 µL di Proteinasi K (20 mg/ml). Il giorno dopo la miscela ottenuta è stata processata con un Kit su colonna per l'estrazione del DNA da sangue (JetQuick DNA Extraction Kit, GENOMED). Il passaggio iniziale necessario per effettuare la lisi dei globuli rossi è stato omesso e si è invece effettuato direttamente il passaggio che permette il legame del DNA alla silica-matrix della colonna. Dopo avere effettuato i due lavaggi richiesti dal protocollo, il DNA proveniente dal bulbo è stato eluito in 50 µL di H₂O.

L'estrazione del DNA da singolo bulbo è stata effettuata con la stessa procedura e, vista l'esigua presenza di cellule nucleate, il volume di eluizione finale è stata ridotto a 15 µL.

2.2.3 Reazione di PCR del gene *FLNA*

L'analisi di *FLNA* è stata effettuata mediante PCR e DHPLC come descritto precedentemente.

2.2.4 Analisi di segregazione di marcatori microsatelliti polimorfici del cromosoma X nel paziente 2

Abbiamo ipotizzato che la figlia del paziente 2 abbia ricevuto dal padre il cromosoma X facente parte della popolazione germinale che non portava la mutazione. Per verificare questa ipotesi abbiamo eseguito l'analisi di segregazione di 15 marcatori polimorfici distribuiti nella regione compresa tra Xq11.1 e Xq22.3. Sono stati utilizzati i seguenti marcatori altamente polimorfici:

DXS991	DXS1194	DXS1216	DXS983	DXS1220
DXS8079	DXS1002	DXS1217	DXS990	DXS8081
DXS8077	DXS1106	DXS1210	DXS1059	DXS1001

L'analisi di segregazione è stata effettuata sul paziente 2 e su sua figlia. L'amplificazione dei marcatori è stata ottenuta con una reazione di PCR effettuata secondo condizioni standard (temperatura di annealing 58°C) e con coppie di primer che presentavano il primer forward marcato con un fluoroforo FAM o HEX. I campioni sono stati denaturati in una miscela di formamide e di standard Genescan 400 HD (Applied Biosystems) marcato con il fluoroforo ROX. La taglia degli alleli è stata ricavata attraverso l'analisi su sequenziatore automatico ABI prism 310 (Applied Biosystems) mediante il software GENESCAN (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) che permette di confrontare i frammenti dei microsatelliti di taglia incognita con uno standard interno.

2.2.5 *Analisi del gene amelogenina nel paziente 2*

Per escludere la presenza di un assetto cromosomico di tipo 47XXY nel paziente 2, è stata eseguita una PCR specifica per il gene *Amelogenina* utilizzando un primer forward marcato con il fluoroforo FAM e un primer reverse senza marcatura. Il gene *amelogenina* presenta un'allele sul cromosoma X e uno sul cromosoma Y. La sua particolarità è quella di avere una delezione sull'allele presente sul cromosoma X, ciò lo ha reso particolarmente utile nell'attribuzione del sesso ad un DNA con evidenti riscontri in medicina legale e nella diagnosi prenatale. La coppia di primer da noi utilizzata generava due frammenti rispettivamente di 210 bp (corrispondente all'allele presente sulla X) e di 217 bp (corrispondente all'allele presente sulla Y).

La PCR è stata eseguita in condizioni standard ad una temperatura di annealing di 58°C. Il prodotto di PCR fluorescente è stato analizzato su sequenziatore automatico ABI prism 310 (Applied Biosystem) e la taglia dei picchi ottenuti è stata attribuita come descritto in precedenza.

2.2.6 Analisi di RT-PCR effettuata nel paziente 2

L'RNA totale del paziente 2 è stato isolato da linee cellulari linfoblastoidi utilizzando il Kit commerciale GenElute Mammalian total RNA kit (SIGMA, Missouri, USA). La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata su 1 µg di RNA utilizzando la ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison WI, USA) e primers esanucleotidici. 5 µL di una mix composta da 1 µg RNA, 20pmol di primer e acqua Nuclease-free viene tenuta a 70°C per 5 minuti e successivamente raffreddata in ghiaccio. Tale mix viene quindi aggiunta ai reagenti riportati nella tabella 2.8 ottenendo così un volume finale di reazione di 20ul.

Tabella 2.8. Reagenti utilizzati nella reazione di RT-PCR

REAGENTE	CONCENTRAZIONE	VOLUME FINALE
Nuclease-Free Water		Fino a 20 ul
ImProm-II 5X reaction Buffer	1X	4 ul
MgCl ₂	3 mM	2.4 ul
DNTP mix	0.5 mM	1 ul
Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor	1 U/ul	20 U
ImProm-II Reverse Transcriptase		1 ul

La reazione è stata effettuata su termociclatore (GeneAmp 9700, Applied Biosystem) con il seguente protocollo:

- Annealing: 25° C per 5'
- Estensione: 42° C per 60'
- Inattivazione della Reverse Transcriptase: 70° C per 15'

Sul cDNA così ottenuto è stata effettuata una reazione di PCR eseguita in condizioni standard, ad una Temperatura di annealing di 58°C ed utilizzando i seguenti primers:

FLN12RT/F: (5'-TCCCTGGAACCTATATCGTCA-3') (localizzato nell'esone 11 di *FLNA*)

FLN12RT/R: (5'-CCCTTGTCGTCACATTCGAT-3') (localizzato nell'esone 13 di *FLNA*)

Il prodotto di PCR è stato quindi sequenziato come descritto precedentemente.

2.2.7 Reazione di PCR per analisi del mosaicismo del gene *FLNA*

Le reazioni di PCR destinate alla caratterizzazione dei casi di mosaicismo sono state preparate diversamente da quelle utilizzate per la ricerca di mutazione. In questo caso è stato necessario adottare alcuni accorgimenti tecnici che hanno permesso di ridurre l'incorporazione di nucleotidi errati (mis-incorporazione) durante il processo di amplificazione. A tal fine è stata utilizzata la Optimase DNA Polymerase (Transgenomic) che è una DNA polimerasi Proof-Reading (con correzione di bozza). Il numero di cicli di reazione è stato abbassato da 35 a 30 ed è stata utilizzata una miscela pre-mix di dNTPs (Amersham Pharmacia) che ci ha assicurato una presenza equimolare dei diversi nucleotidi. Il protocollo utilizzato è stato il seguente:

- Denaturazione iniziale	94° C per 2'
- 30 cicli	94° C per 1' Ta per 1' 72° C per 1'
- Estensione finale	72° C per 10'
- Conservazione	15° C ∞

2.3 Studio del mosaicismo con analisi SNuPE – DHPLC

2.3.1 Purificazione enzimatica della reazione di PCR

La reazione di primer extension richiede la rimozione completa di tutti i primers presenti e di tutti i dNTPs che potrebbero interferire con la reazione. Per questo motivo si rende necessario un approccio di tipo enzimatico che prevede l'utilizzo di due enzimi: la fosfatasi alcalina di gamberetto (Shrimp Alkaline Phosphatase o SAP) e l'esonucleasi I (Exonuclease I o Exo I). Il primo enzima viene utilizzato al fine di idrolizzare i nucleotidi che non hanno partecipato alla reazione di PCR, trasformandoli in nucleosidi e liberando un fosfato; il secondo enzima idrolizza i primers rimasti in eccesso dalla reazione di PCR. 5 µL di prodotto di PCR da preparare per la reazione di primer extension sono stati trattati con 2 µL di ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia), un buffer che contiene i due enzimi descritti in precedenza. Il protocollo per la purificazione viene eseguito su termociclatore:

- 37° C per 15' Temperatura ottimale di azione dei due enzimi
- 80° C per 15' Temperatura necessaria per inattivare i due enzimi

Nella figura 2.3. è presentato uno schema di funzionamento del metodo.

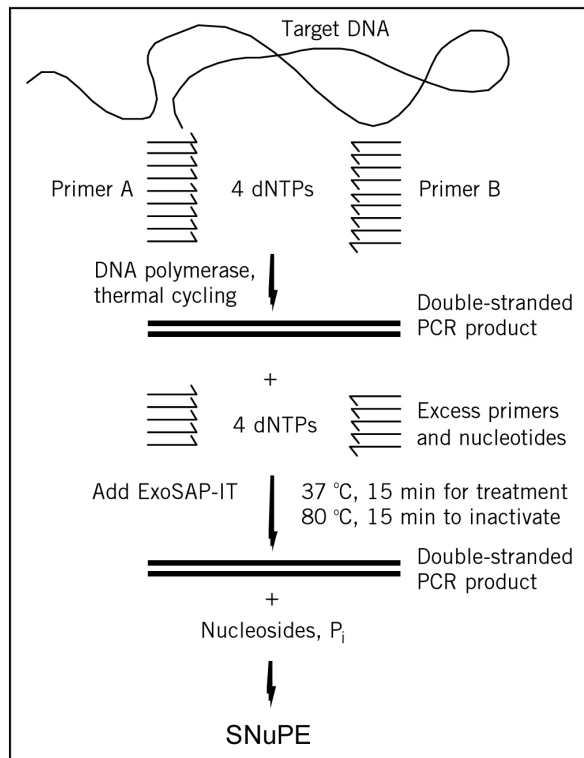


Figura 2.3. Schema di funzionamento della purificazione enzimatica del prodotto di PCR.

2.3.2 Reazioni di Single Nucleotide Primer Extension (SnuPE)

Il prodotto di PCR purificato mediante la digestione enzimatica, viene sottoposto ad analisi SNUPE utilizzando un primer lungo 20 basi disegnato in modo da riconoscere la sequenza a monte (Primer Forward) o a valle (Primer Reverse) del sito che deve essere saggiato quantitativamente per i due alleli presenti. Nella reazione vengono forniti solamente i due ddNTPs complementari ai due alleli da studiare. L'estensione del primer viene effettuata grazie alla Thermo Sequenase DNA polimerasi (Amersham Pharmacia) che aggiunge al primer un singolo dideossinucleotide (mini-sequencing) che termina la reazione di polimerizzazione. La reazione SNUPE è stata preparata in un volume di 15 μ L con il seguente protocollo (Tabella 2.9):

Tabella 2.10. Gradiente DHPLC utilizzato per la reazione SNUPE

Tempo in minuti	% Buffer A	% Buffer B	Flusso (ml/min)
0	87	13	0,9
0,1	82	18	0,9
10,1	62	38	0,9
10,2	0	100	0,9
10,7	0	100	0,9
10,8	87	13	0,9
12,8	87	13	0,9

2.3.4 Clonaggio dei prodotti di PCR ottenuti da DNA genomico derivato da sangue periferico del paziente 1

Nel paziente 1, gli elettroferogrammi delle sequenze forward e reverse dell'esone contenente l'inserzione nucleotidica mostravano una sequenza dell'allele mutato molto bassa in intensità di fluorescenza e quindi risultavano difficili da interpretare. Lo stesso prodotto di PCR utilizzato per le reazioni di sequenza è stato dosato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% confrontando la taglia con quella di uno standard di peso molecolare a concentrazione nota (Low mass, Invitrogen). La quantità di prodotto di PCR da utilizzare nella reazione di ligazione è stata calcolata seguendo le specifiche fornite dalla ditta fornitrice del vettore di clonaggio pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA).

$$\frac{50\text{ng di vettore X Taglia inserto}}{3.0\text{kb (Taglia vettore)}} \times 3 = \eta\text{g di inserto}$$

(3= Rapporto molare Inserto/Vettore)

La quantità di prodotto di PCR così calcolata è stata quindi sub-clonata nel vettore di clonaggio pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) effettuando la reazione di ligazione che utilizza i reagenti riportati in tabella 2.11.

Tabella 2.11 Reagenti per la reazione di ligazione

REAGENTE	REAZIONE STANDARD	CONTROLLO POS	CONTROLLO NEG
Prodotto di PCR	X ul*	-	-
2X Rapid Ligation Buffer	5 ul	5 ul	5 ul
pGEM-T Easy Vector (50ng)	1 ul	1 ul	1 ul
Insero di DNA controllo	-	2 ul	-
T4 DNA Ligasi (3Weiss units/ul)	1 ul	1 ul	1 ul
H ₂ O	Fino a 10 ul	Fino a 10 ul	Fino a 10 ul

(X=quantita' di prodotto di PCR precedentemente calcolato)

Successivamente 2 µL di prodotto di ligazione sono stati mescolati con 50 µL di cellule E. Coli DH5α competenti e tenute in ghiaccio per 20'. E' stato quindi effettuato uno shock termico immergendo le cellule a 42°C per 45" e un successivamente in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 950 µL di terreno LB (1 L contiene 10g di Bacto-trytone, 5g di Bacto-yeast extract e 5g di NaCl), la coltura batterica è stata fatta crescere a 37°C per 1,5 ore mantenendola ad una agitazione di 150 rpm. Le cellule transfettate sono fatte crescere su piastre contenenti LB e Ampicillina (100ug/mL). Al fine di definire con maggior accuratezza la mutazione e di quantificare l'allele mutato, sono state prelevate circa 150 colonie batteriche e sono state fatte crescere in 100 µL di terreno LB per 30 minuti a 37°C. Successivamente è stata effettuata una lisi di due microlitri di terreno di crescita batterica mediante riscaldamento a 98°C per 10 minuti (Colosimo *et al.*, 2003). Il prodotto di tale lisi è stato utilizzato per effettuare una reazione di PCR da 25 cicli utilizzando una mix di 10 µL contenete dei primers interni all'insero e disegnati per amplificare un frammento di 151bp (Primers delle sequenze SP6 e T7). I cloni ricombinanti per la presenza del frammento di 151bp sono stati

analizzati su un gel di agarosio al 2% e sono stati identificati 96 cloni che contenevano l'inserto sub-clonato. Poiché la mutazione osservata nel paziente 1 non introduceva né rimuoveva un sito di taglio per un enzima di restrizione, abbiamo screenato i 96 prodotti di PCR con analisi di SNuPE. Ciascun prodotto di PCR è stato purificato con ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e successivamente analizzato mediante SNuPE come descritto precedentemente. Due esempi di cloni contenenti gli alleli mutati e normali sono riportati nella figura 3.4 (A e B).

2.4 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con lissencefalia con gradiente P>A

Dal 2004 a oggi abbiamo studiato 45 con lissencefalia P>A in cui era stata esclusa la sindrome di Miller Diecker in quanto la FISH per la regione 17p13.3 era risultata negativa. La gravità del quadro neuroradiologico è stata classificata utilizzando il sistema di classificazione delle lissencefalie introdotto da Dobyns nel 1995 (Fig. 2.4) (Cardoso *et al.*, 2002):

- grado 1: agiria completa
- grado 2: agiria posteriore e rari solchi poco profondi al polo frontale
- grado 3: agiria posteriore e pachigiria anteriore
- grado 4-1: pachigiria generalizzata più grave in sede posteriore
- grado 4-2: pachigiria posteriore con circonvoluzioni normali in sede anteriore
- grado 5: Pachigiria e eterotopia a banda sottocorticale
- grado 6: Eterotopia a banda sottocorticale (Doppia corteccia)

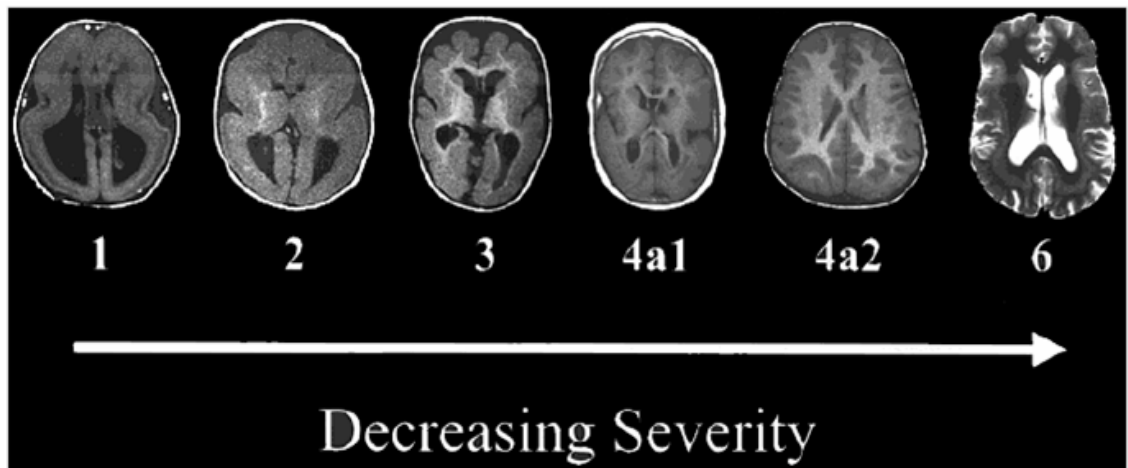


Figura 2.4. Gradiente di severità delle lissencefalia dalla forma più grave di agiria completa (Grado 1) alla forma meno grave di eterotopia a banda sottocorticale (Grado 6).

Per prima cosa abbiamo effettuato analisi di sequenziamento diretto del gene *LIS1* (vedi sezione 2.1.7) in tutti i pazienti e successivamente di MLPA nei pazienti che erano risultati negativi.

2.4.1 Analisi di FISH e analisi di mutazione

In tutti i pazienti è stata effettuata una analisi di FISH utilizzando sonde commerciali (Vysis e Oncor) in accordo ai protocolli standard forniti dalle ditte. L'analisi di mutazione è stata effettuata mediante sequenziamento diretto come descritto precedentemente nella sezione 2.1.7.

2.4.2 Analisi di MLPA

L'analisi di MLPA è stata effettuata utilizzando il kit di sonde per Lissencefalia (SALSA P61 Lissencephaly, MRC Holland, Amsterdam, Holland) che include 11 coppie di sonde specifiche per la regione *LIS1*, 8 coppie di sonde specifiche per la regione Miller-Dieker e 22 coppie di sonde specifiche per altri geni su regioni

cromosomiche diverse. Nove delle 11 coppie di sonde specifiche per *LIS1* avevano i siti di legame nelle regioni codificanti del gene mentre due (le sonde per l'esone 1 e l'introne 2) erano localizzate fuori dalle regioni codificanti. Sostituzioni nucleotidiche singole o piccole delezioni/inserzioni a livello dei siti di legame delle sonde o abbastanza vicine a questi siti tanto da alterare il legame delle sonde, possono diminuire il segnale dei picchi, dando risultati che possono essere falsi positivi. Al fine di escludere questa possibilità sono state esaminate accuratamente mediante sequenziamento diretto tutti i siti di legame di *LIS1* in tutti i pazienti che presentavano delezioni per sonde singole.

100ng di DNA genomico sono stati diluiti in 5ul di Tris-EDTA concentrato 10mM e denaturati a 95°C per 5 minuti, successivamente mescolati con il set di sonde (81.5ul) e il buffer (1.5ul) contenuto nel kit dell'MLPA e lasciati incubare a 60°C per 16 ore. Al termine di questa ibridazione delle sonde, 3ul di Ligase-65 buffer A è stato mescolato con 3ul di Ligase-75 buffer B e 25ul di H₂O ottenendo così un buffer di Ligasi. Contemporaneamente la PCR da 60°C è stata portata a 54°C. A questo punto ai prodotti di PCR sono stati aggiunti, direttamente nella macchina, 32ul del buffer di Ligasi. Successivamente, sempre nella macchina da PCR, è stata fatta la reazione di ligazione per 15 minuti a 54°C seguita dalla denaturazione della ligasi mediante una incubazione a 98°C per 5 minuti. Successivamente è stata preparata una mix costituita da 4ul di SALSA PCR buffer e 26ul di H₂O ed è stata aggiunta a 10ul di prodotto della ligazione. Successivamente ciascun tubo è stato centrifugato velocemente per raccogliere sul fondo la mix di ligazione. In ghiaccio, è stata preparata una mix di PCR contenente 2ul di SALSA PCR-primers, 2ul di SALSA Enzyme Dilution buffer 5 5.5ul di H₂O. I prodotti di ligazione (10ul) sono stati amplificati mediante PCR utilizzando questa mix e 0.5ul di SALSA polimerasi. Il primer forward era marcato con il fluorocromo 6-FAM.

Brevemente, i programmi utilizzati per le diverse fasi dell'analisi con MLPA sono i seguenti:

1) Reazione di ibridazione:

1. 98 °C 5 minuti
2. 25 °C infinito
3. 95 °C 1 minuto
4. 60 °C 16 ore

2) Reazione di ligazione

5. 54 °C infinito
6. 54 °C 15 minuti
7. 98 °C 5 minuti
8. 4 °C infinito

3) Reazione di PCR

9. 60 °C infinito
10. 35 cycles:
 - 95 °C 30 secondi
 - 60 °C 30 secondi
 - 72 °C 60 secondi
11. 72 °C 20 minutesi
12. 4 °C infinito

Successivamente 1-3ul di prodotto di PCR sono stati mescolati con 0.3ul di Standard di taglia 500 ROX (Applied Biosystems) e con 9ul di HiDi Formamide (Applied Biosystems).E' stata quindi effettuata una denaturazione per 2 minuti a 94°C e per 5 minuti a 4°C. La separazione dei picchi in base alla taglia è stata fatta con sequenziatore automatico ABI 3100 *Avant* (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) (Fig. 2.5).

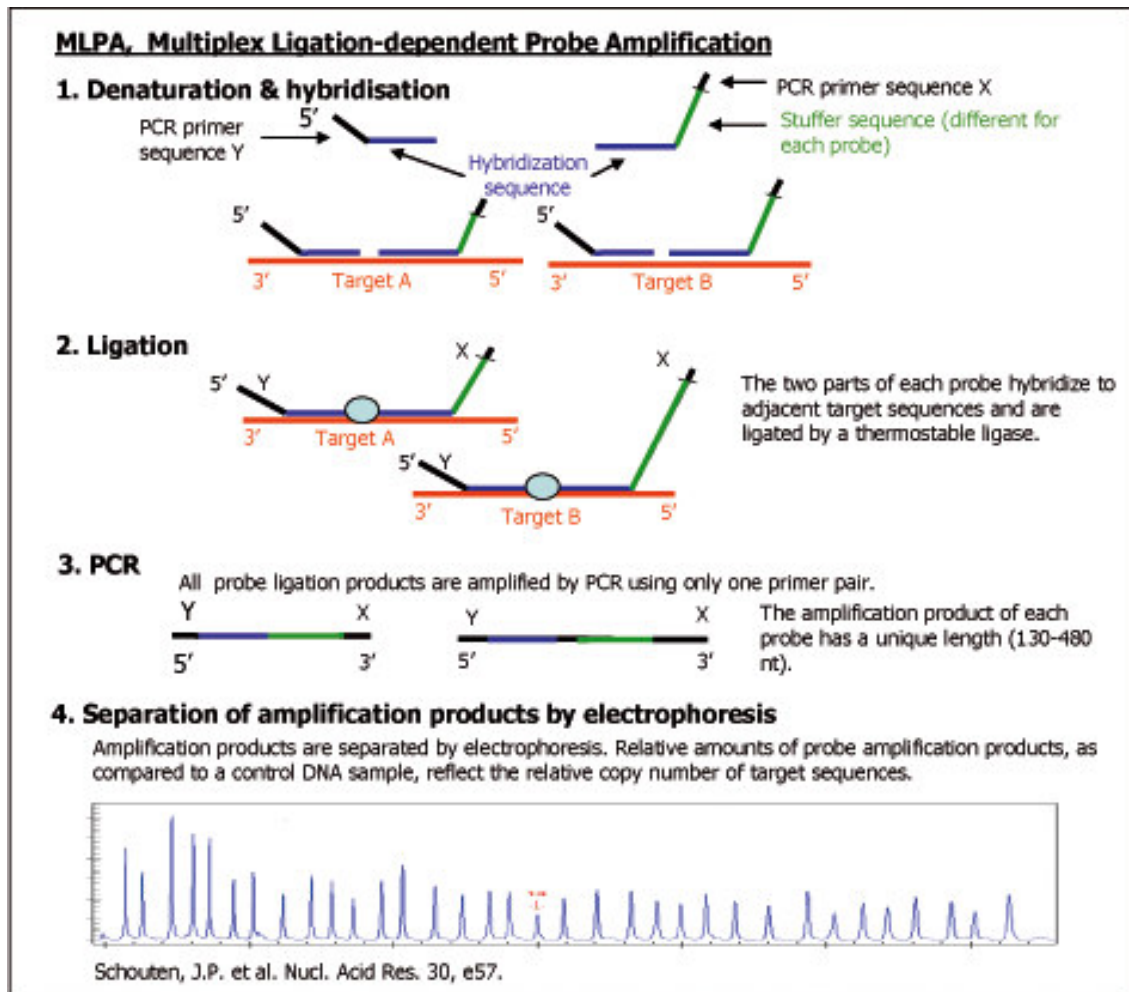


Figura 2.5. Rappresentazione schematica del protocollo di analisi mediante MLPA

2.4.3 Analisi MLPA di *LIS1* mediante foglio elettronico

Il primo passo da effettuare per l'analisi dei dati consiste nell'eliminazione dal processo di analisi dei prodotti non specifici di amplificazione, dei picchi corrispondenti a dimeri di primers e dei picchi generati dalla mix di controllo della MLPA. Il riconoscimento di questi prodotti anomali avviene sulla base della loro scarsa intensità e/o breve lunghezza.

Il secondo passo da effettuare è la normalizzazione delle aree dei picchi rimanenti. La normalizzazione (normalizzazione globale) è ottenuta mediante un

algoritmo che consiste nel dividere l'area di ciascun picco di amplificazione con la sommatoria delle aree di tutti i picchi dei prodotti di amplificazione, così che per ogni picco di amplificazione sia noto il suo rapporto verso il totale degli altri picchi. Un altro tipo di normalizzazione (normalizzazione a blocchi) consiste nel dividere l'area di un picco di un prodotto di amplificazione con l'area totale ottenuta dai soli picchi generati dai prodotti di amplificazione delle sonde controllo.

Il metodo della normalizzazione globale deve essere utilizzato con prudenza nelle mix di sonde che contengono poche sonde di controllo. Per questa tipologia di mix di sonde è molto più idoneo l'uso della normalizzazione a blocchi. Il secondo metodo è anche più adatto alla valutazione dei casi in cui si sospetta la delezione dell'intero gene. Se si sospetta una delezione o duplicazione parziale, è più idoneo l'utilizzo del primo metodo. In caso di dubbio è più sicura l'applicazione di entrambi i metodi di normalizzazione.

Dopo la normalizzazione deve essere effettuata la comparazione delle aree normalizzate del campione con quelle ottenute dalla media di quelle ottenute dai controlli. I campioni che mostrano dei dati non affidabili devono essere rimossi dall'analisi.

Infine viene effettuata la visualizzazione dei dati ottenuti mediante un grafico excel. Risultati che differiscono più del 20% devono essere considerati sospetti. La delezione di una copia del bersaglio di una coppia di sonde genera una riduzione nel segnale compresa tra il 35%-55%. La duplicazione da due a tre copie di un singolo bersaglio genera un incremento compreso tra il 30% e il 55%. La deviazione standard dell'area dei picchi dovrebbe essere sotto il 10% per tutte le sonde.

Per l'analisi dei dati di MLPA effettuata per il gene *LIS1* i picchi ottenuti dai diversi campioni, sono stati esportati e normalizzati secondo il metodo precedentemente descritto e utilizzando cinque controlli. Valori normalizzati compresi tra 0,8-1,2 sono stati considerati come normali. Valori <0.65 o >1.35 sono stati designati come delezioni o duplicazioni. Utilizzando questi criteri, abbiamo identificato 18 delezioni e una duplicazione. Ciascun risultato è stato confermato con una seconda reazione MLPA.

2.4.4 Caratterizzazione del punto di rottura

In 5 dei 19 pazienti analizzati (P3, P4, P11, P13 and P16) che presentavano alterazioni genomiche all' MLPA abbiamo caratterizzato i confini dei punti di rottura effettuando una Long Range PCR (LR-PCR) (TaKaRa LA Taq DNA polymerase, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) seguendo il protocollo della ditta:

-Denaturazione iniziale:	94°	1'		
-Denaturazione:	98°	10''		
-Annealing:	68°	30''	-0,5°C per ciclo	(14 cicli)
-Estensione:	68°	15'		
-Denaturazione:	68°	10''		
-Annealing:	60°	30''	26 cicli	
-Estensione:	68°	15'	+15'' ciclo	
-Estensione finale:	72°	10'		

Per due pazienti (P9 e P17) non avevamo a disposizione abbastanza DNA per effettuare una analisi di LR-PCR. Nei rimanenti 12 pazienti la dimensione della delezione era troppo grande per poter essere amplificata con LR-PCR. Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando primers localizzati nelle regioni fiancheggianti le regioni delete. I prodotti della LR-PCR dei pazienti e dei controlli sono stati corsi su gel di agarosio allo 0.8%. I prodotti di LR-PCR sono stati quindi analizzati mediante sequenziamento su sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) come descritto nella sezione 2.1.7.

2.4.5 Analisi bioinformatica

Il sito www.repeatmasker.org è stato utilizzato per effettuare un'analisi *in silico* della regione genomica in cui è compreso il gene *LIS1* e identificare in questa regione le sequenze ripetute intersperse e le sequenze a bassa complessità. E' stato in questo modo calcolato il numero degli elementi *Alu* e la loro percentuale nella regione genomica di *LIS1*. Il software BLAST2 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) è stato invece utilizzato per allineare le sequenze localizzate a livello dei punti di rottura. Infine la regione

genomica di *LIS1* e più in generale quella di 17p13.3 che comprende anche gli altri geni implicati nella MDS sono state analizzate anche con il UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

2.5 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con SBH diffusa o con gradiente A>P

Nella nostra coorte di pazienti con un fenotipo che poteva essere incluso nello spettro agiria-pachigiria-SBH abbiamo selezionato 23 pazienti (22 donne e un uomo), tutti sporadici, con SBH diffusa o con gradiente A>P. Questo pattern malformativo suggerisce una forma di SBH associata al cromosoma X e quindi al gene *DCX*. Per tale ragione una analisi di mutazione di *DCX* mediante sequenziamento diretto è stata effettuata in tutti questi pazienti (vedi sezione 2.1.7). Sono state trovate mutazioni nel 52% dei casi (12 su 23).

Al fine di validare la metodica MLPA applicata al gene *DCX* abbiamo effettuato tale analisi anche su un paziente di sesso maschile con lissencefalia X-linked ed una delezione nota di *DCX*.

Inoltre per validare i risultati dell'MLPA è stata effettuata una analisi di PCR fluorescente semi-quantitativa (SQF-PCR) e una analisi di Southern blot.

2.5.1 Analisi mediante MLPA

L'analisi di MLPA è stata effettuata utilizzando il kit di sonde per Lissencefalia (SALSA P61 Lissencephaly, MRC Holland, Amsterdam, Holland) che include 7 coppie di sonde specifiche per la regione di *DCX* e 33 coppie di sonde specifiche per altri geni su regioni cromosomiche diverse. Sostituzioni nucleotidiche singole o piccole delezioni/inserzioni a livello dei siti di legame delle sonde o abbastanza vicine a questi siti tanto da alterare il legame delle sonde, possono diminuire il segnale dei picchi, dando risultati che possono essere falsi positivi. Al fine di escludere questa possibilità

sono state esaminate accuratamente mediante sequenziamento diretto tutti i siti di legame di *DCX* in tutti i pazienti che presentavano delezioni per sonde singole.

100ng di DNA genomico sono stati diluiti in 5ul di Tris-EDTA concentrato 10mM e denaturati a 95°C per 5 minuti, successivamente mescolati con il set di sonde (81.5ul) e il buffer (1.5ul) contenuto nel kit dell'MLPA e lasciati incubare a 60°C per 16 ore. Al termine di questa ibridazione delle sonde, 3ul di Ligase-65 buffer A è stato mescolato con 3ul di Ligase-75 buffer B e 25ul di H₂O ottenendo così un buffer di Ligasi. Contemporaneamente la PCR da 60°C è stata portata a 54°C. A questo punto ai prodotti di PCR sono stati aggiunti, direttamente nella macchina, 32ul del buffer di Ligasi. Successivamente, sempre nella macchina da PCR, è stata effettuata la reazione di ligazione per 15 minuti a 54°C seguita dalla denaturazione della ligasi mediante una incubazione a 98°C per 5 minuti. E' stata quindi preparata una mix costituita da 4ul di SALSA PCR buffer e 26ul di H₂O e aggiunta a 10ul di prodotto della ligazione. Successivamente ciascun tubo è stato centrifugato velocemente per raccogliere sul fondo la mix di ligazione. In ghiaccio, è stata preparata una mix di PCR contenente 2ul di SALSA PCR-primers, 2ul di SALSA Enzyme Dilution buffer 5.5ul di H₂O. I prodotti di ligazione (10ul) sono stati amplificati mediante PCR utilizzando questa mix e 0.5ul di SALSA polimerasi. Il primer forward era marcato con il fluorocromo 6-FAM. I programmi per le varie fasi dell'analisi sono stati precedentemente descritti nella sezione 2.4.2.

Successivamente 1-3ul di prodotto di PCR sono stati mescolati con 0.3ul di Standard di taglia 500 ROX (Applied Biosystems) e con 9ul di HiDi Formamide (Applied Biosystems). E' stata quindi effettuata una denaturazione per 2 minuti a 94°C e per 5 minuti a 4°C. La separazione dei picchi in base alla taglia è stata fatta con sequenziatore automatico ABI 3100 *Avant* (Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

L'interpretazione dei risultati dell' MLPA è stata effettuata come descritto precedentemente nella sezione 2.4.3. Anche in questo caso è necessario eseguire una normalizzazione di dati in quanto delle variazioni nelle condizioni sperimentali possono contribuire a quantificare le differenze tra i valori misurati dei diversi campioni. Negli individui di sesso femminile, valori compresi tra 1.5 e 2.5 (0.75-1.25 nei maschi) indicano un risultato normale, mentre valori < di 1.5 o > di 2.5 (<0.75 o >1.25 nei maschi) indicano la presenza di una delezione o duplicazione.

2.5.2 Analisi multiplex PCR semi-quantitativa fluorescente PCR (SQF-PCR)

Per effettuare la reazione di SQF-PCR sono stati utilizzati amplimeri provenienti dall'esone 3, 4, 5 e 6 del gene *DCX* e amplimeri di controllo provenienti dall'esone 25 del gene *SCN1A* e dall'esone 8 del gene *LGII*. Tutti i primers forward erano marcati con il fluoroforo 6-FAM. I prodotti della SQF-PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su sequenziatore automatico e i dati risultanti sono stati interpretati mediante il software Genemapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I dati sono stati ulteriormente analizzati secondo il lavoro di Flintoff *et al.* (2001). Un valore di dosaggio (dosage quotient, DQ) vicino a 1.0 indicava che erano presenti due copie dell'esone, mentre un valore vicino a 0.5 indicava che era presente una sola copia dell'esone.

2.5.3 Analisi mediante Southern blot

Gli esoni 4, 6 e 7 del gene *DCX* sono stati amplificati con una PCR contenente i dNTPs normali e dei dCTPs ³²P in modo da ottenere tre sonde radiomarcate. Otto microgrammi di DNA genomico sono stati digeriti overnight con gli enzimi di restrizione (StuI e HindIII). I DNA genomici digeriti sono stati sottoposti a elettroforesi su un gel di agarosio all'1% e poi trasferiti su una membrana di nylon. Dopo l'ibridazione con le sonde radiomarcate, i filtri sono stati utilizzati per esporre delle pellicole X-Omat (Kodak). Le pellicole sono state poi sottoposte a densitometria e digitalizzate. L'analisi è stata effettuata con il software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

RISULTATI

3.1 Valutazione dello spettro clinico, neuroradiologico e molecolare di 182 pazienti con eterotopia periventricolare (PH)

3.1.1 Classi fenotipiche di PH

In base alla comparazione delle caratteristiche cliniche e neuroradiologiche dei 182 pazienti da noi studiati, abbiamo definito 15 sottoclassi fenotipiche di PH le cui caratteristiche anatomiche sono riassunte nella tabella 3.1.

Tabella 3.1 Classi fenotipiche di PH

Forma	Localizzazione	Malformazioni o sindromi associate	Fig. n°	Pazienti		Annalisi di FLNA	Mutazioni			Parenti con mutazioni (n°)		
				(n°)	♂		♀	(n°)	Sporadici (n°)		Familiari (n°)	
Nodulare	Diffusa bilaterale	Con displasia frontonasale	(3C-D)	7	6	1	6					
	Diffusa bilaterale con estensione ai corni temporali	PNH bilaterale “classica”	(1)	98	44	54	72	21 +1*	□	13	8	13+1*
		Con sindrome di Ehlers-Danlos	(1)	3	0	3	3	3*	□	2	1	0*
		Con micronoduli		2	2	0	2					
		Con genitali ambigui		1	0	1	1					
		Con anomalie degli arti	(4A-B)	6	3	3	3					
		Con microcefalia		2	1	1	2					
	Bilaterale temporo-occipitale con malformazioni dei trigoni e degli ippocampi	Con polimicorgiria		2	2	0	2					
		Con ipoplasia cerebellare	(2)	10	3	7	7					
		Con idrocefalo	(3B)	5	3	2	3					
Bilaterale anteriore, frontale	PMG fronto-perisilviana	(3A)	7	6	1	3						
Unilaterale diffusa		(1)	15	7	8	10	1	□	0	1	1	
Unilaterale/bilaterale con noduli isolati	Con sindrome X-fragile		2	2	0	0						
Laminare	Lineare diffusa		(4C)	3	2	1	3					
	Posteriore con aspetto ribbon-like		(4D-E)	2	1	1	0					
	Non classificata			17	10	7	3					
				182			120	25	□	15	10	15
											40	

98 pazienti su 182 (54%) presentavano PNH bilaterale classica. Dei rimanenti 84 pazienti (46%), 26 (31%) presentavano PNH associata ad altre malformazioni cerebrali, 19 (23%) presentavano PNH associata con anomalie che non coinvolgevano il sistema nervoso e 22 (26%) presentavano PNH unilaterale o PNH micronodulare o eterotopia laminare.

Nella maggior parte delle sottoclassi fenotipiche le caratteristiche morfologiche della PH erano abbastanza specifiche. i rimanenti 17 pazienti (20%) avevano caratteristiche fenotipiche che non rientravano in nessuna sottoclasse specifica.

3.1.2 PNH bilaterale classica

98 pazienti (54 femmine e 44 maschi; età variabile tra i 2 e i 64 anni; età media: 20 anni) presentavano noduli di sostanza grigia bilaterali e simmetrici lungo le pareti laterali dei ventricoli, principalmente nei corni frontali e nei corpi dei ventricoli con una estensione limitata nei corni occipitali e temporali (Fig. 3.1 A-B-C-D-E). Non erano mai presenti anomalie degli ippocampi.

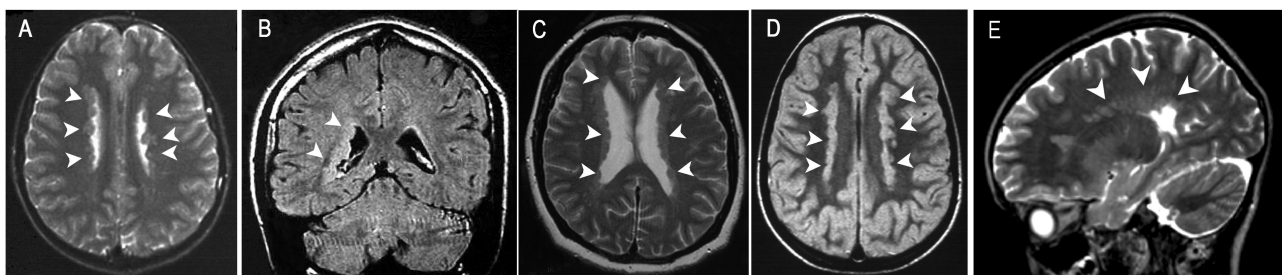


Figura 3.1. Immagini di risonanza magnetica di 5 femmine con mutazioni in *FLNA* che mostrano PNH estesa e contigua (B, C, D) o non contigua (A). La sezione sagittale mostra eterotopia estesa sotto i corpi dei corni temporali e delle formazioni ippocampali.

In 22 pazienti (8 probandi) (22.4%) la PNH era familiare con una trasmissione che suggeriva un modello di ereditarietà X-linked. La maggior parte dei pazienti di questa sottoclasse aveva un livello cognitivo normale o ritardo mentale lieve. 73 pazienti (72%) presentavano epilessia. L'età di insorgenza delle crisi variava dal periodo neonatale a 43 anni (età media: 12 anni). I pazienti presentavano diverse tipologie di epilessia anche se la forma più frequente era caratterizzata da crisi focali. Sette pazienti avevano encefalopatie epilettiche insorte precocemente con spasmi infantili e crisi toniche. Le crisi epilettiche erano controllate farmacologicamente nell' 82% dei casi con epilessia.

Mutazioni del gene *FLNA* sono state trovate in 35 (49%) dei 72 pazienti con PNH bilaterale classica analizzati. In particolare le mutazioni sono state trovate in 33/43 femmine (77%) e in 2/29 maschi (7%). Quasi tutti i pazienti con mutazioni di *FLNA* avevano ipoplasia del verme cerebellare lieve e molti avevano anche anomalie cardiovascolari. In particolare 20 pazienti avevano insufficienza della valvola aorta o trombocitopenia idiopatica. A parte le anomalie descritte sopra non abbiamo osservato significative differenze cliniche o anatomiche tra i pazienti con mutazione di *FLNA* e quelli senza mutazione.

3.1.2 PNH posteriore bilaterale con malformazioni dell'ippocampo e ipoplasia cerebellare

Dieci pazienti (7 femmine e tre maschi; età variabile dai 5 ai 50 anni, età media: 25 anni) presentavano PNH con noduli eterotopici ristretti ai trigoni e ai corni temporali e occipitali. L'eterotopia circondava anche gli ippocampi, i quali a loro volta erano malrotati (Fig. 3.2 A-B)

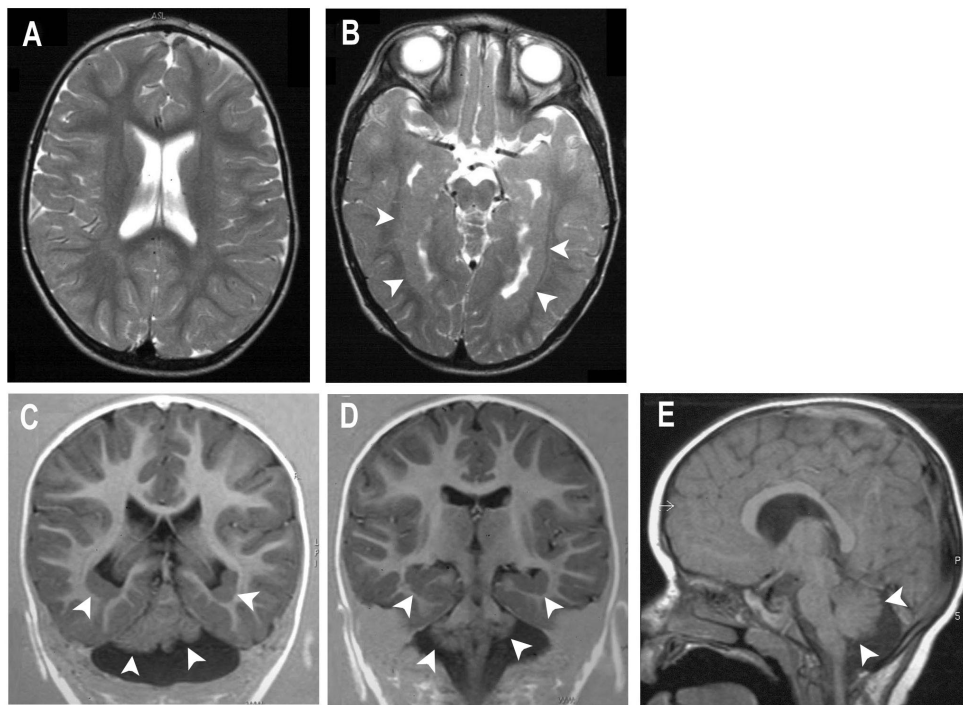


Figura 3.2. Immagini di risonanza magnetica di 2 pazienti con PNH bilaterale coinvolgente i corni temporali e i trigoni con malformazioni dell'ippocampo e ipoplasia cerebellare. Le figure A-D sono dello stesso paziente. Una sezione saggittale lungo i corpi dei ventricoli laterali (A) mostra che non è presente eterotopia subependimale a questo livello; una sezione saggittale più bassa, lungo i corni temporali (B), mostra eterotopia subependimale bilaterale contigua. Le sezioni coronali mostrano eterotopia che circonda i trigoni (C) ed emerge con formazioni dell'ippocampo (D) ipoplasia cerebellare. Una sezione saggittale in una bambina di 15 anni (E) mostra grave ipoplasia cerebellare che coinvolge entrambi gli emisferi e il verme (C,D).

Il numero di pazienti era troppo piccolo per poter stimare il rapporto maschi/femmine. Tutti i pazienti erano sporadici e avevano grave ipoplasia del verme cerebellare, mentre 8 avevano da moderata a grave ipoplasia degli emisferi cerebellari (Fig. 3.2 C-D-E). Due pazienti avevano agenesia del corpo calloso mentre in 4 il corpo calloso era solo più sottile. Tutti i pazienti presentavano sintomi cerebellari, sebbene la gravità di tali sintomi variasse da una sindrome cerebellare grave ad una lieve dismetria, nistagmo e disartria. Sette pazienti avevano epilessia focale. L'età di insorgenza delle crisi variava da 1 a 33 anni (età media: 13 anni). Cinque pazienti avevano l'epilessia

sotto controllo farmacologico. Il livello cognitivo di tutti i pazienti variava da lieve a grave. Nessuna mutazione di *FLNA* è stata identificata nei 7 pazienti studiati.

3.1.3 PNH bilaterale posteriore e polimicrogiria

Due maschi presentavano PNH con noduli non contigui lungo i corpi posteriori, i trigoni e i corni temporali e occipitali associata con polimicrogiria (PMG) nei lobi temporali, parietali e occipitali. Un gruppo di 20 pazienti con lo stesso quadro neuroradiologico era stato descritto nel 2005 da Wieck e collaboratori. Tutti i pazienti, compresi i nostri, avevano ritardo dello sviluppo e ritardo mentale, la maggior parte inoltre aveva epilessia di gravità variabile. Tutti I pazienti erano sporadici.

3.1.4 PNH bilaterale frontale-perisilviana e polimicrogiria

Sette pazienti (6 maschi e 1 femmina) presentavano piccoli noduli eterotopici prevalentemente non contigui lungo i corni frontali, i corpi dei ventricoli laterali e i trigoni; tali noduli erano accompagnati da polimicrogiria frontale e perisilviana (Fig 3.3 A).

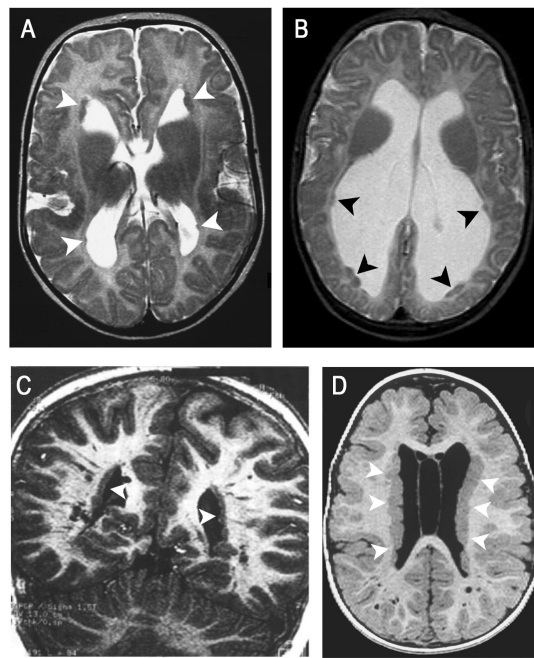


Figura 3.3. Immagini di risonanza magnetica di 4 bambini con diverse forme di PNH. A: sezione assiale di PNH bilaterale e PMG fronto perisilviana in un bambino di 4 anni. Sono visibili piccoli noduli subependimali nei corni frontali e occipitali. B: sezione assiale di un bambino di 6 anni con PNH e idrocefalo. E' presente un grave allargamento di entrambi i ventricoli laterali e soprattutto dei corni occipitali dove sono presenti piccoli clusters di noduli subependimali. C,D: sezioni coronali e assiali in due bambini di 7 anni con PNH bilaterale e displasia frontonalsale. Entrambi i bambini presentano noduli subependimali contigui e anomalie strutturali nella sostanza bianca.

Tutti i pazienti erano sporadici e presentavano grave ritardo dello sviluppo ed epilessia con insorgenza precoce. Non è stata trovata nessuna mutazioni nei 4 pazienti analizzati. Quattro dei pazienti inclusi in questo sottogruppo erano stati precedentemente descritti nel lavoro di Wieck *et al.* del 2005. Considerando il totale dei nostri pazienti con quelli descritti da Wieck *et al.*, 2005 il rapporto maschi/femmine era di 9/2. Questo dato indicava che era presente un significativo sbilanciamento del rapporto maschi/femmine a favore dei maschi (χ^2 test: $p=0.034$).

3.1.5 PNH bilaterale posteriore associata a idrocefalo

Cinque pazienti (3 maschi e 2 femmine; età variabile dai 3 ai 35 anni; età media: 11 anni) presentavano piccoli noduli non contigui o piccoli raggruppamenti di noduli nei corni occipitali e posteriori e nei trigoni associati con idrocefalo (Fig. 3.3B). Due casi con fenotipo simile descritti da Sheen nel 2004 (Sheen *et al.*, 2004b; Famiglia 2-III.1 and Famiglia 3-II.3) appartenevano a famiglie in cui altri individui avevano PNH ma non avevano idrocefalo. Uno dei 5 pazienti da noi studiati presentava una malformazione Chiari di tipo I con siringomielia. Gli altri 4 pazienti avevano grave ritardo dello sviluppo. Tre di questi avevano epilessia e due quadriparesi spastica. L'analisi di mutazione di *FLNA* è risultata negativa nei 3 pazienti studiati.

3.1.6 PNH bilaterale associata a microcefalia

Due bambini, un maschio e una femmina, presentavano PNH bilaterale diffusa fino ai corni temporali, associata a microcefalia con circonferenza cranica di -2 deviazioni standard. Questi due pazienti provenivano da una famiglia di origine turca in cui era presente consanguineità ed entrambi avevano ritardo dello sviluppo grave, quadriparesi spastica e spasmi infantili intrattabili insorti precocemente. Il maschio era morto a 13 anni per pneumonia.

3.1.7 PNH bilaterale con displasia fronto-nasale

Sette pazienti (6 maschi e una femmina; età variabile dai 5 ai 22 anni, età media: 11 anni) presentavano noduli eterotopici bilaterali e diffusi lungo le pareti laterali dei ventricoli. La risonanza magnetica mostrava inoltre aree con cisti multiple nella sostanza bianca (Fig. 3.3.C-D). Tutti i pazienti presentavano tratti dismorfici quali ipertelorismo, radice del naso ampia, punta del naso poco formata, picco della vedova e ritardo mentale lieve; tre pazienti avevano epilessia focale. Due maschi di questo gruppo erano

stati precedentemente descritti da Guerrini e Dobyns nel 1998. Tutti i pazienti erano sporadici e nessuno presentava mutazioni in *FLNA*.

3.1.8 PNH bilaterale associata a anomalie degli arti

Sei pazienti (3 maschi e 3 femmine) presentavano PNH bilaterale diffusa che si estendeva fino ai corni temporali (Fig. 3.4. A).

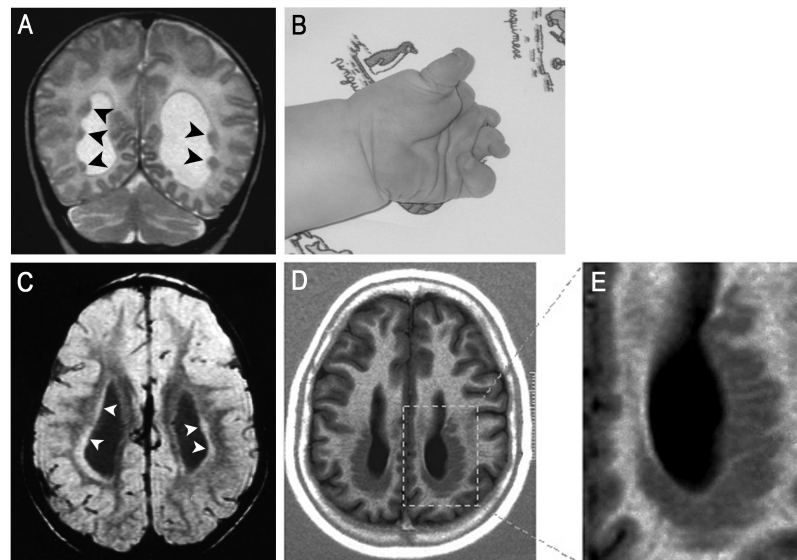


Figure 3.4. A, B: PNH e riduzione degli arti in una bambina di 2 anni. C: sezione assiale di una bambina di 15 anni con PH lineare diffusa intorno ai ventricoli laterali. E' presente un ispessimento della corteccia e pattern di girazione semplificato soprattutto nei lobi frontali.. D, E: PH con aspetto ribbon-like in una donna di 25 anni. D: sezione assiale che mostra la sostanza grigia eterotopica che circonda la parte posteriore dei ventricoli laterali.

Tutti i pazienti presentavano anomalie degli arti di due diverse tipologie. Quattro pazienti (1 maschio e 3 femmine) avevano riduzione degli arti con falangi dei piedi o delle mani assenti o ipoplastiche (Fig. 3.4B). Questi 4 pazienti avevano ritardo mentale

lieve e uno aveva epilessia. L'analisi di mutazione di *FLNA* effettuata in 2 pazienti è risultata negativa. Due maschi presentavano invece PNH bilaterale, ritardo mentale e sindattilia. L'analisi di mutazione in entrambi è risultata negativa. Precedentemente era stato descritto un maschio con fenotipo identico ai nostri due pazienti che presentava una delezione di Xq28 che conteneva anche *FLNA* (Dobyns *et al.*, 1997; Fink *et al.*, 1997). Saranno necessari ulteriori studi a livello di citogenetica molecolare (array-CGH) per identificare eventuali delezioni o duplicazioni in Xq28 nei nostri due pazienti.

3.1.9 PNH bilaterale associata a sindrome di Ehlers-Danlos

Tre donne presentavano PNH bilaterale classica associata a sindrome di Ehlers-Danlos (Fig. 3.1.C-D). Due di loro avevano epilessia e un livello cognitivo borderline. Una paziente verrà descritta successivamente come caso familiare (Famiglia 5). L'analisi di mutazione di *FLNA* ha evidenziato una delezione di una base in due pazienti e una mutazione missenso in una (Tabella 3.2).

3.1.10 PNH bilaterale associata a sindrome X-fragile

Due maschi con sindrome da X fragile (di anni 13 e 14) presentavano anche PNH alla risonanza magnetica. Uno dei due aveva piccoli noduli subependimali bilaterali e ippocampi malrotati. Il secondo paziente presentava un singolo e grande nodulo eterotopico nel ventricolo laterale destro. Nessuno dei due pazienti aveva epilessia. L'analisi di Southern Blot ha identificato in entrambi i pazienti una espansione di una ripetizione del trinucleotide CGG al 5' del gene *Fragile site mental retardation 1 (FMR1)*.

3.1.11 Altre forme sindromiche di PNH bilaterale

Sono state descritte e ben caratterizzate due sindromi di PNH bilaterale osservate però in pochi pazienti. Due maschi presentavano eterotopia periventricolare bilate-

rale micronodulare caratterizzata da noduli dispersi, ciascuno spesso meno di pochi millimetri. Questi noduli alteravano in misura minima il profilo dei ventricoli e potevano essere osservati soltanto con una risonanza magnetica ad alta risoluzione. Tale risonanza era stata effettuata in entrambi i pazienti non appena si erano presentate le crisi e il ritardo mentale. Un paziente presentava PNH bilaterale e genitali ambigui. Questo individuo alla nascita presentava pseudoermafroditismo, caratterizzato da testicoli intra addominali, ipospadia, tube uterine e vagina. In seguito a orchietomia e terapia con ormoni femminili la paziente è stata cresciuta come donna. La paziente aveva un livello cognitivo normale. Il cariotipo standard mostrava un assetto cromosomico 46XY. In seguito all'insorgenza di crisi epilettiche è stata eseguita una risonanza magnetica che ha evidenziato PNH bilaterale. L'analisi di mutazione di *FLNA* effettuata su tutti e tre i pazienti è risultata negativa.

3.1.12 PNH unilaterale diffusa estesa ai corni temporali

15 pazienti (7 maschi e 8 femmine; età variabile dai 3 ai 36 anni, età media 17 anni) presentavano PNH unilaterale con caratteristiche simili a quelle della PNH bilaterale classica solo che localizzate da un unico lato (Fig. 3.1 B). Tredici pazienti erano sporadici e non avevano mutazioni di *FLNA*. In una famiglia padre e figlia avevano PNH unilaterale e mutazione di *FLNA* (S149P). La mutazione era presente anche nella nonna paterna che però non ha mai fatto una risonanza magnetica. Otto dei 15 pazienti avevano epilessia focale. L'età di insorgenza delle crisi variava da 1 a 38 anni (età media: 16 anni). Sette pazienti avevano livello cognitivo normale e 8 ritardo mentale lieve.

3.1.13 PH lineare diffusa

Tre bambini, due maschi e una femmina, avevano PH caratterizzata da uno strato sottile di sostanza grigia subependimale invece di noduli contigui o separati (Fig. 3.4.C). Il pattern di girazione corticale era lievemente semplificato con aree di ispessimento della corteccia che faceva ipotizzare la presenza di una malformazione estesa del-

la migrazione neuronale. L'analisi di mutazione effettuata in tutti e tre i bambini è risultata negativa.

3.1.13 PH con aspetto “ribbon-like”

Due pazienti, un maschio e una femmina non imparentati tra loro, presentavano PH con aspetto “ribbon-like” che circondava i corpi posteriori e i corni temporali dei ventricoli laterali. I cordoni eterotopici apparivano circonvolti con una regolarità di tipo sinusoidale che ricordava un pattern di girazione corticale semplificato (Fig. 3.4 D-E). Entrambi i pazienti presentavano epilessia dall'infanzia e livello cognitivo nella norma.

3.2 Analisi di mutazione del gene *FLNA*

Nei 121 pazienti in cui abbiamo effettuato l'analisi di mutazione di *FLNA* abbiamo identificato 25 mutazioni in 40 pazienti. Di queste mutazioni 16 non erano mai state descritte precedentemente. In particolare, le 16 nuove mutazioni erano così suddivise: 4 in siti di splicing, 5 mutazioni nonsense, 5 delezioni e 2 inserzioni (Tabella 3.2 e Fig. 3.5).

Tabella 3.2. Nuove mutazioni di *FLNA* identificate in questo studio

Mutazione	Paziente	Sesso	Età	Cambio nucleotidico	Esone	Proteina	Localizzazione nella Epilessia, età di		Livello cognitivo
							proteina	insorgenza	
Spicing	1	F	8,44	IVS5 +2 T>A	4		repeat 1 - rod 1	Si; 6	Normale
	2a	F	20	c.5327 C>T	31		repeat 15 - rod 1	No	Normale
	2b	F	24	c.5327 C>T	31		repeat 15 - rod 1	No	Normale
	3	F	16,6	IVS44 -2 A>G	45		repeat 22 - rod 2	Si; 14,5	Normale
	4	F	48	IVS47 +8 A>G	47		repeat 24	Si; 19	Normale
Troncanti	5	F	4,4	c.676 C>T	4	R226X	CHD2	Si; 2	-
	6a	F	15,4	c.2002 C>T	13	Q668X	repeat 4 - rod 1	-	-
	6b	F	u	c.2002 C>T	13	Q668X	repeat 4 - rod 1	-	-
	7a	F	32	c.[4437 A>G;4438 C>A]	25	Y1479X	repeat 12 - rod1	No	Normale
	7b	F	33	c.[4437 A>G;4438 C>A]	25	Y1479X	repeat 12 - rod1	Si; 28	Normale
	7c	F	25	c.[4437 A>G;4438 C>A]	25	Y1479X	repeat 12 - rod1	Si; 21	Normale
	7d	F	u	c.[4437 A>G;4438 C>A]	25	Y1479X	repeat 12 - rod1	No	Normale
	8	F	u	c.4543 C>T	27	R1515X	repeat 13 - rod1	Si; 25	-
	9a	F	49	c.6724 C>T	41	R2242X	repeat 21- rod2	Si; 21	Normale
Delezioni	10	F	6,7	c.698delA	4	fsX258	CHD2	-	-
	11a	F	25,6	c.4038delG	24	fsX1349	repeat 11 - rod 1	Si; 17	Normale
	11b	F	55	c.4038delG	24	fsX1349	repeat 11 - rod 1	Si; 17	Normale
	12	F	u	c.4970delG	31	fsX1671	repeat 15 - rod 1	Si; 23	Normale
	13	F	28	c.7333delG	45	fsX2452	repeat 23	Si; 9	Normale
	14	F	u	c.7790_7803del	48	fsX2617	repeat 24	-	-
	15	F	23	c.6287_6288insAA	39	fsX2133	repeat 22 - rod2	Yes; 15	Deficit lieve
Inserzioni	16	F	8	c.7800_7801insC	48	fsX2600	repeat 24	Yes; 3	Normale

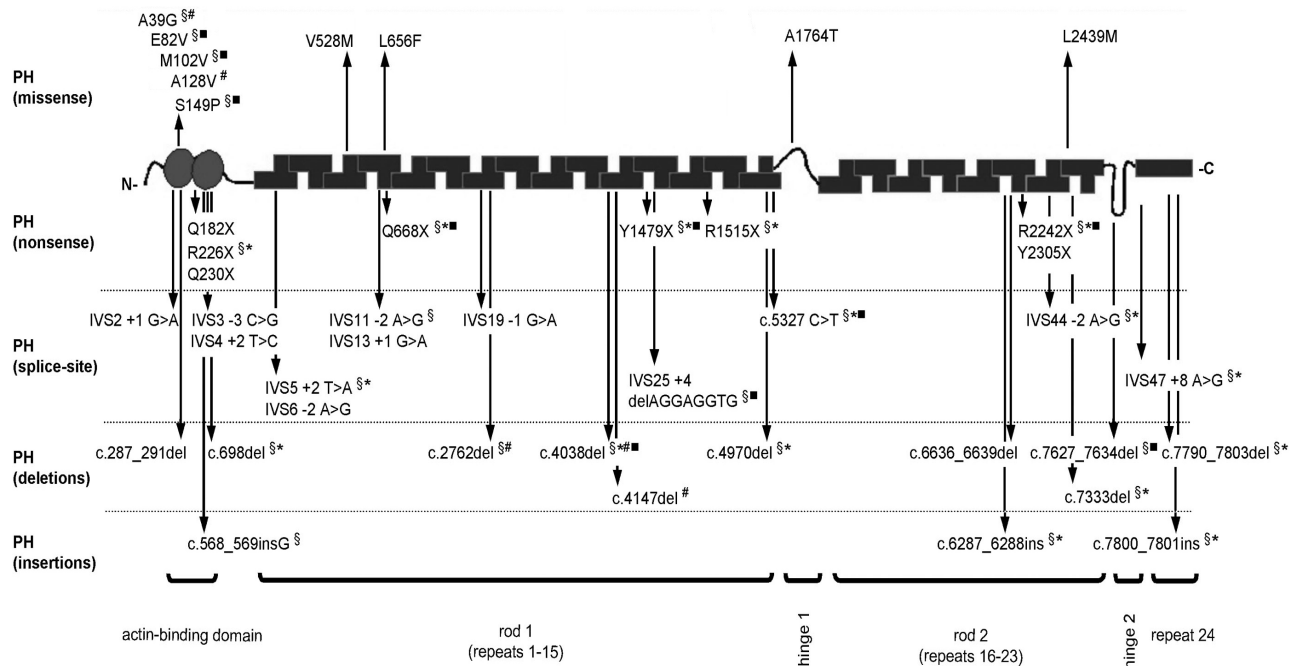


Figura 3.5. Localizzazione delle mutazioni di *FLNA* (Riferimento tabelle 2 e 3) sulla struttura del monomero di *FLNA*. §: mutazioni note di *FLNA* presenti anche in questo studio; *: mutazioni nuove di *FLNA*; **: delezioni e un inserzione che non alterano l'open reading-frame; ***: mutazioni che conferiscono due diversi fenotipi; #: mutazioni associate con EDS; ‡: mutazioni che conferiscono un fenotipo intermedio OPD-like.

Venticinque pazienti, tutti con mutazioni di *FLNA* (100%) appartenevano a 10 famiglie con PNH X-linked. In quattro di queste famiglie, descritte precedentemente da Moro *et al.*, 2002 e Guerrini *et al.*, 2004, i pazienti avevano PNH bilaterale classica mentre in una famiglia i pazienti avevano PNH unilaterale. Delle 5 famiglie mai descritte prima 4 presentavano PNH bilaterale classica e una sindrome di Ehlers-Danlos (EDS). I 15 pazienti sporadici erano così suddivisi: 13 avevano PNH bilaterale classica, 2 avevano PNH con EDS.

Complessivamente la percentuale di mutazioni di *FLNA* era del 49% in pazienti con PNH classica, e in particolare del 77% nelle femmine (33 su 43) e del 7% nei maschi (2 su 49), indipendentemente dal fatto che fossero casi sporadici o familiari. Tale percentuale era però del 100% se si consideravano esclusivamente i casi familiari (3

maschi e 19 femmine) e del 26% (13 su 50) se si consideravano solo i casi sporadici. In particolare la probabilità di trovare mutazioni in *FLNA* in un paziente sporadico con PNH bilaterale classica era del 54% nelle femmine (13/24) e dello 0% nei maschi (0/24). Trentasette dei 40 pazienti con mutazioni in *FLNA* (93%) erano femmine.

3.2.1 Nuove mutazioni di *FLNA*

3.2.1.a Casi familiari

Famiglia 1 (Tabella 3.2 , individui 2a e 2b) Il probando (Fig. 3.6 1-II.3) era una donna di 20 anni con quoziente intellettivo borderline (Full Scale Intelligence Quotient (FSIQ) = 69) che aveva eseguito una risonanza magnetica in seguito a episodi di delirio. La sua risonanza magnetica e quella della sorella di 24 anni (Fig. 3.6 1-II.4) mostravano PNH bilaterale classica. L'analisi di *FLNA* con DHPLC ha identificato un profilo di eluizione anomalo a livello dell'esone 31; il successivo sequenziamento diretto ha rivelato la presenza del cambio nucleotidico c.5327 C>T che causava una mutazione silente G1710G. Da una analisi *in silico* sembrava che tale mutazione in realtà riconoscesse un sito accettore di slicing alternativo (Berkeley Drosophila Genome Project splice database, score = 0.99). Per verificare tale ipotesi abbiamo effettuato una RT-PCR su cDNA ottenuto da cellule linfoblastoidi del paziente. In particolare è stato amplificato un frammento di 700bp di tale cDNA che comprendeva gli esoni 31 e 32. La sequenza fatta a partire da questo amplificato era normale e non presentava la variazione nucleotidica identificata nel DNA genomico, indicando che l'allele che portava la mutazione non era espresso correttamente. Sono stati quindi clonati i prodotti di RT-PCR ed è stato visto che 1 dei 39 cloni conteneva un inserto più corto di mRNA che aveva subito uno splicing anomalo (352bp invece di 412 bp). Esistono due meccanismi che potevano spiegare la ridotta espressione dell'allele mutato: il "nonsense-mediated mRNA decay" (NMD) o l'inattivazione sbilanciata del cromosoma X. L'NMD è un meccanismo di sopravvivenza essenziale per mantenere il controllo della qualità dell' mRNA andando a degradare gli mRNA che contengono codoni di terminazione prematuri (Holbrook *et al.*, 2004). Abbiamo trattato le cellule linfoblastoidi del paziente con ciclosporina e abbiamo eseguito nuovamente RT-PCR,

clonaggio e sequenziamento. Quello che abbiamo osservato era che le cellule trattate con ciclosporina presentavano un maggior numero di cloni (8 su 35) che contenevano il prodotto di splicing anomalo. Questo risultato era in accordo con il meccanismo di NMD. Inoltre, sono stati fatti sulle cellule linfoblastoidi del paziente studi per valutare l'inattivazione del cromosoma X. Tali studi hanno mostrato una inattivazione sbilanciata in maniera significativa (80:20). Questi risultati indicavano che sia l'NMD, sia l'inattivazione sbilanciata del cromosoma X avevano contribuito a far esprimere in maniera prevalente l'allele normale nelle cellule linfoblastoidi del paziente.

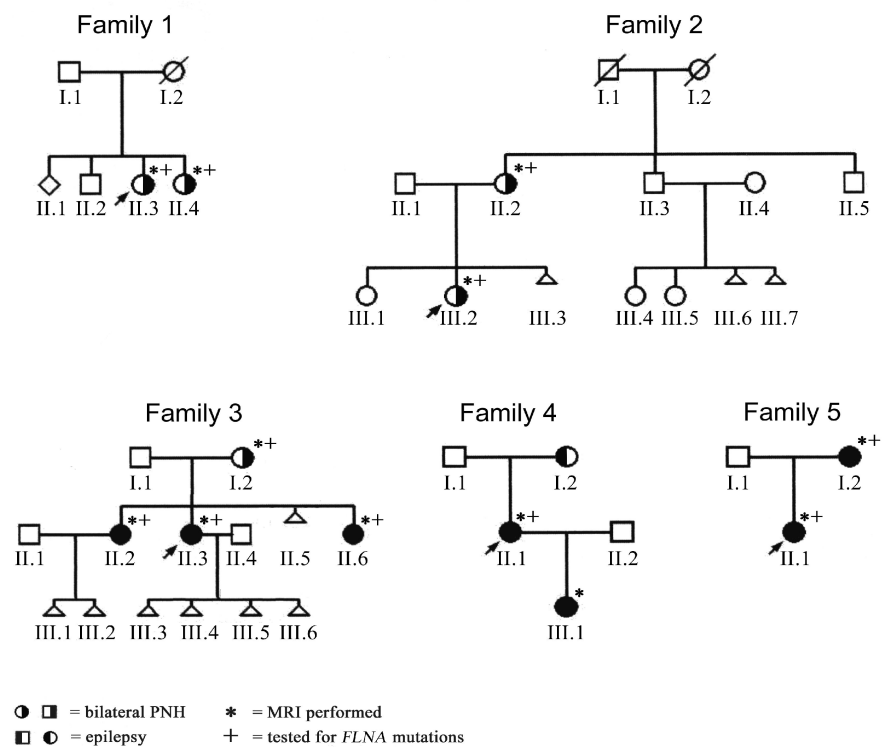


Figura 3.6. Alberi genealogici delle 5 famiglie con mutazioni nuove di FLNA

Famiglia 2 (Tabella 3.2, individui 6a e 6b): Il probando (Fig 3.6, 2-III.2) era una ragazza di 15 anni con trombocitopenia idiopatica, scoliosi grave, anomalie cardiache, lassità dei legamenti e denti malposizionati. La risonanza magnetica (Fig. 3.1A) presentava PNH bilaterale classica che era presente anche nella madre (Fig. 3.6, 2-II.2).

L'analisi mediante DHPLC ha evidenziato un profilo anomalo dell'esone 13 di *FLNA*; il successivo sequenziamento ha identificato una sostituzione nucleotidica c.2002C>T che causava una interruzione a livello della proteina (Q668X) sia nella probanda che nella madre.

Famiglia 3 (Tabella 3.2; individui 7a-7d): Il probando (Fig. 3.6; 3-II.3) era una donna di 33 anni con PNH bilaterale classica ed epilessia che aveva avuto 4 aborti. Entrambe le sorelle della probanda (Fig. 3.6; 3-II.2 e 3-II.6) avevano epilessia, mentre la madre della probanda (Fig. 3.6; 3.I.2) aveva PNH bilaterale classica ma non aveva epilessia. L'analisi al DHPLC ha mostrato un'alterazione del profilo dell'esone 25. Il sequenziamento diretto ha identificato in tutti i membri affetti della famiglia una sostituzione di 2 nucleotidi in una configurazione *cis* che determinava una interruzione della proteina (Y1479X).

Famiglia 4 (Tabella 3.2; individuo 9a): Il probando (Fig. 3.6; 4-II.1) era una donna di 49 anni con PNH bilaterale classica ed epilessia ed aveva una figlia con lo stesso quadro fenotipico. L'analisi mediante DHPLC ha mostrato un profilo anomalo dell'esone 41 di *FLNA*; il successivo sequenziamento ha identificato una sostituzione nucleotidica c.6724C>T che causava una interruzione a livello della proteina (R2242X) sia nella probanda che nella madre.

3.2.1.b Casi sporadici

Abbiamo identificato 11 mutazioni di *FLNA* in 11 casi sporadici femminili di PNH bilaterale classica (Tabella 3.2; Fig. 3.5). In particolare abbiamo identificato mutazioni nei siti di splicing in 3 pazienti, mutazioni nonsense in 2 pazienti, delezioni in 4 pazienti e inserzioni in 2 pazienti.

3.2.1.c Mutazioni di *FLNA* in una famiglia con PNH e sindrome di Ehlers-Danlos

Famiglia 5 (Tabella 3.2; individui 11a e 11b): Il probando (Fig. 3.6; 5-II.1) presentava PNH classica associata con EDS ed epilessia, ipermobilità dei legamenti,

epidermide iperplastica e dismorfismi facciali quali ipertelorismo, naso corto, filtro lungo e poo profondo e micrognazia. La madre (Fig. 3.6; 5-I.2) presentava epilessia e PNH bilaterale (Fig. 3.1C) ma non aveva tratti dismorfici nè segni di EDS. L'analisi mediante DHPLC ha mostrato un profilo anomalo dell'esone 24 di *FLNA*; il successivo sequenziamento ha identificato una delezione c.4038delG che causava una probabile interruzione della proteina sia nella probanda che nella madre.

3.3 Analisi statistica

Per valutare la frequenza delle mutazioni di *FLNA* nei diversi domini della proteina abbiamo effettuato una analisi statistica integrando i nostri dati con quelli della letteratura e considerando quindi tutte le 42 mutazioni di *FLNA* identificate fino ad oggi in pazienti con PH. In totale sono state trovate 14 mutazioni del dominio di legame all'Actina (costituito da 904 nucleotidi, 10.4% del gene), 17 mutazioni dei domini Rod1 e Hinge1 (costituiti da 5029 nucleotidi; 56.7% del gene), 8 mutazioni nei domini Rod2 e Hinge2 (costituiti da 2629 nucleotidi; 29.7% del gene) e 3 mutazioni nel dominio C-terminale (costituito da 299 nucleotidi; 3.4% del gene). L'analisi statistica effettuata mediante il test di esatto di Fisher ha evidenziato che il numero di mutazioni di *FLNA* era significativamente più frequente nel dominio di legame all' Actina ($p=0.0087$) rispetto agli altri domini dimostrando che il dominio di legame all'Actina rappresenta una regione “hotspot” per mutazioni di *FLNA* associate a PNH bilaterale classica. E' stato inoltre effettuato un test del Chi-quadro per valutare il rapporto maschi/femmine dei 37 pazienti con PNH bilaterale classica ma senza mutazioni di *FLNA*. Tale analisi ha dimostrato che il rapporto maschi/femmine in questo gruppo era significativamente sbilanciato a favore dei maschi (26 maschi contro 11 femmine: $p=0.013$).

Nella figura 3.7 sono rappresentati alcuni esempi di profili cromatografici alterati e il relativo elettroferogramma di sequenza degli individui in cui è stata identificata una mutazione nel gene *FLNA*.

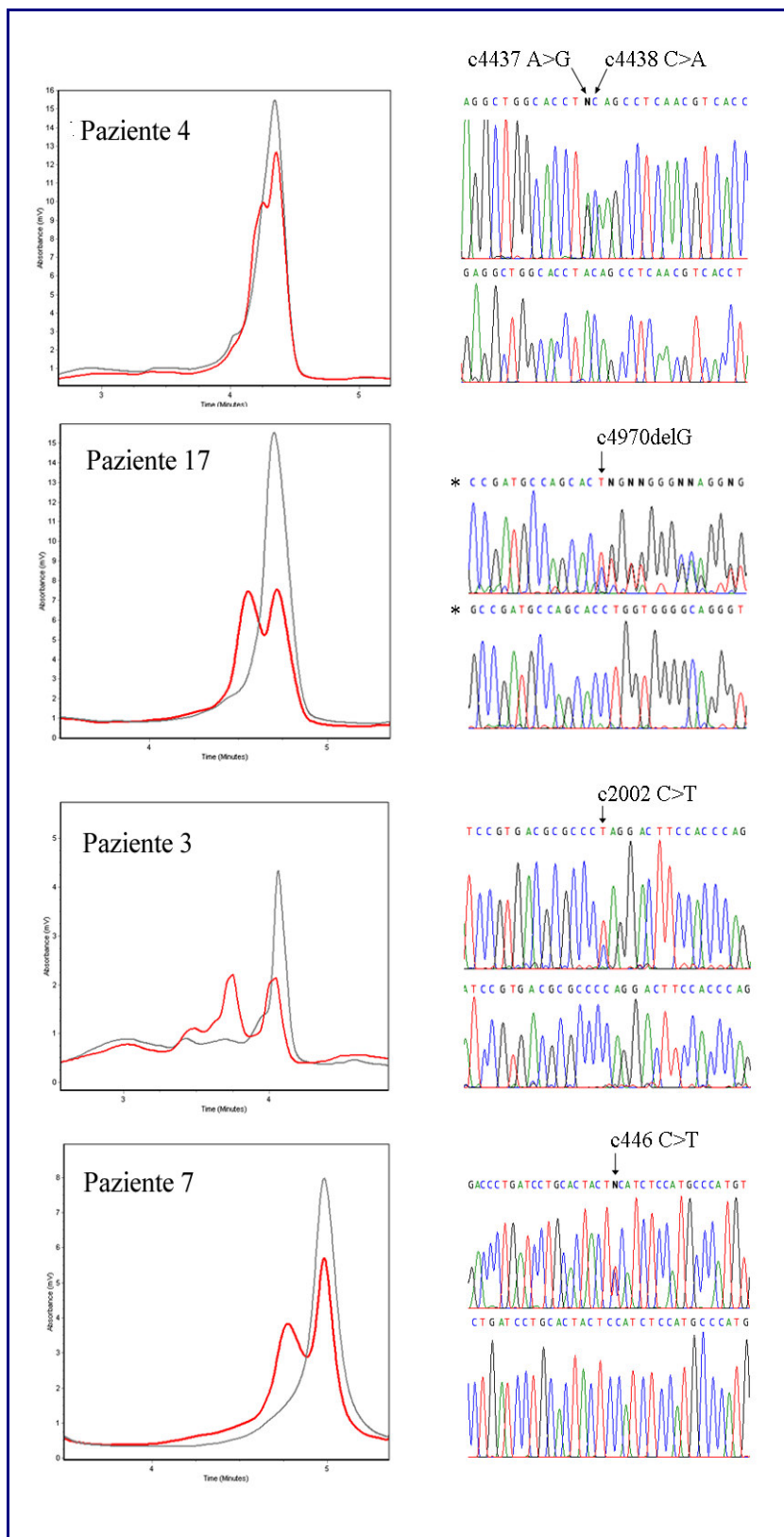


Figura 3.7. Esempi di profili cromatografici ed elettroferogrammi di sequenza corrispondenti a mutazioni nel gene *FLNA*.

Abbiamo inoltre identificato 9 diversi cambi nucleotidici che si sono rivelati essere polimorfismi in quanto sono stati ritrovati nei database on-line (dbSNPs e/o in allineamenti con cloni di cDNA mediante BLAST www.nih.nlm.ncbi.org) e/o in un campione di 248 cromosomi di controllo di diverse origini etniche. Nella tabella 3.3 sono riportati i 7 polimorfismi identificati.

Tabella 3.3 Polimorfismi del gene *FLNA* identificati nella nostra casistica

ESONE/INTRONE	ALTERAZIONE NUCLEOTIDICA
<i>IVS2</i>	<i>IVS2 -11 G>A</i>
<i>Ex11</i>	<i>c.1582A>G</i>
<i>IVS34</i>	<i>IVS34 +40 C>T</i>
<i>Ex36</i>	<i>c.5850 C>T</i>
<i>IVS3</i>	<i>IVS33 +46 T>C</i>
<i>IVS47</i>	<i>IVS47 +8A>G</i>
<i>IVS47</i>	<i>IVS47 +11 T>C</i>
<i>Ex 2</i>	<i>c.768 T>C</i>
<i>IVS17</i>	<i>IVS17 -21 C>A</i>

3.4 Studio di mosaicismo nel paziente 1

3.4.1 Analisi del gene *FLNA* mediante DHPLC e sequenziamento

L'analisi effettuata sul DNA genomico estratto da sangue periferico del paziente 1 (I-II:2) mediante DHPLC ha messo in evidenza un profilo di eluizione alterato nell'esone 3 (Fig. 3.8A). L'analisi di sequenza eseguita successivamente ha evidenziato una mutazione c.568_569insG presente sotto forma di mosaico (Fig. 3.8B) in quanto il

picco di sequenza corrispondente all'allele mutato era molto più basso rispetto a quello corrispondente all'allele normale. Tale inserzione causa una interruzione del modulo di lettura del DNA con conseguente troncamento della proteina a livello dell'aminoacido 161.

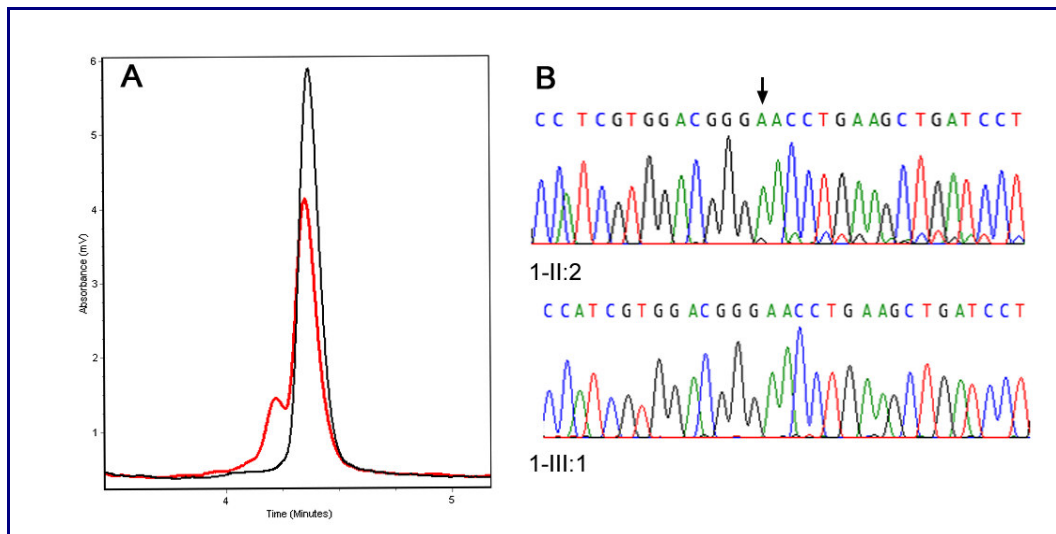


Figura 3.8. (A) Profili cromatografici di eluizione del DHPLC dell'esone 3 nel paziente 1 (linea rossa) e nel controllo normale (linea nera). (B) Elettroferogrammi di sequenza dell' amplicone contenente la mutazione dell'esone 3 nel paziente 1 e in sua figlia. La freccia indica la mutazione c.568_569insG che causa l'interruzione della proteina all'aminoacido 161.

3.4.2 Analisi di clonaggio dei prodotti di PCR nel paziente 1

Al fine di confermare e definire con maggior accuratezza la mutazione, è stato effettuato il sub-clonaggio del prodotto di PCR ottenuto dalla paziente. L'analisi di SNUPE-DHPLC (Fig. 3.9A) e il sequenziamento diretto di un clone contenente l'allele mutato hanno confermato l'inserzione di una G a livello del nucleotide 568 (Fig. 3.9B).

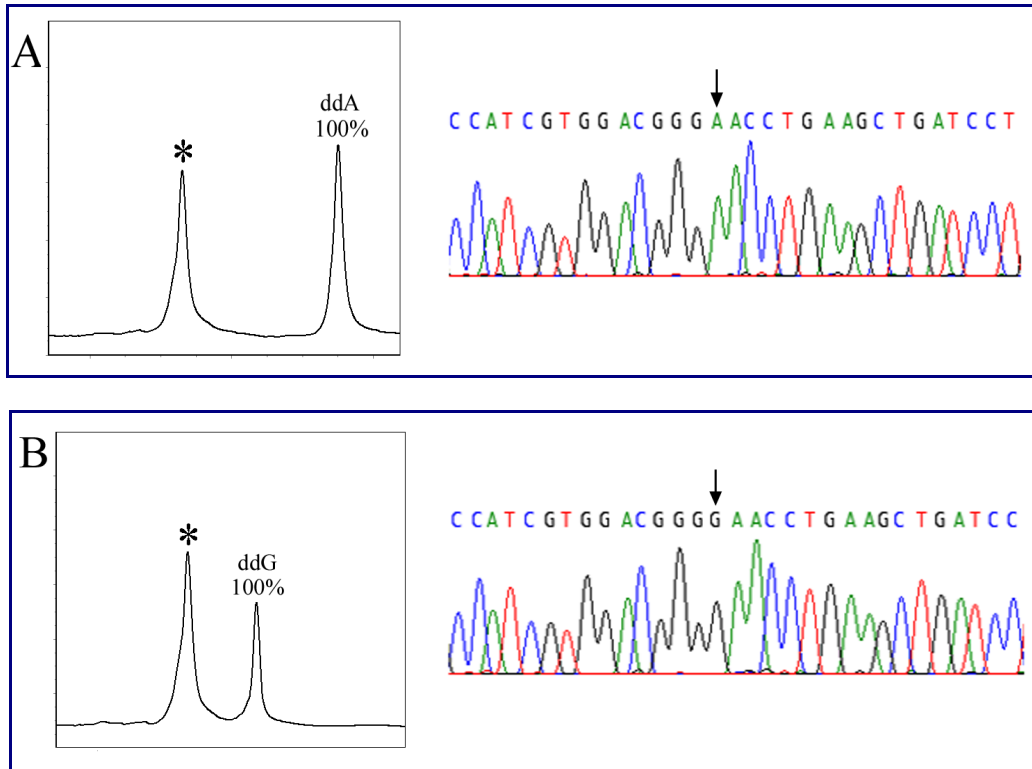


Figura 3.9. (A) Profilo cromatografico di eluizione dell'analisi di SNuPE-DHPLC di un clone contenente l'allele normale e di un clone contenente l'allele mutato nel paziente 1. Gli asterischi corrispondono al primer non esteso; ddG corrisponde all'allele mutato e ddA corrisponde all'allele wild-type. (B) Elettroferogramma corrispondente alla sequenza effettuata sugli stessi cloni. La freccia indica la posizione della mutazione c.568_569insG che causa l'interruzione della proteina all'aminoacido 161.

L'analisi di SNuPE associata a DHPLC effettuata su DNA genomico derivato da sangue periferico ha identificato una percentuale di allele mutato del 17% (Fig. 3.10). La stessa analisi effettuata sui prodotti di PCR ottenuti dalle 96 colonie contenenti l'inserito sub-clonato ha mostrato che 14 colonie su 96 presentavano l'allele mutato (14.6%). Tali risultati confermavano che la mutazione era presente sotto forma di mosaico somatico. L'analisi di sequenza dell'esone 3 di *FLNA* effettuata sulla figlia della paziente è risultata negativa.

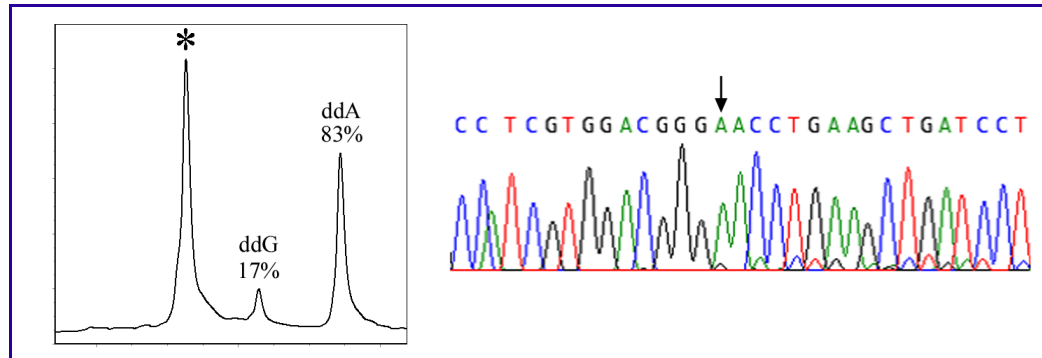


Figura 3.10 Profilo cromatografico di eluizione dell'analisi di SNUPE-DHPLC (Gli asterischi corrispondono al primer non esteso; ddG corrisponde all'allele mutato e ddA corrisponde all'allele wild-type). In figura è mostrato anche l'elettroferogramma dell'analisi di sequenza effettuate sul DNA genomico derivato da leucociti del paziente 1 (la freccia indica la posizione della mutazione c.568_569insG che causa l'interruzione della proteina all'aminoacido 161).

3.5 Studio di mosaicismo nel paziente 2

3.5.1 Analisi del gene *FLNA* mediante DHPLC e sequenziamento

L'analisi mediante DHPLC del paziente 2 (2:II-1) ha evidenziato un'alterazione nel profilo di eluizione dell'amplicone contenente l'esone 12 (Fig. 3.11A). Il successivo sequenziamento ha mostrato la presenza di un cambio nucleotidico, in eterozigosi, A → G localizzato 2 nucleotidi a monte dell'esone 12 e quindi posizionato a livello delle due basi che formano il sito accettore di splicing. Sorprendentemente, questa mutazione era presente in uno stato eterozigote e non in uno stato emizigote come invece atteso (Fig. 3.11). Al fine di escludere ogni possibilità di errore abbiamo effettuato l'estrazione del DNA genomico su un nuovo campione ematico del paziente 2. Il risultato è stato confermato mediante sequenziamento diretto. La figlia del paziente 2 non è risultata portatrice della mutazione (Fig. 3.11B).

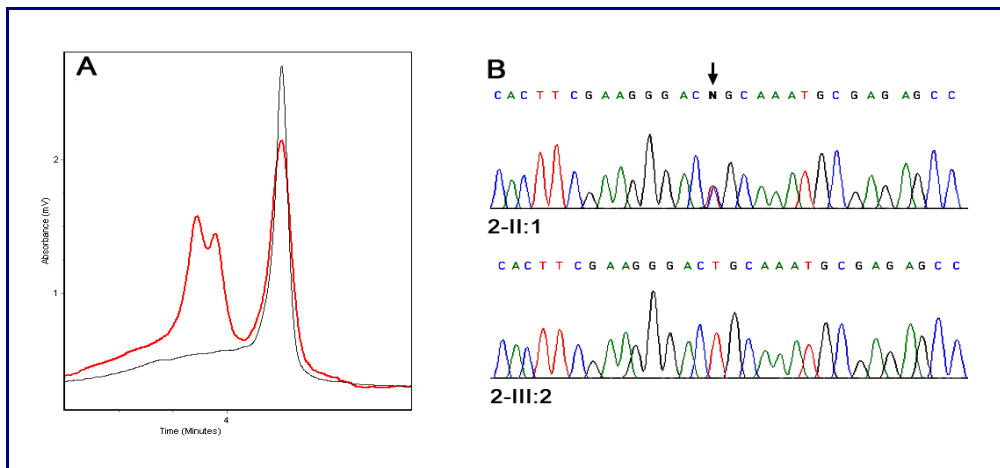


Figura 3.11. (A) Profili cromatografici di eluizione del DHPLC dell'esone 12 nel paziente 2 (linea rossa) e nel controllo normale (linea nera). (B) Elettroferogrammi di sequenza della regione IVS11 – Esone 12 nel Paziente 2 e in sua figlia. E' evidente il picco in eterozigosi indicato dalla freccia.

3.5.2 Analisi dei marcatori polimorfici presenti sul cromosoma X

L'assenza della mutazione IVS11 -2 A>G nella figlia del paziente 2 può essere spiegata ipotizzando che abbia ereditato dal padre un cromosoma X derivante dalla popolazione cellulare normale e quindi privo della mutazione del gene *FLNA*.

Per verificare questa ipotesi sono stati analizzati 15 marcatori polimorfici localizzati sul cromosoma X ed è stata valutata la trasmissione mendeliana degli alleli dal padre alla figlia.

Dopo aver ricostruito la fase dei marcatori, abbiamo potuto confermare, vista l'assenza della mutazione nel gene *FLNA* e la trasmissione mendeliana dei 15 marcatori polimorfici, che la figlia aveva ereditato il cromosoma X proveniente dalla popolazione cellulare non mutata del padre (Tabella 3.4).

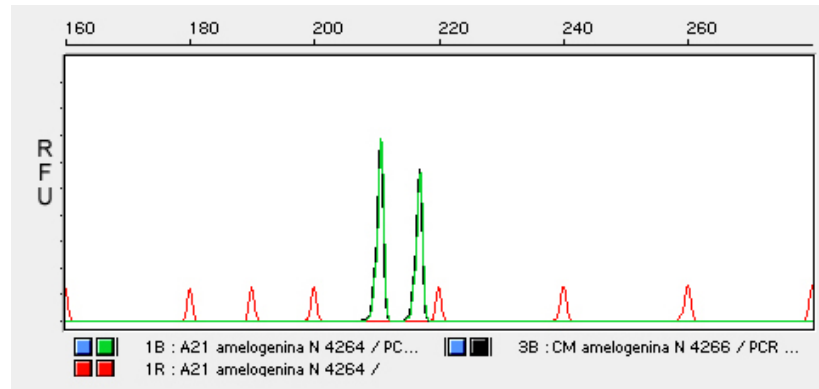
Tabella 3.4. Taglie alleliche dei diversi marcatori polimorfici utilizzati nello studio. Nell'ultima colonna è indicata con **X** la presenza di ereditarietà mendeliana. (N.A. Ereditarietà mendeliana non applicabile al gene Amelogenina).

Marcatore microsatellite	Paziente 2	Figlia del paziente 2		Ereditarietà Mendeliana
DXS8077	102,5	102,5	102,5	X
DXS990	168	168	170,2	X
DXS1002	263,2	263,2	269	X
DXS1217	233,5	233,5	233,5	X
DXS1059	190,6	190,6	190,6	X
DXS1216	245,7	241,7	245,7	X
DXS1210	199	199	201	X
DXS983	178,2	176	178,2	X
DXS1194	265,8	265,8	265,8	X
DXS1106	172	172	177,7	X
Amelogenina	210	217	210	N.A.
DXS8081	226	226	226	X
DXS1220	212,3	212,3	212,3	X
DXS1001	204,2	204,2	204,2	X
DXS8079	213,5	213,5	217,2	X
DXS991	264,6	264,6	277,9	X

3.5.3 Analisi del gene amelogenina nel paziente 2

I risultati molecolari ottenuti, insieme al fenotipo clinico del paziente e al suo cariotipo, hanno escluso la possibilità che il paziente 2 fosse un individuo 47XXY (sindrome di Klinefelter) o 46XY/47XXY (Mosaico Klinefelter). Il profilo elettroforetico ottenuto sul sequenziatore ABI310 mostra contenuti allelici derivanti dai cromosomi X e Y in linea con quelli di un controllo maschile (Fig. 3.12).

A



B

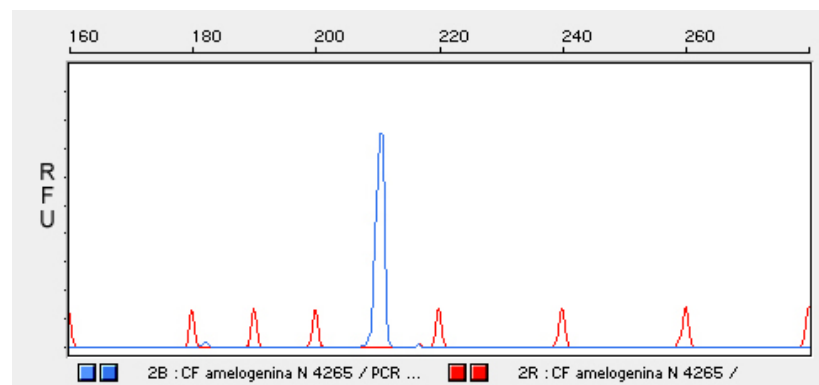


Figura 3.12. (A) PCR fluorescente del gene *amelogenina* esaminata su ABI310. In verde è mostrato il profilo ottenuto dal paziente 2 mentre in nero quello ottenuto da un controllo maschile CM. I due profili sono sovrapponibili. (B) PCR fluorescente del gene *amelogenina* esaminata su ABI310. In blu è mostrato il profilo ottenuto da un controllo femminile CF. Il prodotto allelico proveniente dal cromosoma Y è assente.

3.5.4 Analisi di RT-PCR nel paziente 2

Mediante l'analisi di RT-PCR effettuata sul paziente 2 sono stati ottenuti due prodotti di 244bp e 107bp. La successiva analisi di sequenza dei due prodotti recuperati da gel di agarosio, ha dimostrato che il frammento di 244bp corrispondeva all'esone 12 che aveva subito un corretto splicing dell'mRNA, mentre il frammento di 107bp corrispondeva al cDNA mutato contenente parte dell'esone 11 e dell'esone 13. In

questo caso l'*exon skipping* dell'intero esone 12 causava la perdita di un frammento di 137bp e la conseguente interruzione della proteina all'amino-acido 574.

3.5.5 Analisi di mosaicismo nel paziente 2 mediante SNuPE e DHPLC

La reazione SNuPE effettuata sul DNA linfocitario del paziente 2 ha rivelato la presenza del 42% di allele mutante, in accordo con lo stato eterozigote osservato con il sequenziamento diretto.

Al fine di verificare la presenza della mutazione anche in un tessuto di origine ectodermica, la stessa analisi è stata effettuata sul DNA estratto da un gruppo di bulbi di capello dove è stata riscontrata la presenza del 69% di allele mutante.

Mediante uno studio di tipo biochimico, è stato ipotizzato che un singolo bulbo di capello origini da tre cellule progenitrici (Dancis *et al.*, 1981; Kato *et al.*, 2001). Le tipologie di bulbo presenti in un paziente maschio, e quindi anche nel paziente 2, sono legate alle possibili combinazioni delle tre cellule progenitrici che possono essere portatrici o meno della mutazione sul cromosoma X. Con questa premessa è possibile arrivare alla conclusione che esistono quattro diverse tipologie di bulbo di capello derivanti dalle tre cellule progenitrici che presentano nell'ordine: nessuna, una, due o tre cellule mutanti sul cromosoma X (0% , 33%, 66% e 100% di allele mutante).

Per verificare questa ipotesi, l'analisi mediante SNuPE è stata effettuata sui DNA provenienti da 7 diversi bulbi del paziente 2. Abbiamo ottenuto le seguenti percentuali di allele mutante: 4%, 20%, 93%, 92%, 33%, 28% e 77%.

Anche se il numero di bulbi analizzati è piccolo e quindi non significativo a livello statistico, abbiamo suddiviso i risultati ottenuti nei seguenti raggruppamenti:

- Bulbi senza allele mutante	n°1	4%
- Bulbi con 1/3 di allele mutante	n°3	20% / 28% / 33%
- Bulbi con 2/3 di allele mutante	n°1	77%
- Bulbi con 3/3 di allele mutante	n°2	92% / 93%

Abbiamo attribuito le variazioni rispetto ai valori attesi a eventuali problemi di campionamento del bulbo e all'elevata sensibilità del metodo. Durante il campionamento del bulbo è infatti molto facile prelevare anche cellule dell'epitelio del cuoio capelluto che, non originando dagli stessi progenitori del bulbo, possono aver fatto deviare i valori ottenuti sperimentalmente da quelli teorici attesi.

In figura 3.13 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi mediante SNuPE e DHPLC effettuata sul DNA estratto da quattro diversi bulbi di capello del paziente 2 ed i corrispondenti elettroferogrammi di sequenza.

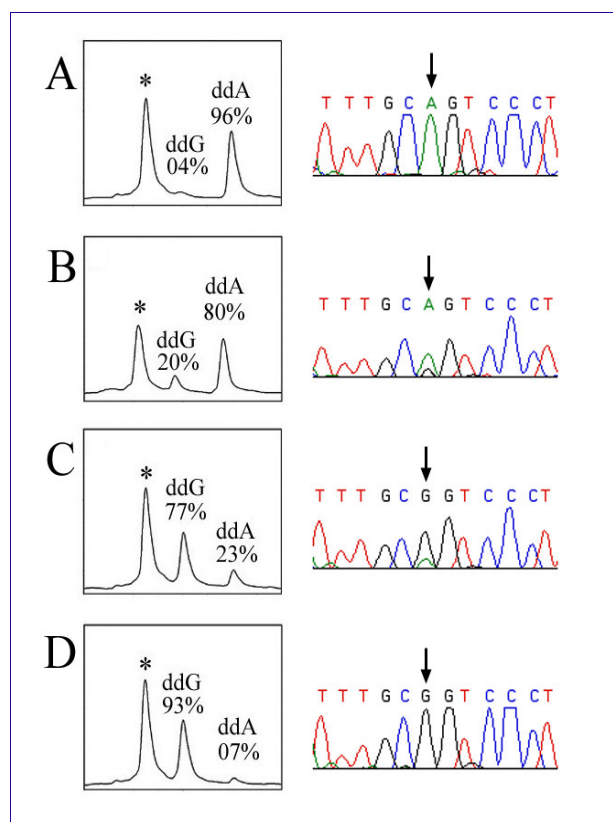


Figura 3.13. Risultati delle reazioni SNuPE – DHPLC ottenuti dai DNA estratti da quattro diversi bulbi di capello del paziente 2 e corrispondenti elettroferogrammi di sequenza; ddG dideoossiGuanina; ddA dideoossiAdenina; il simbolo * indica il primer non esteso. In a, b, c e d sono presenti rispettivamente il 4%, 20%, 77% e il 93% di allele mutante (prodotto con ddG in posizione 3'). Le frecce sugli elettroferogrammi indicano il sito della mutazione.

3.6 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con lissencefalia con gradiente P>A

3.6.1 Pazienti studiati

Tutti i 19 pazienti che sono stati studiati mediante MLPA per identificare delezioni genomiche del gene *LIS1* presentavano le caratteristiche cliniche della lissencefalia tra cui ritardo precode dello sviluppo, ritardo mentale grave, epilessia e quadriparesi spastica. Nella maggior parte dei casi le crisi si presentavano come spasmi infantili associati a molti altri tipi di crisi. Tutti i pazienti presentavano lissencefalia di grado 2 o di grado 3 e delezioni o duplicazioni del gene *LIS1* (Tabella 3.5; Fig. 3.14).

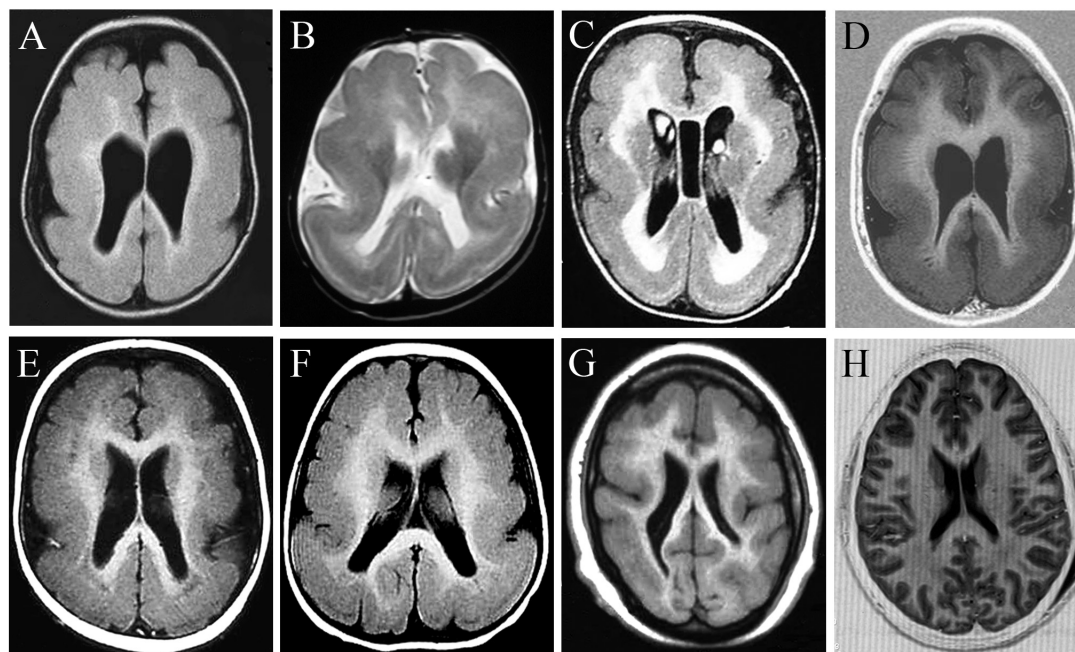


Figura 3.14. Sezioni assiali di risonanze magnetiche cerebrali A) Paziente con MDS (grado 2); da B a F) paziente P6 (B) (grado 2) con una duplicazione genomica, pazienti P12 ©, (grado 3), P9 (D) (grado 3), P14 (E) (grado 3) e P10 (F) (grado 3), tutti con una delezione genomica di *LIS1*. G) paziente con una mutazione missenso di *LIS1* (Glu41Lys) e lissencefalia di grado 4-1; Controllo normale.

Tabella 3.5: Delezioni e duplicazioni identificate mediante MLPA

<i>Paziente</i>	<i>Età ⁽¹⁾</i>	<i>Risultati analisi MLPA</i>	<i>Taglia della delezione/duplicazione</i>	<i>Grado di severità</i>
P1	6a 9m	Del <i>LIS1</i> intron 3 to <i>KIAA0664</i> exon 7	331,9 Kb	3
P2	6a 7m	Del <i>LIS1</i> exon 1 to exon 11	182,1Kb	3
P3	3a 9 m	Del <i>LIS1</i> exon 6 to exon 9	9,3 Kb ⁽²⁾	3
P4	6a 9 m	Del <i>LIS1</i> exon 5	3,2 Kb ⁽²⁾	2
P5	6a 3m	Del <i>HIC1</i> exon 1 to <i>LIS1</i> exon 1	1237Kb	3
P6	4a 4m	Dup <i>LIS1</i> exon 3 to exon 5	31,8 Kb	2
P7	2a 7m	Del <i>HIC1</i> exon 1 to <i>LIS1</i> exon 8	1275 Kb	3
P8	2a 1m	Del <i>MGC3329</i> exon 1 to <i>LIS1</i> exon 1	580,1 Kb	3
P9	8a 1m	Del <i>LIS1</i> exon 6 to exon 9	13,1 Kb	3
P10	6a 11m	Del <i>LIS1</i> exon 1	126,1Kb	3
P11	3a 3m	Del <i>LIS1</i> exon 8 to exon 9	5,8 Kb ⁽²⁾	3
P12	1a 1m	Del <i>HIC1</i> exon 1 to <i>LIS1</i> exon 1	1237Kb	3
P13	2a 5m	Del <i>LIS1</i> exon 8 to exon 9	5,8 Kb ⁽²⁾	3
P14	11a 9m	Del <i>HIC1</i> exon 1 to <i>LIS1</i> exon 2	1264,1Kb	3
P15	8a 7m	Del <i>LIS1</i> intron2 to exon5	31,7Kb	3
P16	9a 5m	Del <i>LIS1</i> exon 8	2,2Kb ⁽²⁾	2
P17	6a 6m	Del <i>LIS1</i> exon 8 to exon 9	7,3Kb	3
P18	6a 7m	Del <i>HIC1</i> exon 1 to <i>LIS1</i> exon 1	1237Kb	2
P19	1a 5m	Del <i>LIS1</i> exon 2 to exon 9	86,5Kb	3

Del = delezione; dup = duplicazione

(1) Età al momento dello studio

(2) Taglia esatta ottenuta con esperimenti di LR-PCR

3.6.2 Analisi mediante FISH e analisi di mutazione

L'analisi mediante FISH della regione 17p13.3 non ha identificato nessuna alterazione cromosomica nei 45 pazienti studiati. Venti dei 45 pazienti studiati (44%) presentavano una mutazione del gene *LIS1* in seguito a sequenziamento diretto.

3.6.3 Analisi mediante MLPA

L'analisi mediante MLPA effettuata in 25 pazienti con lissencefalia isolata e gradiente P>A e risultati negativi all'analisi di FISH e sequenziamento diretto, ha identificato 18 delezioni e 1 duplicazione del gene *LIS1* (Fig. 3.15). L'utilizzo dell'MLPA nella diagnosi genetica dei pazienti con lissencefalia isolata portava ad un incremento dal 44% all'87% (da 20/45 a 39/45) nella percentuale dei pazienti in cui poteva essere dimostrata una alterazione che coinvolgeva il gene *LIS1*. I risultati molecolari e i gradi di severità del quadro neuroradiologico dei pazienti con delezioni/duplicazioni identificate in questo studio sono riportati nella tabella 3.5.

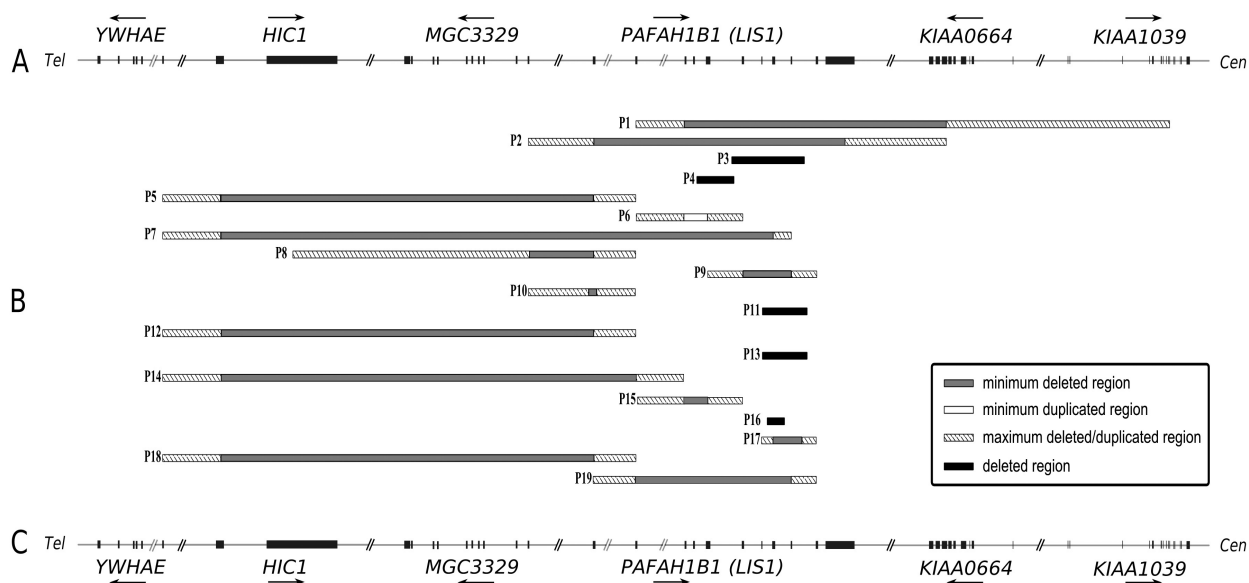


Figura. 3.15. (A, C) Struttura genomica della regione 17p13.3 che comprende i geni analizzati con MLPA. Le frecce nere indicano l'orientamento genico (dal 5'-UTR al 3'-UTR). Le barre rappresentano gli esoni. Le // delimitano le regioni introniche dei geni che non entrano nella figura. Tel= telomero, cen=centromero. B) Le delezioni/duplicazioni sono rappresentate con una barra orizzontale per ogni paziente (P1-P19).

3.6.4 Caratterizzazione dei punti di rottura

Nel paziente P16, l'analisi di LR-PCR e di sequenziamento diretto dei frammenti di giunzione ha mostrato che una sequenza genomica di 2.2kb che comprendeva l'esone 8 era deleva (Fig. 3.15 e 3.16). Il punto di rottura distale era localizzato in un elemento AluY che si trova normalmente a 0.65kb a monte dell'esone 8, mentre il punto di rottura prossimale era localizzato in un elemento AluJo che si trova normalmente a 1.28kb a valle dell'esone 8. La delezione avveniva quindi tra due ripetizioni Alu altamente omologhe che presentavano lo stesso orientamento genomico. Si aveva un completo allineamento di una sequenza di 33 paia di basi a livello del punto di rottura (Fig. 3.16). Nei pazienti P11 e P13 l'analisi di sequenza dei frammenti di giunzione ha evidenziato che la stessa sequenza genomica di 5.8kb che comprendeva gli esoni 8 e 9 era deleva (Fig. 3.15 e Fig. 3.16). Il punto di rottura distale era localizzato in un elemento AluSq

che si trova normalmente a 0.98kb a monte dell'esone 8, mentre il punto di rottura prossimale era localizzato in un elemento AluJo che si trova normalmente a 2kb a valle dell'esone 9. La delezione avveniva quindi tra due ripetizioni Alu altamente omologhe che presentavano lo stesso orientamento genomico. Si aveva un completo allineamento di una sequenza di 11 paia di basi a livello del punto di rottura (Fig. 3.16). I risultati ottenuti indicavano che il meccanismo più probabile per le delezioni genomiche trovate in questi tre pazienti era una ricombinazione omologa non allelica tra elementi Alu (non-allelic homologous recombination, NAHR) (14,16). Nel paziente P3 l'analisi di sequenza dei frammenti di giunzione ha evidenziato che la sequenza genomica di 0.3kb che comprendeva gli esoni 6, 7, 8 e 9 era deleta (Fig. 3.15. e Fig. 3.16). Il punto di rottura distale era localizzato in un elemento AluY che si trova normalmente a 1.23kb a monte dell'esone 6, mentre il punto di rottura prossimale era localizzato in un elemento AluSp che si trova normalmente a 1.62kb a valle dell'esone 9. L'allineamento mediante BLAST2 delle sequenze Alu fiancheggianti il punto di rottura mostrava un'omologia di sequenza dell'85%. Inoltre questi due elementi Alu mostravano un orientamento genomico identico. Infine in questo paziente abbiamo identificato una inserzione di una sequenza di 24 nucleotidi a livello del punto di giunzione (Fig. 3.16). Nel paziente P4 l'analisi di sequenza dei frammenti di giunzione ha evidenziato che la sequenza genomica di 3.2kb che comprendeva l'esone 5 era deleta (Fig. 3.15 e Fig. 3.16). Il punto di rottura prossimale era localizzato in un elemento AluY che si trova normalmente a 2.2kb a valle dell'esone 5, mentre il punto di rottura distale non era localizzato in alcun elemento ripetuto riconoscibile. L'allineamento mediante BLAST2 delle sequenze Alu fiancheggianti il punto di rottura non mostrava una omologia di sequenza (Fig. 3.16). Questi risultati suggerivano che il meccanismo che più probabilmente spiegava la delezione in questo paziente era una unione ad estremità non omologhe (non-homologous end joining, NHEJ).

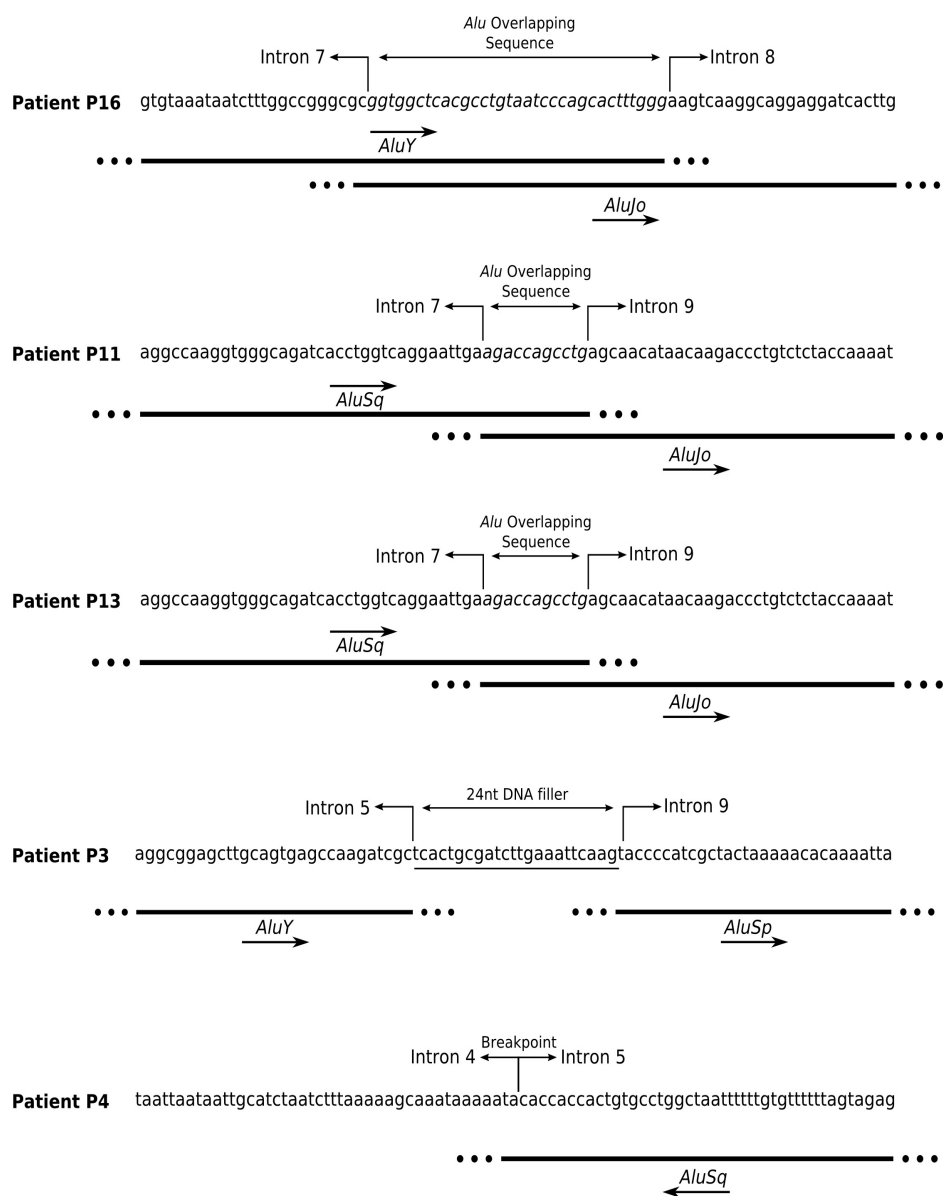


Figura 3.16. Sequenze fiancheggiatrici i frammenti deleti identificati nei pazienti P6, P11, P13, P3 e P4. I nucleotidi in corsivo indicano le sequenze Alu che si sovrappongono e che fiancheggiano le delezioni. I nucleotidi sottolineati rappresentano la sequenza di DNA filler che si trova nel punto di rottura nel paziente 3 (24bp). Le barre nere rappresentano le sequenze Alu. Le frecce nere in grassetto indicano l'orientamento delle sequenze Alu (da 5' a 3').

3.7 Analisi molecolare mediante MLPA in pazienti con SBH diffusa o con gradiente A>P

All'interno di una casistica selezionata con un fenotipo incluso nello spettro agiria-pachigiria-SBH, abbiamo identificato 23 pazienti (22 donne e un uomo), tutti sporadici, con SBH diffusa o con gradiente A>P. L'analisi di mutazione di *DCX* mediante sequenziamento diretto ha portato ad identificare mutazioni nel 52% dei casi (12 su 23). I restanti 11 pazienti, in cui l'analisi di sequenza era risultata negativa, sono stati analizzati mediante MLPA e sono state identificate 3 delezione genomiche di *DCX* (3 su 11 pazienti; 27%). Questi dati portavano dal 52% al 65% la percentuale dei casi con SBH diffusa o con gradiente A>P in cui poteva essere dimostrato un coinvolgimento dele gene *DCX*. Inoltre abbiamo caratterizzato mediante MLPA la delezione genomica di *DCX* in un maschio con lissencefalia X-linked.

Le caratteristiche fenotipiche e molecolari dei pazienti con delezioni in *DCX* sono riportate di seguito.

3.7.1 Paziente 1

Il paziente 1 era una donna di 25 anni che presentava lieve ritardo motorio e del linguaggio. Dall'età di 8 anni presentava crisi epilettiche parziali e secondarie generalizzate. La risonanza magnetica mostrava SBH diffusa (Fig. 3.17A). L'analisi mediante MLPA ha identificato una delezione che comprendeva gli esoni 3, 4 e 5 di *DCX* (Fig. 3.17B). L'analisi di SQF-PCR ha confermato la delezione dei tre esoni (Tabella 3.6).

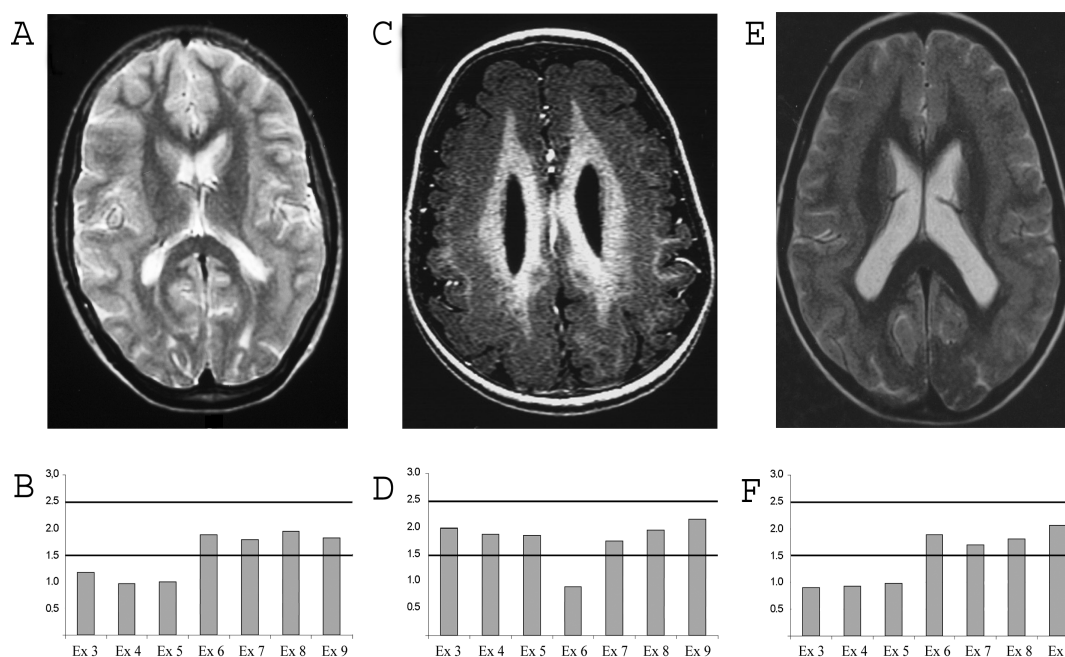


Figura 3.17. A) risonanza magnetica cerebrale del paziente 1 con SBH diffusa. B) Risultati dell'analisi mediante MLPA effettuata nel paziente 1 che mostrano una delezione degli esoni 3-5 di *DCX*; C) Risonanza magnetica del paziente 2 che presentava SBH diffusa con gradiente A>P una delezione dell'esone 6; D) analisi di MLPA del paziente 2 che mostra una delezione dell'esone 6 di *DCX*; E) immagine di risonanza magnetica del paziente 3 che presenta una delezione di *DCX* dall'esone 3 all'esone 5. Gli esoni del gene *DCX* sono riportati sull'asse delle X. Il numero delle copie di *DCX* sono riportate sull'asse delle Y. Le linee orizzontali spesse rappresentano i valori di soglia superiore ed inferiore per assumere la presenza di una delezione (>2.5) o di una delezione (<1.5).

Tabella 3.6. Quozienti di dosaggio (DQ) e deviazioni standard (SD) ottenuti dall'analisi di SQF-PCR

	Paziente 1	Paziente 2	Paziente 3
DQ <i>DCX</i> ex3	0.68	0.90	0.44
<i>SD DCX</i> ex3	0.006	0.004	0.002
DQ <i>DCX</i> ex4	0.49	0.93	0.57
<i>SD DCX</i> ex4	0.004	0.004	0
DQ <i>DCX</i> ex5	0.53	0.96	0.48
<i>SD DCX</i> ex5	0.005	0.005	0.002
DQ <i>DCX</i> ex6	1.13	0.49	1.05
<i>SD DCX</i> ex6	0.010	0.002	0.005

3.7.2 Paziente 2

Il paziente 2 era una bambina di 8 anni che presentava lieve ritardo motorio e del linguaggio fino dalla prima infanzia. All'età di 6 mesi è insorta epilessia sotto forma di spasmi infantili. All'età di 5 anni si sono presentate crisi epilettiche generalizzate resistenti al trattamento farmacologico. La risonanza magnetica presentava una SBH diffusa con gradiente A>P (Fig. 3.17C). L'analisi mediante MLPA ha evidenziato una delezione che comprendeva l'esone 6 di *DCX* (Fig. 3.17D). L'analisi mediante SQF-PCR (Tabella 3.6) e Southern Blot (Fig. 3.18A e 3.18B) accompagnato da quantificazione densitometrica (Fig. 3.18C e 3.18D) hanno confermato la delezione in questo paziente.

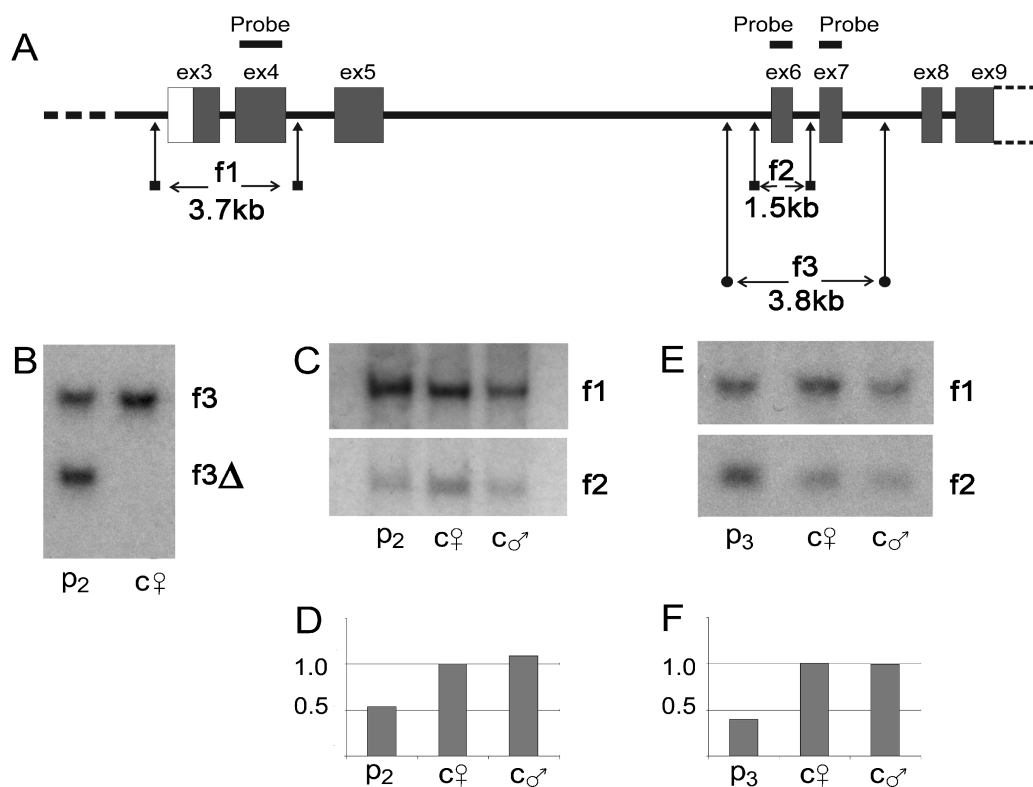


Figura. 3.18. A) Rappresentazione grafica della regione genomica comprendente il gene *DCX*. Le frecce con un quadrato indicano i siti di restrizione dell'enzima *HindIII*. Le frecce con un cerchio indicano i siti di restrizione di *StuI*. I frammenti generati dalla digestione enzimatica sono indicati con f1, f2 e f3. Questa nomenclatura è utilizzata anche nei riquadri B,C e E per identificare le bande. La taglia di ciascun frammento è riportata nel riquadro A. Le linee nere spesse presenti nella parte superiore del riquadro A indicano la localizzazione genomica delle sonde radiomarcate. B) Analisi Southern Blot eseguita nel paziente 2 (p2) e in un controllo normale di sesso femminile (c). I DNA sono stati digeriti con l'enzima *StuI* e rivelati con la sonda per l'esone 7 del gene *DCX*. La banda anomala (f3Δ) presente nel paziente 2 indica una delezione di circa 0,7 Kb. C) Analisi Southern Blot eseguita nel paziente 2 (p2) e in due controlli normali (c♂ e c♀). I DNA sono stati digeriti con l'enzima *HindIII* e sono stati rilevati con le sonde per l'esone 4 e 6 del gene *DCX* simultaneamente. D) Analisi densitometrica delle bande ottenute dal Southern Blot mostrate nel riquadro C). L'intensità della banda f2 (corrispondente all'esone 6) è stata normalizzata utilizzando come riferimento la banda f1 (corrispondente agli esoni 3 e 4) noti essere non deleti nel paziente 2. Il rapporto f2/f1 è stato calcolato per il paziente 2 e per i controlli normali. Dai rapporti f2/f1 ottenuti dai controlli è stata calcolata la media (mean f2/f1). Il rapporto f2/f1 di ciascun individuo è stato diviso con il valore del rapporto mean f2/f1. I valori ottenuti sono stati riportati sul grafico. Il paziente 2 mostra un valore pari a circa la metà di quello ottenuto dai controlli, indicando la delezione eterozigote dell'esone 6. E) Analisi Southern Blot eseguita nel paziente 3 (p3) e in due controlli normali (c♀ e c♂). I DNA sono stati digeriti con *HindIII* e sono stati rilevati simultaneamente con le sonde per l'esone 4 e 6 del gene *DCX*. F) Analisi densitometrica delle bande ottenute dall'analisi Southern Blot mostrate nel pannello E. In modo similare a quello descritto per il riquadro D, l'intensità della banda f1 (corrispondente agli esoni 3 e 4) è stata normalizzata utilizzando come riferimento la banda f2 (corrispondente all'esone 6) note essere non deleta nel paziente 3. Il paziente 3 ha evidenziato un valore pari a circa la metà di quello ottenuto dai controlli, indicando la delezione degli esoni 3 e 4 in eterozigosi.

3.7.3 Paziente 3

Il paziente 3 era una ragazza di 15 anni con lieve ritardo motorio e del linguaggio e ritardo mentale. Dall'età di 6 anni sono insorte crisi epilettiche intrattabili sotto forma di assenze atipiche e attacchi gravi di tipo Lennox-Gastaut. La risonanza magnetica mostrava SBH diffusa con gradiente P>A (Fig. 3.17E). L'analisi mediante MLPA ha identificato una delezione degli esoni 3, 4 e 5 di *DCX* (Fig. 3.17F). L'analisi mediante SQF-PCR ha confermato la delezione (Tabella 3.6). L'analisi mediante Southern Blot non mostrava bande anomale significativamente visibili ma questo era dovuto al fatto che la banda deleta era troppo grande. In ogni modo la delezione è stata confermata mediante quantificazione densitometrica delle bande del Southern Blot (Fig. 3.18A, 3.18E, 3.18F).

3.7.4 Paziente 4

Il paziente 4 era un maschio di 2 anni che presentava ritardo dello sviluppo fin dalla prima infanzia. Dall'età di 6 mesi sono insorte crisi epilettiche focali e spasmi infantili. La risonanza magnetica mostrava lissencefalia diffusa con indentazione rudimentale nei lobi occipitali mesiali (Fig. 3.19A e 3.19B). L'analisi mediante PCR non amplificava gli esoni 3 e 4 di *DCX* suggerendo una delezione in emizigosi (Fig. 3.19C). La delezione dell'esone 3 e 4 in questo paziente è stata confermata mediante MLPA (Fig. 3.19D).

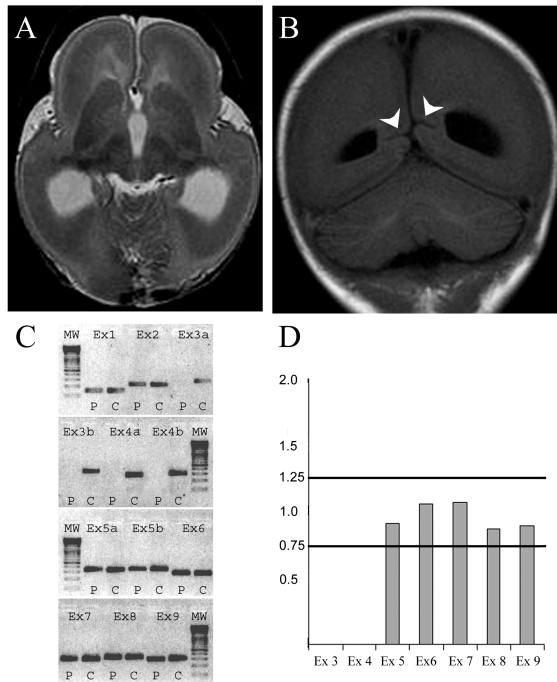


Figura 3.19. Immagine di risonanza magnetica del paziente 4: A) Lissencefalia diffusa grave lobi frontali relativamente piccoli, B) Indentazione rudimentale dei solchi (frecche bianche) limitata ai lobi mesiali occipitali. C) Elettroforesi su gel dei prodotti di PCR degli esoni di DCX nel paziente 4 (p) e in un controllo normale. E' possibile osservare che per il paziente 4 non è presente amplificazione degli esoni 3 e 4. D) Analisi di MLPA nel paziente 4 che conferma la delezione degli esoni 3 e 4 di DCX. Gli esoni di DCX sono riportati sull'asse delle X. Le linee orizzontali spesse indicano il valore soglia inferiore e superiore per assumere una duplicazione (>1.25) o una delezione (<0.75).

3.8 Analisi mediante DHPLC di pazienti con Polimicrogiria bilaterale frontoparietale (BFPP)

All'interno della nostra coorte di pazienti con BFPP abbiamo identificato 3 famiglie in cui era presente consanguineità e in cui i probandi presentavano BFPP associata a sindrome di Lennox-Gastaut (Fig. 3.20).

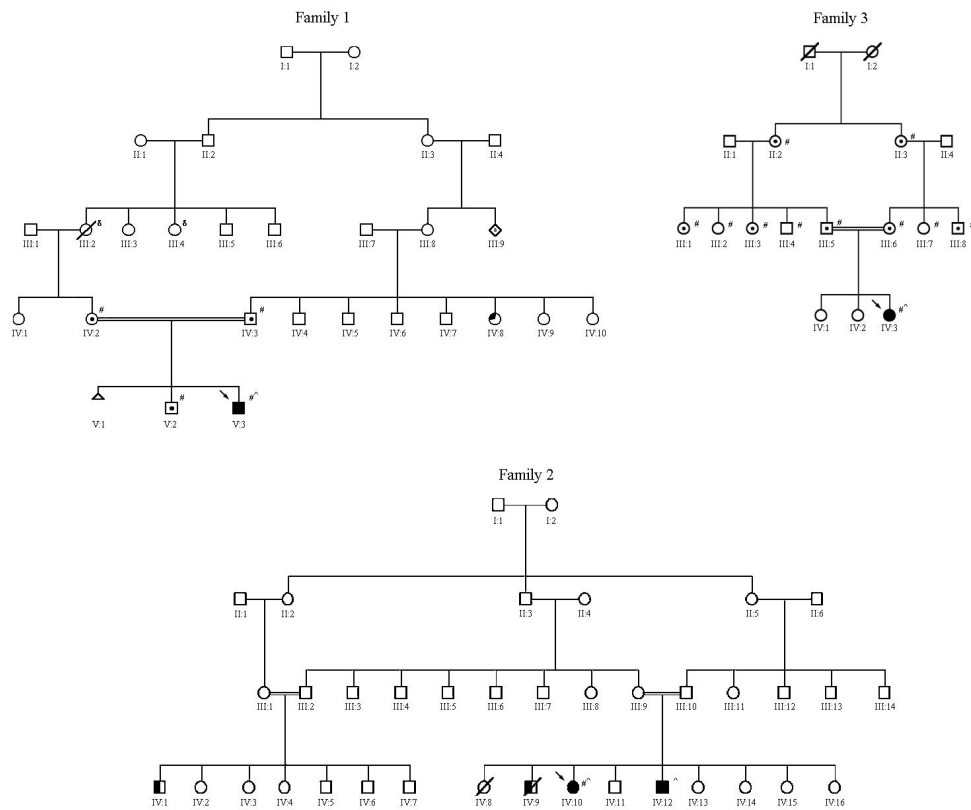


Figura 3.20. Alberi genealogici delle tre famiglie in cui i probandi presentavano mutazioni di *GPR56*

3.8.1 Paziente 1

Il probando (1-V:3) (Fig. 3.20) era un maschio italiano di 19 anni con storia familiare di convulsioni febbrili. I genitori del paziente erano cugini di primo grado. Il bambino presentava un ritardo motorio e del linguaggio fin dalla prima infanzia e un ritardo mentale moderato o grave con tetraplegia spastica. All'esame neurologico presentava strabismo convergente dell'occhio sinistro, stazione eretta su base allargata, ipertono, iper-reflessia e Babinski positivo. La circonferenza cranica all'età di 19 anni era di 54cm (minore del cinquantesimo percentile). La prima convulsione febbrile è insorta all'età di un anno mentre assenze atipiche sono insorte all'età di 2 anni. Crescendo il bambino ha sviluppato crisi atoniche plurigiornaliere farmacoresistenti in associazione con crisi toniche e tonico-cloniche. Dall'età di 8 anni si sono presentati

diversi episodi di stato epilettico non convulsivo. Le crisi sono evolute in una sindrome di Lennox–Gastaut. Al momento dello studio il bambino presentava crisi toniche e tonico-cloniche generalizzate intrattabili. Il monitoraggio EEG durante il sonno ha mostrato numerose crisi toniche correlate al sonno. La risonanza magnetica presentava BFPP (Fig. 3.21A).

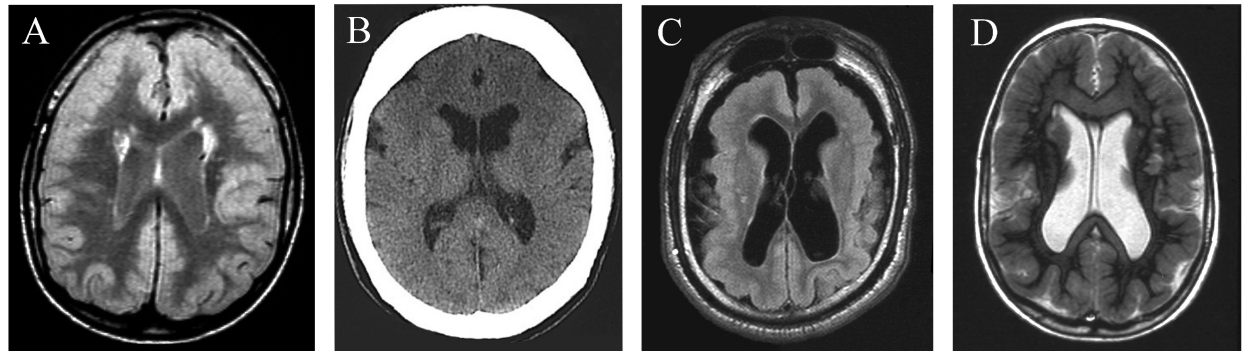


Figura 3.21. Immagini di risonanza magnetica del paziente 1 (1-V:3) (A); del paziente 2 (1-IV:9) (B) e del fratello (2-IV:12) (C); e del paziente 3 (3-IV:3) (D).

L'analisi mediante DHPLC effettuata nel paziente 1-V:3 evidenziava una alterazione del picco cromatografico nell'esone 12. E' stato quindi effettuato un sequenziamento diretto che ha portato all'identificazione di un cambio nucleotifico c.1693C>T (Fig. 3.22) che determinava una sostituzione aminoacidica R565W nel secondo dominio extracellulare di GPR56 (Fig. 3.23). L'analisi di sequenza dell'esone 12 effettuata su entrambi i genitori del probando (1-IV:2 e 1-IV:3) mostrava che erano entrambi eterozigoti per la mutazione R565W in accordo con il modello di ereditarieta' autosomica recessiva della BFPP.

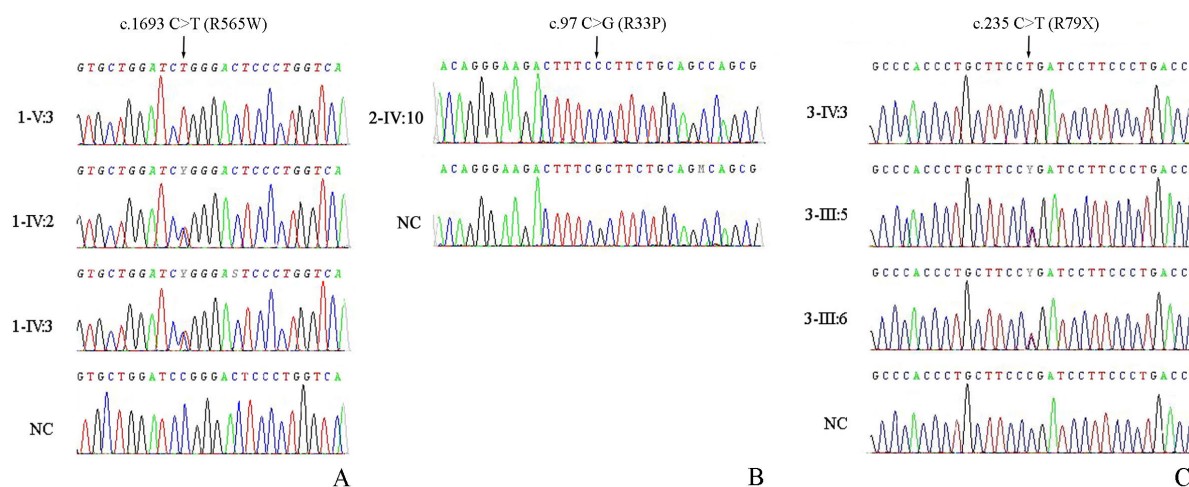


Figura 3.22. Elettroferogrammi di sequenza corrispondenti alle mutazioni ritrovate nel paziente 1 (c.1693C>T, R565W), nel paziente 2 (c.97C>G, R33P) e nel paziente 3 (c.235C>T, R79X) e nei genitori dei pazienti 1 e 3. NC= normal control

3.8.2 Paziente 2

Il probando (2-IV:10) (Fig. 3.20) era una donna di 27 anni nata da genitori di origine turca che erano cugini di primo grado. Un fratello della probanda (2-IV:9), morto nei primi anni di età, e un cugino materno (2-IV:1) presentavano ritardo mentale ed epilessia non classificata. Nella probanda e in un altro fratello affetto (2-IV:12) di 32 anni lo sviluppo cognitivo e del linguaggio erano ritardati. L'esame neuroradiologico nel fratello affetto del probando evidenziava strabismo e nistagmo alternante. Non erano presenti segni piramidali in entrambi i fratelli. All'età di 5 anni sono insorte crisi generalizzate nella probanda che con la crescita sono evolute in sindrome di Lennox-Gastaut. Al momento dello studio presentava assenze atipiche, crisi toniche e tonico-cloniche. Nel fratello affetto (2-IV:12) l'epilessia è insorta all'età di 8 anni con crisi parziali complesse e secondarie generalizzate. A 30 anni ha avuto un episodio di stato epilettico non convulsivo. La TAC della probanda e la risonanza magnetica del fratello mostravano BFPP che si estendeva in maniera simmetrica dai lobi frontali fino al solco parieto-occipitale (Fig. 3.21B e C).

L'analisi mediante DHPLC effettuata nel paziente 2-IV:10 evidenziava una alterazione del picco cromatografico nell'esone 2. E' stato quindi effettuato un sequenziamento diretto che ha portato all'identificazione di un cambio nucleotifico c.97C>G (Fig. 3.22) che determinava una sostituzione aminoacidica R33P nel dominio extracellulare N-terminale di GPR56 (Fig. 3.23).

3.8.3 Paziente 3

Il probando (3-IV:3) (Fig. 3.20) era una bambina italiana di 13 anni nata in seguito ad una gravidanza e ad un parto senza complicazioni. I genitori del paziente erano cugini di primo grado. Dalla prima infanzia presentava ritardo motorio e del linguaggio e ritardo mentale grave. L'esame neurologico ha evidenziato aumento del tono agli arti inferiori, iper-reflessia, stazione eretta su base allargata e Babinski negativo. Inoltre presentava esotropia alternante, piu' evidente all'occhio destro e nistagmo. La circonferenza cranica all'eta' di 11 anni era di 52cm (minore del cinquantesimo percentile). All'eta' di due anni e' insorta la prima crisi epilettica. Negli anni successivi ha sviluppato crisi toniche e tonico-cloniche generalizzate plurigiornaliere farmacoresistenti. Al momento dello studio la paziente presentava crisi toniche o tonico-cloniche generalizzate. La risonanza magnetica mostrava BFPP (Fig. 3.21D).

L'analisi mediante DHPLC effettuata nel paziente 3-IV:3 evidenziava una alterazione del picco cromatografico nell'esone 2. E' stato quindi effettuato un sequenziamento diretto che ha portato all'identificazione di un cambio nucleotifico c.235C>T (Fig. 3.22) che determinava una sostituzione aminoacidica R79X nel dominio extracellulare N-terminale di GPR56 (Fig. 3.23). L'analisi di sequenza dell'esone 2 effettuata su entrambi i genitori del probando (3-III:5 e 3-III:6) mostrava che erano entrambi eterozigoti per la mutazione R79X in accordo con il modello di ereditarieta' autosomica recessiva della BFPP.

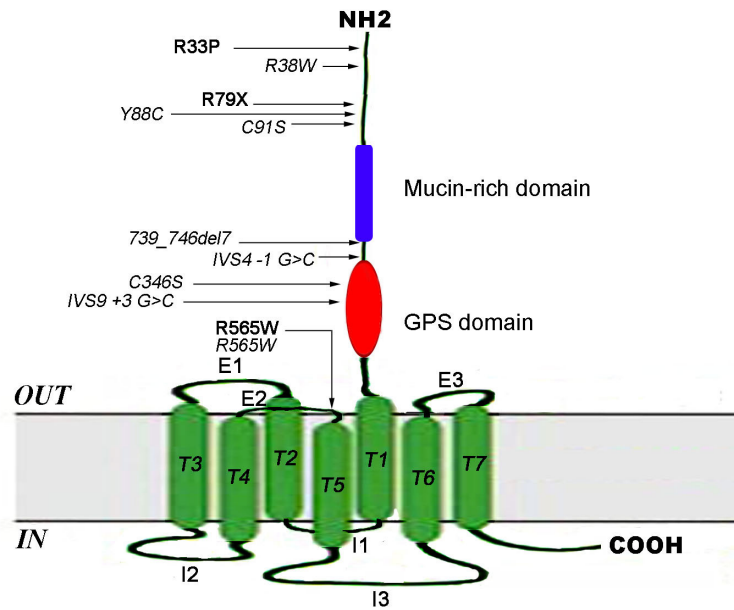


Figura 3.23. Rappresentazione schematica della proteina GPR56 con indicate le mutazioni note piu' le mutazioni (R565W, R33P e R79X) ritrovate nei nostri 3 pazienti (in grossetto). E = dominio extracellulare, I = dominio intracellulare, T = dominio transmembrana.

DISCUSSIONE

Il principale scopo di questo elaborato è stato quello di studiare da un punto di vista clinico, neuroradiologico e molecolare pazienti con malformazioni della corteccia cerebrale. Abbiamo selezionato quattro gruppi di pazienti con le principali malformazioni corticali studiate nel nostro laboratorio: pazienti con eterotopia nodulare periventricolare, pazienti con lissencefalia, pazienti con eterotopia a banda sottocorticale e pazienti con polimicrogiria bilaterale fronto-parietale ed abbiamo effettuato studi di correlazione genotipo-fenotipo in queste quattro casistiche.

4.1 Eterotopia nodulare periventricolare

Nel nostro studio abbiamo esaminato le caratteristiche cliniche e neuroradiologiche di 182 pazienti con eterotopia periventricolare (PH) ed abbiamo definito 15 classi diverse di questa malformazione (Tabella 3.1). La principale informazione ottenuta da questo studio è che la PH è una patologia estremamente eterogenea da un punto di vista clinico, neuroradiologico e genetico. Il maggior numero dei pazienti inclusi in questo studio presentava PH bilaterale classica (98 pazienti, 54%). Nella maggior parte delle altre 14 classi fenotipiche (84 pazienti, 46%) la PH era associata ad altre malformazioni corticali che includevano l'ipoplasia cerebellare, la polimicrogiria bilaterale fronto-perisilviana, la polimicrogiria bilaterale temporo-parieto-occipitale, l'idrocefalo e la microcefalia. Inoltre abbiamo identificato classi di pazienti in cui la PH era associata a difetti non neurologici quali la sindrome di Ehlers-Danlos (EDS), la displasia fronto-nasale, le anomalie degli arti, i genitali ambigui e la sindrome dell' X-fragile. Infine, abbiamo identificato alcuni sottogruppi di pazienti in cui la PH presentava un aspetto inusuale di tipo nodulare, unilaterale, laminare o “ribbon-like”.

4.1.1 Fenotipi associati con mutazioni di *FLNA*

FLNA è il principale gene associato a PH. In questo studio mutazioni in *FLNA* sono state associate principalmente con la eterotopia nodulare periventricolare (PNH) bilaterale classica e in maniera minore con la PNH unilaterale e la PNH associata a sindrome di Ehlers-Danlos (EDS). Sebbene la forma di PNH X-linked e quella sporadica siano state associate a mutazioni di *FLNA* la PH è una patologia geneticamente eterogenea. Questo è dimostrato dal fatto che esiste una forma di PNH associata a microcefalia e mutazioni del gene *ARFGEF2* (Sheen *et al.*, 2004a).

Nel nostro studio l'analisi di mutazione mediante DHPLC e sequenziamento diretto di 121 dei 182 pazienti selezionati ha portato all'identificazione di 25 mutazioni di *FLNA*, di cui 16 mai descritte prima. In accordo con i dati della letteratura il rapporto maschi/femmine di questi pazienti era sbilanciato a favore delle femmine: il 93% di pazienti con mutazione di *FLNA* erano femmine mentre il 7% erano maschi. Le mutazioni di *FLNA* sono state trovate in tutti i casi familiari con PNH bilaterale X-linked (8 famiglie con 22 individui affetti) e nel 26% dei casi sporadici. Complessivamente, la probabilità di identificare una mutazione in un individuo con PNH bilaterale classica era del 49%, ma tale probabilità scendeva al 4% in pazienti con altri fenotipi, indipendentemente dal fatto che fossero casi familiari o sporadici (casi con PNH unilaterale o con PNH associata a EDS). Quindi la causa della PH rimaneva sconosciuta per il 51% dei pazienti con PNH bilaterale classica e per il 96% dei pazienti con altri fenotipi, confermando l'eterogeneità genetica di questa patologia. Noi ipotizziamo che anche la PH dei pazienti senza mutazioni in *FLNA* abbia su base genetica in quanto sono stati riportati altri loci (dup 5p15.1 e dup15.33) e geni (*ARFGEF2*) associati a PH (Sheen *et al.*, 2003b; Sheen *et al.*, 2004a; Wieck *et al.*, 2005).

Precedentemente era stata descritta una famiglia con PH unilaterale e mutazione missenso di *FLNA* (S149P) (Famiglia 2 in Guerrini *et al.*, 2004). Avevamo ipotizzato che in questa famiglia il fenotipo non grave del padre e la trasmissione da padre a figlia erano dovuti ad una lieve alterazione funzionale della proteina *FLNA*.

Inoltre erano stati riportati precedentemente casi di PNH e EDS in cui i pazienti erano portatori di mutazioni di *FLNA* (Sheen *et al.*, 2005). Nel nostro studio abbiamo

identificato una delezione di *FLNA* (c.4038delG) in una famiglia (Famiglia 5) in cui la probanda (5-II.2) presentava PNH e EDS mentre la madre (5-I.2) presentava solo PNH bilaterale classica. Questo suggeriva che le caratteristiche cliniche della EDS possono riflettere una espressività variabile dovuta, molto probabilmente, a fattori di modificazione genetica. Inoltre questa eterogeneità clinica della EDS può essere dovuta a una inattivazione sbilanciata del cromosoma X sia nella madre che nella figlia o alla presenza di mosaicismo somatico nella madre. L'associazione tra PNH e EDS offre nuove prospettive nella patogenesi molecolare di EDS. Le diverse tipologie di EDS sono state associate con alterazioni nel legame e adesione delle fibrille di collagene alla matrice extracellulare (Sheen *et al.*, 2005). E' stato dimostrato che *FLNA* si lega ai recettori di adesione cellulare della beta integrina e questa interazione potrebbe essere coinvolta nella migrazione cellulare (Sharma *et al.*, 1995; Calderwood *et al.*, 2001). Una adesione cellulare non corretta causata da mutazioni di *FLNA* potrebbe quindi essere responsabile sia dei difetti del tessuto connettivo osservati nella EDS sia della mancata migrazione neuronale tipica della PNH. Complessivamente solo 3 sui 40 pazienti con mutazione di *FLNA* (7.5%) riportati in questo studio presentavano EDS oltre alla PNH. Le mutazioni identificate in questi pazienti non andavano a localizzarsi in una specifica regione di *FLNA*. Inoltre il fatto che la maggior parte dei pazienti con fenotipo PNH-EDS non abbia mutazioni in *FLNA* (Sheen *et al.*, 2005) rende ancora difficile da spiegare la causa genetica del fenotipo PNH-EDS.

Il nostro studio porta a 42 il numero di tutte le mutazioni descritte fino ad oggi nei pazienti con PNH. La prevalenza di mutazioni nel dominio di legame all' Actina era significativamente alta (14 su 42 in 904 nucleotidi) ($p < 0.05$) se confrontata con la prevalenza di mutazioni negli altri domi della proteina (28 su 42 in 7957 nucleotidi) ($p > 0.05$). Questo risultato indica che il dominio di legame all' Actina rappresenta una regione "hotspot" per mutazioni di *FLNA* associate a PNH. Per questo motivo suggeriamo di effettuare l'analisi di mutazione del gene partendo dagli esoni che codificano per il dominio di legame all' Actina.

E' stato dimostrato che mutazioni in alcune regioni di *FLNA* sono associate ad altre patologie. In particolare mutazioni missenso nel dominio CH2 e nelle ripetizioni 3, 10, 14/15 del rod domain della proteina sono state trovate in maschi con sindrome oto-

palato-digitale di tipo 1 o di tipo 2 (OPD1 o OPD2). Nessuna mutazione associata a OPD1 o OPD2 era localizzata nel dominio CH1 della proteina (Robertson *et al.*, 2003). Le 4 mutazioni missenso che noi abbiamo identificato in pazienti con PNH erano localizzate nel dominio CH1 e nessuna nel CH2. Complessivamente, non è stata trovata nessuna mutazione missenso nel dominio CH2 di FLNA in pazienti con PNH. Queste osservazioni confermano che le mutazioni missenso nel dominio CH1 di FLNA determinano perdita di funzione della proteina in pazienti con PNH, mentre mutazioni missenso nel dominio CH2 causano una acquisizione di funzione nei pazienti con sindrome OPD (Robertson *et al.*, 2003).

In tutti i casi descritti fino ad oggi solo 9 delle 43 mutazioni di *FLNA* associate a PNH erano di tipo missenso suggerendo che le mutazioni che causano interruzione della proteina sono la principale causa del fenotipo PNH. L'opposto si ha nella sindrome OPD in cui la principale causa della patologia sono mutazioni missenso (Robertson *et al.*, 2003). Queste osservazioni confermano che diversi meccanismi patogenetici sono alla base dei due diversi fenotipi.

In generale, per quanto riguarda la correzione genotipo-fenotipo sembra che si possa ipotizzare una correlazione tra la gravità delle mutazioni di *FLNA* e il fenotipo di PNH associato. Nel nostro studio non abbiamo osservato grandi differenze tra il tipo e la localizzazione delle mutazioni e il fenotipo dei pazienti con le diversi mutazioni. Una eccezione è rappresentata dal fatto che le mutazioni missenso germinali e le mutazioni troncanti distali sono compatibili con la sopravvivenza dei maschi affetti mentre le inserzioni, le delezioni o le mutazioni troncanti prossimali sono letali per i maschi. Probabilmente la parziale funzionalità della proteina che rimane quando si ha la prima tipologia di mutazioni è compatibile con la vita (Sheen *et al.*, 2001). Anche il mosaicismo somatico è un fenomeno che può attenuare la gravità del fenotipo nei pazienti con PNH.

4.1.2 PNH bilaterale classica non associata a mutazioni di *FLNA*

La PNH bilaterale classica è stata osservata in 37 (51%) dei pazienti da noi studiati in cui mutazioni di *FLNA* non erano state identificate. Questi pazienti non

mostravano differenze cliniche e neuroradiologiche rispetto a quelli con mutazione di *FLNA*. Per i pazienti con PNH bilaterale classica e senza mutazioni di *FLNA* è possibile che altri meccanismi possano spiegare il fenotipo: mutazioni in regioni non codificanti, delezioni o duplicazioni che coinvolgono uno o più esoni di *FLNA* oppure riarrangiamenti cromosomici criptici che coinvolgono *FLNA*.

Il rapporto maschi/femmine in questo gruppo di pazienti era sbilanciato a favore dei maschi ($p=0.013$) suggerendo che un gene alternativo recessivo sul cromosoma X potrebbe avere un ruolo nel determinare il fenotipo di questi pazienti. In ogni modo non si può escludere che questo sbilanciamento sia dovuto al fatto che generalmente vengono studiati i maschi in quanto, avendo un quadro clinico più grave, è più probabile che arrivino all'attenzione medica.

4.1.3 Principali fenotipi non associati a mutazioni di FLNA

Nessun paziente appartenente alle classi fenotipiche di cui parleremo di seguito aveva una mutazione in *FLNA*. Questo dato ci fa ipotizzare che altri geni sono probabilmente responsabili dei diversi fenotipi. Tra i pazienti con PNH bilaterale associata a difetti non neurologici almeno 4 gruppi erano abbastanza omogenei e sufficientemente grandi da poter essere considerati come nuove sindromi.

PNH posteriore bilaterale con malformazioni dell'ippocampo e ipoplasia cerebellare. Questa forma di PNH rappresenta una nuova sindrome trovata soprattutto nelle femmine. Il quadro neuroradiologico di questi pazienti è diverso da quello dei pazienti con PNH bilaterale classica. La principale differenza è che la localizzazione dei noduli eterotopici nella forma classica è diffusa ma non si estende ai corni temporali e non circonda gli ippocampi. Nei pazienti di questo gruppo invece i noduli eterotopici sono in sede temporale e in particolare si trovano nella corteccia paraippocampale e nelle strutture temporali mesiali. Inoltre questi pazienti presentano ippocampi malrotati e un cervelletto fortemente ipoplastico. Una ipoplasia del verme cerebellare e una mega cisterna magna sono presenti anche nei pazienti con PNH classica associata a mutazioni di *FLNA* (Fox *et al.*, 1998) ma non sono mai gravi come nei pazienti di questo gruppo;

infatti per molti di questi pazienti sono stati proprio i segni cerebellari gravi a fare eseguire la risonanza magnetica. Il livello cognitivo e il tipo di epilessia di questi pazienti non differivano molto rispetto a quelli con PNH bilaterale classica.

PNH bilaterale posteriore con idrocefalo Questa forma di PNH è stata osservata in sette pazienti, la maggior parte dei quali presentava ritardo dello sviluppo grave ed epilessia. Il rapporto maschi/femmine era bilanciato e ciò suggeriva un modello di ereditarietà autosomica. Sheen *et al.*, (2004b) avevano riportato una debole associazione con il cromosoma Xq28 in una famiglia ma non era stata trovata nessuna mutazione né in *FLNA* né in *LICAM* (L1 cell adhesion molecule), un gene associato a idrocefalo, sindrome di Hirschsprung e agenesia del corpo calloso. Sembra che il fenotipo della forma PNH-idrocefalo sia abbastanza omogeneo, mentre la sua base genetica sia eterogenea.

PNH bilaterale con displasia fronto-nasale Questa forma di PNH è stata osservata in sei maschi sporadici e in una femmina con ritardo mentale ed epilessia. Due di questi pazienti erano due maschi descritti precedentemente da Guerrini e Dobyns (1998). I cinque pazienti descritti in questo studio confermano la specificità della sindrome e portano a ottop il numero totale di pazienti con questa forma di PNH (7 riportati nel nostro studio e 1 descritto da Guion-Almeida e Richieri-Costa nel 1999).

PNH bilaterale con anomalie degli arti Questa forma di PNH è stata osservata in sei pazienti con ritardo mentale e due con epilessia. La gravità delle anomalie degli arti variava da una notevole riduzione degli arti con perdita totale o parziale delle falangi fino a sindattilia. Tutti i pazienti in questo gruppo erano sporadici con un rapporto maschi/femmine bilanciato, facendo presupporre un modello di ereditarietà autosomica. I geni che regolano lo sviluppo degli arti possono essere interessanti candidati per questo fenotipo. Tra questi ricordiamo WNT-3A, WNT-1 e WNT-7A, membri del pathway di trasduzione del segnale di WNT (Pinson *et al.*, 2000), LPR6, una proteina “LDL-receptor-related” (Pinson *et al.*, 2000) e FGF4 e FGF8, coinvolti nella trasduzione del segnale dell' FGF (fibroblast growth factor) dall' ectoderma apicale (Lewandoski *et al.*, 2000). In particolare FGF8 è un forte candidato poichè è stato

dimostrato che è coinvolto nel patterning della neocorteccia (Fukuchi-Shimogori e Grove, 2003).

4.1.4 Fenotipi minori di PH

Abbiamo identificato inoltre 5 rari fenotipi di PH. Non abbiamo identificato mutazioni di *FLNA* in nessuno di questi gruppi. I nostri risultati confermano anche in questo caso l'eterogeneità fenotipica e genotipica della PH.

La sindrome dell' X Fragile è stata diagnosticata in due maschi con PH isolata e mutazioni nel gene *FMRI*, facendo ipotizzare un possibile ruolo di questo gene nella migrazione neuronale. Le forme di PH bilaterale micronodulare e di PNH bilaterale con genitali ambigui sono state osservate solo in tre pazienti e quindi sono difficili da caratterizzare. La PH lineare diffusa è stata trovata in pazienti che presentavano anche un ampio ispessimento della corteccia suggerendo un più ampio difetto di migrazione neuronale. La PH con aspetto “Ribbon-like” è una forma di PH che coinvolge solo un sottogruppo di neuroni che migrano; questi neuroni, sebbene ricevano le informazioni genetiche per assemblarsi in un pattern di circonvoluzioni che ricorda quello della corteccia, non sono capaci di raggiungere la loro destinazione definitiva.

4.1.5 Mosaicismo somatico in pazienti con PNH

Nella nostra casistica di pazienti con PH abbiamo identificato due pazienti sporadici, una femmina e un maschio, portatori di due diverse mutazioni del gene *FLNA* presenti sotto forma di mosaico somatico.

Il mosaicismo somatico è un meccanismo genetico per cui un individuo possiede due o più linee cellulari geneticamente differenti tra di loro ma derivanti tutte da un unico zigote. Questo fenomeno è generalmente presente nelle patologie in cui si ha una elevata percentuale di mutazioni *de novo*. Recentemente è stata dimostrata la presenza di tale meccanismo genetico in pazienti portatori di mutazioni dei geni *LISI* o *DCX*,

entrambi responsabili di disturbi della migrazione neuronale (Kato *et al.*, 2001; Sicca *et al.*, 2003; Gleeson *et al.*, 2000c)

In passato, Sheen e collaboratori (2001) hanno ipotizzato che il mosaicismismo somatico sia stato in grado di permettere la nascita e la sopravvivenza di due individui di sesso maschile con eterotopia periventricolare anche se non sono mai riusciti a dimostrare con una analisi molecolare la presenza del mosaicismismo in tali pazienti. Probabilmente ciò è dovuto al fatto che mutazioni sotto forma di mosaico sono generalmente rare; inoltre Sheen e collaboratori (2001) hanno utilizzato l'SSCP per l'analisi di mutazione, una metodica con una sensibilità non molto alta, in grado di individuare non più dell'80% di mutazioni in un gene e incapace di identificare un allele mutato presente in una percentuale inferiore al 25%.

L'elevata sensibilità e la natura quantitativa della metodica DHPLC ci hanno indirizzato verso il suo utilizzo nella caratterizzazione molecolare di due casi di mosaicismismo somatico del gene *FLNA*. In entrambi i casi abbiamo effettuato uno studio basato sull'associazione di una metodica di SNUPE con la DHPLC completamente denaturante.

Il primo paziente presentato in questo elaborato (Paziente 1) è una femmina con un fenotipo clinico meno grave di quello che generalmente caratterizza le donne portatrici di una mutazione di *FLNA* a livello della linea germinale; la paziente 1 ha infatti completato l'educazione universitaria, ha una epilessia farmacologicamente controllata e presenta alla risonanza magnetica noduli eterotopici piccoli e non contigui piuttosto che quelli caratteristici (spessi e ravvicinati). La mutazione identificata nella paziente (c.568_569insG) determina una alterazione del modulo di lettura con conseguente formazione di un codone di terminazione a livello dell'aminoacido 161. Il risultato di tale alterazione è un'interruzione precoce della proteina a livello della regione N-terminale che si presuppone abbia gravi conseguenze a livello funzionale. L'analisi di sequenza effettuata sul prodotto di PCR corrispondente all' esone 3, che al DHPLC presentava un profilo cromatografico alterato, mostrava un elettroferogramma dell'allele mutato molto più basso rispetto a quello dell'allele wild-type suggerendo che la mutazione fosse presente sotto forma di mosaico somatico. L'analisi SNUPE associata con la DHPLC effettuata su un prodotto di PCR derivante da DNA di origine leucocitaria (origine mesodermica) ha mostrato una presenza del 17% di allele mutante.

Ripetendo l'analisi su 96 cloni derivanti dallo stesso prodotto di PCR abbiamo ottenuto che 14 cloni su 96 (14.6%) portavano l'allele mutato confermando il risultato ottenuto con la SNuPE-DHPLC. Tali risultati indicavano che la mutazione era insorta dopo la fertilizzazione e non era quindi presente in tutte le cellule della paziente.

Il paziente 2, un maschio con fenotipo di eterotopia periventricolare classica, simile a quello osservato nelle femmine, è risultato essere mosaico somatico per una sostituzione nucleotidica A>G nel sito accettore di splicing dell'introne 11. Questa mutazione può alterare la stabilità dell'RNA messaggero, oppure determinare la formazione di una proteina tronca a causa della ritenzione, durante lo splicing, dell'introne, con conseguente traduzione di quest'ultimo fino al raggiungimento della prima tripletta di stop. L'analisi SNuPE associata con la DHPLC ha mostrato la presenza del 42% di allele mutante nel DNA di origine leucocitaria (origine mesodermica) e del 69% nel DNA proveniente da un pool di bulbi di capello (origine ectodermica). Dancis e collaboratori (1981) hanno proposto, sulla base di studi biochimici, che le cellule che compongono ogni singolo bulbo di capello originano da tre comuni progenitori. Secondo questa teoria, nel caso di un maschio mosaico per una mutazione in un gene localizzato sul cromosoma X, i tre progenitori possono concorrere alla formazione, nel bulbo maturo, di cellule che analizzate nel loro insieme rientrano in quattro categorie: nessun progenitore mutato (0% di allele mutante), un solo progenitore mutato (33% di allele mutante), due progenitori mutati (66% di allele mutante) o tre progenitori mutati (100% di allele mutante). Recentemente Kato e collaboratori (2001) hanno dimostrato la presenza di una mutazione sotto forma di mosaico del gene *DCX*, localizzato sul cromosoma X. Analizzando diversi bulbi di capello sono riusciti ad identificare, utilizzando un'enzima di restrizione ed un'analisi quantitativa mediante densitometria su gel di agarosio, le quattro possibili combinazioni generate secondo lo schema descritto in precedenza. L'analisi SNuPE-DHPLC effettuata su 7 singoli bulbi di capello del paziente 2 ha evidenziato quattro diverse proporzioni di allele mutante. I piccoli discostamenti dal valore atteso sono dovuti probabilmente a contaminazioni di cellule epidermiche campionate insieme al bulbo che vengono rilevate dalla elevata sensibilità della metodica. L'assenza di allele mutante identificata in un bulbo indica chiaramente che la mutazione non è presente in tutti i tessuti di origine ectodermica. Il mosaicismo è confermato anche dalla presenza di una figlia sana, non portatrice della

mutazione, che ha ereditato dal padre il cromosoma X proveniente dalla popolazione cellulare germinale normale.

La dimostrazione mediante SNuPE-DHPLC della presenza di mosaicismi somatico nei due pazienti suggerisce che la coesistenza di cellule mutate e cellule normali possa essere uno dei meccanismi capaci di spiegare il fenotipo non grave di alcuni pazienti così come la sopravvivenza di maschi con mutazioni di *FLNA* che probabilmente sarebbero morti in età prenatale se portatori della mutazione in tutte le cellule.

Il mosaicismi somatico è quindi un meccanismo che in parte può spiegare la bassa percentuale di mutazioni identificate nei casi sporadici (15%) rispetto ai casi familiari (87.5%) anche se tale risultato può essere determinato oltre che da riarrangiamenti cromosomici comprendenti la regione Xq28 e da delezione di interi esoni non identificabili mediante DHPLC anche da mutazioni in altri geni non ancora associati all'eterotopia periventricolare.

I risultati da noi ottenuti in questo studio rappresentano la dimostrazione di come la metodica DHPLC sia una valida tecnica da utilizzare quando si deve effettuare uno screening rapido e sensibile di un gene di grandi dimensioni come *FLNA* in un numero di individui elevato. Inoltre, se la DHPLC è associata a reazioni di PCR condotte utilizzando una DNA polimerasi proof reading, tale metodica si rivela di grande utilità anche per l'identificazione e la caratterizzazione di mutazioni sotto forma di mosaico somatico.

Infine il nostro studio, grazie all'identificazione di pazienti con mutazioni di *FLNA* presenti sotto forma di mosaico somatico, ha modificato in parte la consulenza genetica dell'eterotopia periventricolare. Generalmente in casi familiari di eterotopia periventricolare X-linked causati da mutazioni nel gene *FLNA* il rischio per le donne affette di trasmettere la mutazione ai figli è del 50%. Tale percentuale scende notevolmente se la donna è portatrice della mutazione sotto forma di mosaico. Recentemente abbiamo riportato che anche un maschio affetto da eterotopia periventricolare può trasmettere mutazioni di *FLNA* (Guerrini *et al.*, 2004) secondo il modello di ereditarietà X-linked a tutte le figlie femmine. I risultati da noi ottenuti nel paziente 2 mettono in evidenza invece che, se un individuo maschio è portatore della

mutazione sotto forma di mosaico, le figlie possono ereditare l'allele wild-type dal padre e quindi non essere obbligatoriamente affette da eterotopia periventricolare.

4.2 Lissencefalia

L'utilizzo sistematico della risonanza magnetica ha permesso di chiarire lo spettro malformativo della lissencefalia-pachigiria e può essere di notevole aiuto nell'indirizzare un paziente ad una corretta analisi genetica in base al quadro malformativo che presenta. Un gradiente malformativo più grave in sede posteriore (P>A) è osservato nei pazienti con lissencefalia associata a mutazioni del gene *LIS1* anche se recentemente è stato dimostrato che pazienti con mutazioni nel gene *TUBA1A* presentano lo stesso pattern malformativo (Keays *et al.*, 2007; Poirier *et al.*, 2007). In ogni modo lo spettro della lissencefalia-pachigiria associata a mutazioni di *TUBA1A* non è ancora ben definito (Keays *et al.*, 2007; Poirier *et al.*, 2007). Anche la lissencefalia X-linked associata a genitali ambigui (XLAG) e causata da mutazioni nel gene *ARX* presenta delle caratteristiche di gradiente P>A, anche se questa forma di lissencefalia si distingue facilmente dalle altre per la presenza delle malformazioni extra-neurologiche (Kato *et al.*, 2004). Quindi possiamo affermare che *LIS1* è il principale gene che è noto essere associato con un pattern di lissencefalia P>A.

I dati della letteratura indicavano che la percentuale di alterazioni che coinvolgevano *LIS1* variava dal 60% nella lissencefalia isolata fino al 100% nella sindrome di Miller-Dieker (MDS) (Cardoso *et al.*, 2002). Nella nostra coorte di 45 pazienti con lissencefalia isolata e gradiente P>A, il 44% (20/45) presentava mutazioni di *LIS1* in seguito a sequenziamento diretto. La successiva analisi di MLPA effettuata nei rimanenti 25 pazienti ha portato all'identificazione di delezioni/duplicazioni genomiche di *LIS1* nel 76% (19/25) dei casi. L'utilizzo di questa nuova metodica faceva salire la percentuale di pazienti in cui poteva essere dimostrata una alterazione di *LIS1* dal 44% all'87%. Nel paziente P6 abbiamo identificato mediante MLPA la prima duplicazione descritta che comprendeva gli esoni 3,4 e 5 di *LIS1*.

I nostri dati indicano che delezioni/duplicazioni di uno o più esoni di *LIS1* sono una causa frequente e sottostimata di lissencefalia con gradiente P>A e sono facilmente

identificabili mediante MLPA. In nessuno dei nostri pazienti le FISH disponibili in commercio avevano identificato alterazioni. Inoltre diverse delezioni che coinvolgevano un solo esone di *LIS1* (circa 2-3kb) non sarebbero state identificate neanche da FISH che utilizzano sonde specifiche per questo gene.

Considerando la sua alta resa diagnostica l'MLPA dovrebbe rappresentare la prima indagine da eseguire nei pazienti con lissencefalia con gradiente P>A. Il kit MLPA P061 che noi abbiamo utilizzato contiene diverse sonde che si legano a *LIS1* e ad altri geni nella regione 17p13.3. In particolare queste sonde si ibridano sia con i geni *YWHAE* (noto anche come *14-3-3 epsilon*), *HIC1* e *MGC3329* localizzati in posizione distale rispetto a *LIS1*, sia con i geni *KIAA0664*, *KIAA1039* e *TRPV1* localizzati in posizione prossimale rispetto a *LIS1*. L' MLPA rappresenta quindi una valida metodica che permette di identificare anche una sindrome da geni contigui quale la sindrome di Miller-Dieker (MDS).

Pazienti con lissencefalia p>a e mutazioni troncanti o frameshift che comprendevano il gene *LIS1* generalmente mostravano una gravità della malformazione di grado 2 e 3 con una prevalenza di grado 3 (Cardoso *et al.*, 2002; Uyanik *et al.*, 2007). I pazienti inclusi nel nostro studio con delezioni e duplicazione di *LIS1* presentavano anche loro lissencefalia di grado 2 e 3 ed in prevalenza di grado 3 (79%). Questa somiglianza nel pattern malformativo può essere spiegata dal fatto che le mutazioni troncanti e frameshift danno le stesse conseguenze funzionali delle delezioni/duplicazioni.

La caratterizzazione dei punti di rottura delle delezioni da noi effettuata ha mostrato che tali punti di rottura spesso erano localizzati negli elementi ripetitivi *Alu*. E' stimato che questi elementi *Alu* rappresentino il 10.6% dell'intero genoma umano e che siano rappresentati in circa un milione di copie per ogni genoma aploide (Mighell *et al.*, 1997; Rowold and Herrera, 2000; Batzer and Deininger, 2002). Tali ripetizioni sono disperse nel genoma ogni 3-4kb e hanno una omologia di sequenza che varia dal 70% al 98% (Mighell *et al.*, 1997; Rowold and Herrera, 2000; Batzer and Deininger, 2002). La distribuzione e l'elevata omologia delle sequenze *Alu* offre notevoli possibilità che avvenga una ricombinazione omologa tra di loro (Kolomietz *et al.*, 2001; Stenger *et al.*, 2001). E' stato ipotizzato che la ricombinazione tra sequenze *Alu* che causa delezioni è

più elevata in determinati geni che tendono quindi ad avere un numero più elevato di questi elementi ripetuti al loro interno (Deininger and Batzer, 1999). L'angioedema ereditario, l'alfa-talassemia, la sindrome di Sotos e la sindrome di Ehlers-Danlos sono alcuni esempi di patologie in cui le delezioni causate da ricombinazione tra ripetizioni *Alu* hanno un ruolo patogenetico (Baysal *et al.*, 2004). Questo meccanismo è stato descritto anche in alcuni casi familiari di cancro quali il cancro al seno, la poliposi colon-rettale ereditaria e l'epatoma non ereditario (Baysal *et al.*, 2004). Utilizzando il software Repeat Masker abbiamo visto che nella regione genomica di *LIS1* ci sono 122 copie di ripetizioni *Alu* che rappresentano il 35.04% dell'intera sequenza di *LIS1*. Questa percentuale da noi trovata è molto più alta del 10.6% che si ha normalmente nel genoma umano. Questo dato ci ha fatto ipotizzare che il gene *LIS1* sia più predisposto alla ricombinazione tra elementi *Alu* rispetto agli altri geni.

In tre dei pazienti (P11, P13 e P16) in cui abbiamo effettuato la caratterizzazione dei punti di rottura delle delezioni abbiamo visto che tali delezioni avvenivano tra ripetizioni *Alu* altamente omologhe che mostravano un identico orientamento genomico e una sequenza sovrapponibile a livello dei punti di rottura. Questi risultati suggerivano che il meccanismo più probabile di delezione in questi pazienti era una ricombinazione omologa non allelica (NAHR) tra elementi *Alu* (Deininger and Batzer, 1999; Batzer and Deininger, 2002). In un paziente (P3) i punti di rottura della delezione erano localizzati in 2 elementi *Alu* che mostravano un orientamento genomico identico; inoltre abbiamo identificato una sequenza di 24 nucleotidi inserita a livello dei punti di giunzione della regione deleta. Questa tipologia di sequenza appartiene alla famiglia dei DNA filler. I DNA filler rappresentano inserzioni casuali ai punti di rottura di riarrangiamenti cromosomici che vengono incorporati attraverso diversi meccanismi tra cui la riparazione non omologa (Roth *et al.*, 1989). In questo paziente la delezione è quindi causata da una ricombinazione omologa tra sequenze *Alu* seguita da una riparazione non omologa. Infine in un quinto paziente (P4), sebbene fosse presente un numero elevato di sequenze *Alu*, la delezione non era mediata da una NAHR tra queste sequenze ripetute. Si aveva invece un meccanismo di giunzione non omologa (NHEJ) dovuto al fatto che le sequenze che fiancheggiavano il punto di rottura non mostravano alta omologia e non erano sovrapponibili.

I risultati da noi ottenuti mostrano quindi che le delezioni e mutazioni di *LIS1* sono la principale causa di lissencefalia classica in pazienti con gradiente P>A. Poiché abbiamo dimostrato che le delezioni che comprendono *LIS1* sono molto frequenti suggeriamo di effettuare l'MLPA come primo approccio per la diagnosi molecolare dei pazienti con questo fenotipo. Inoltre i risultati da noi ottenuti mostrano che la ricombinazione tra elementi ripetuti *Alu* sembra essere il meccanismo molecolare alla base delle delezioni di *LIS1*.

4.3 Eterotopia a banda sottocorticale (SBH)

Dalla letteratura era noto che il numero di pazienti sporadici con eterotopia a banda sottocorticale (SBH) diffusa o predominante in sede anteriore che avevano una mutazione nel gene *DCX* variava dal 53% all'84% in due studi in cui l'analisi di *DCX* era stata effettuata mediante sequenziamento diretto (Gleeson *et al.*, 2000a; Matsumoto *et al.*, 2001). Nella nostra coorte di 23 pazienti sporadici con SBH, il 52% (12 su 23) presentava mutazioni del gene *DCX* in seguito al sequenziamento diretto. La successiva analisi mediante MLPA di pazienti negativi al sequenziamento aveva identificato delezioni genomiche di *DCX* nel 27% (3 su 11) di questi pazienti (tutti individui di sesso femminile). Questi risultati portavano al 65% la percentuale di pazienti con SBH sporadica per i quali poteva essere dimostrato il coinvolgimento del gene *DCX*. Per tale motivo possiamo affermare che le delezioni di *DCX* sembrano essere una causa sottostimata di SBH e che l'MLPA rappresenta quindi un utile strumento diagnostico da affiancare al sequenziamento diretto del gene *DCX* nei pazienti con questo quadro fenotipico.

L'analisi mediante SQF-PCR e Southern blot hanno confermato i risultati ottenuti con l'MLPA confermando l'utilità di questa metodica per identificare delezioni genomiche, anche di un singolo esone, di *DCX*. Le cause del fenotipo dei pazienti con SBH risultati negativi alle analisi da noi effettuate possono essere: mutazioni di *DCX* che non sono identificabili con le metodiche da noi utilizzate, anomalie cromosomiche criptiche o alterazioni in altri geni. Inoltre sono state descritte mutazioni mosaico o missenso di *LIS1* in pazienti con SBH posteriore (Pilz *et al.*, 1999; Sicca *et al.*, 2003).

Inoltre la SBH posteriore è stata riportata in una ragazza con sindrome di Baraitser-Winter (Rossi *et al.*, 2003). SBH diffusa è stata invece riportata in un uomo con trisomia del cromosoma 9p (Federico *et al.*, 1999) e in una ragazza che presentava una sindrome caratterizzata da pattern di girazione corticale semplificato e sindattilia (Sicca *et al.*, 2003).

Le delezioni da noi identificate comprendevano gli esoni 3, 4 e 5 di *DCX* in due pazienti e l'esone 6 in uno. Tutte le tre delezioni causavano perdita della proteina Doublecortin funzionante e conseguente alterazione della migrazione neuronale. Le risonanze magnetiche di questi tre pazienti presentavano SBH diffusa o predominante in sede anteriore con un pattern di girazione semplificato. I pazienti presentavano inoltre ritardo mentale ed epilessia intrattabile. Questi dati sono in accordo con le osservazioni precedenti che mutazioni di *DCX* nonsense o troncanti portano a perdita di funzione della proteina determinando un fenotipo più grave (Matsumoto *et al.*, 2001). In generale i pazienti con bande eterotopiche più spesse e pattern di girazione corticale semplificato presentano fenotipi più gravi con ritardo dello sviluppo più grave e insorgenza delle crisi epilettiche molto precoce (Barkovich *et al.*, 1994). In letteratura è riportata una delezione che coinvolge gli esoni 6, 7, 8 e 9 di *DCX* identificata mediante PCR e Southern blot in una famiglia in cui un maschio presentava lissencefalia X-linked mentre la sorella presentava SBH (Matsumoto *et al.*, 2001). Inoltre è stata descritta una delezione che comprendeva gli esoni 4, 5, 6 e 7 identificata mediante PCR in un maschio con lissencefalia X-linked (Sakamoto *et al.*, 2000). In entrambi i maschi emizigoti di questi due lavori le delezioni sono state identificate in quanto la reazione di PCR non dava un amplificato visibile al gel di elettroforesi. La PCR e il gel di elettroforesi non permettono invece di identificare delezioni nelle femmine. Le femmine infatti hanno due cromosomi X e quindi anche se è presente una delezione una copia dell'allele viene comunque preservata e la reazione di PCR produce un amplificato apparentemente normale. Di conseguenza le delezioni nelle femmine possono non essere identificate e quindi sottostimate se l'analisi molecolare è eseguita solo con metodiche basate sulla PCR (SSCP, DHPLC o sequenziamento diretto). L'analisi mediante Southern blot può evidenziare ampie delezioni; ad ogni modo questa metodica è piuttosto complessa e richiede una notevole quantità di DNA di partenza. Al contrario l'MLPA rappresenta una metodica rapida ed economica che può essere affiancata al

sequenziamento diretto di *DCX* per migliorare il tasso di identificazione di alterazioni di questo gene.

La consulenza genetica per individui con SBH diffusa o predominante in sede anteriore deve tenere in considerazione la possibilità che ampie delezioni o duplicazioni del gene *DCX* possano non venire identificate con l'analisi molecolare standard. Per tale motivo se l'analisi di sequenziamento di *DCX* risulta negativa deve essere eseguita analisi di MLPA.

Nel maschio con lissencefalia X-linked incluso in questo studio, l'MLPA ha identificato una delezione dell' esone 3 e 4 di *DCX* ed ha escluso che la stessa delezione fosse presente anche nella madre. Questo risultato dimostra che l'MLPA è molto utile per valutare se delezioni di *DCX* identificate in un maschio sono presenti anche in altri membri della famiglia di sesso femminile.

Infine l'MLPA può essere utile per identificare mosaicismi somatici per delezioni del gene *DCX*; in particolare nei maschi in cui la presenza di mosaicismo può impedire che delezioni genomiche vengano identificate mediante PCR. Inoltre l'MLPA può essere utilizzata per escludere il mosaicismo somatico in genitori di pazienti apparentemente sporadici con SBH e delezioni di *DCX*.

4.4 Polimicrogiria bilaterale fronto-parietale (BFPP)

L'analisi molecolare del gene *GPR56* nei pazienti con polimicrogiria bilaterale fronto-parietale (BFPP) ha portato all'identificazione di 3 mutazioni in famiglie in cui gli individui affetti presentavano BFPP. I risultati ottenuti dal nostro studio confermano che mutazioni in *GPR56* sono responsabili di BFPP nei casi familiari in cui è evidente un modello di trasmissione autosomico recessivo della patologia.

Inoltre lo studio clinico dei pazienti con mutazioni di *GPR56* ha evidenziato che tutti questi pazienti presentano anche epilessia compatibile con lo spettro della sindrome di Lennox-Gastaut. La sindrome di Lennox-Gastaut (LGS) è una encefalopatia epilettica dell'infanzia ben caratterizzata in cui i pazienti presentano assenze atipiche, crisi toniche, deficit cognitivo e punte onda all'EEG. Crisi focali sono presenti in meno della metà dei bambini affetti mentre nessuno presenta crisi tonico-cloniche. Una delle

maggiori complicazioni della sindrome di Lennox-Gastaut è rappresentata dalle crisi con caduta. La frequenza delle crisi è alta e l'insorgenza delle crisi è generalmente tra 1 e 10 anni di età; spesso sono presenti episodi di stato epilettico. La sindrome di Lennox-Gastaut è caratterizzata da ritardo mentale e spesso determina danno cerebrale focale o diffuso. Le crisi sono difficile da controllare e la prognosi è spesso sfavorevole (Nabbout and Dulac, 2003; Markand, 2003).

Tutte le mutazioni ritrovate nei nostri pazienti coinvolgono delle porzioni della proteina che costituiscono i domini extracellulari di GPR56. Nessuna di queste mutazioni è però localizzata nella regione "cysteine box" (detta anche GPS, G protein-coupled receptor proteolytic site). Questa regione rappresentava un sito di taglio proteolitico che sembra regolare l'espressione delle GPCRs sulla superficie cellulare ed è conservata in un numero elevato di membri della famiglia delle GPCRs (Krasnoperov *et al.*, 2002). Piao *et al.*, (2004) hanno identificato una mutazione missenso nel dominio GPS (C346S) che causava un fenotipo più grave (BFPP associata a microcefalia) rispetto a quello dei pazienti con mutazioni in altri domini della proteina GPR56.

L'analisi molecolare da noi effettuata ha portato all'identificazione nella famiglia 1 della mutazione R565W nel secondo dominio extracellulare di GPR56 che coinvolge un residuo amminoacidico molto conservato in un elevato numero di proteine GPCRs di vertebrati. Questa mutazione è inoltre stata identificata in una famiglia consanguinea di origine beduina (Piao *et al.*, 2004) con BFPP. Nella famiglia 2 abbiamo identificato la mutazione R33P all'estremità N-terminale della proteina che coinvolge un residuo amminoacidico che è molto conservato in un elevato numero di proteine GPCRs di vertebrati. In questo caso la sostituzione nella posizione 33 della sequenza amminoacidica può determinare una alterazione dell'attività della proteina senza però causarne la perdita completa di funzione. Infine nella famiglia 3 abbiamo identificato la mutazione R79X, sempre nella porzione N-terminale della proteina, che determina la perdita dell'attività proteolitica di GPR56 e la sua conseguente non espressione sulla superficie cellulare.

I risultati da noi ottenuti confermano che mutazioni in GPR56 sono associate a polimicrogiria bilaterale fronto-parietale e mettono inoltre in evidenza che alcuni pazienti con mutazioni in questo gene possono anche presentare un fenotipo clinico di sindrome di Lennox-Gastaut. Questi dati sono molto importanti per i medici che devono

fornire alle famiglie di pazienti con questo quadro clinico e neuroradiologico informazioni sulle indagini molecolari da effettuare e una adeguata consulenza genetica.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Angevine JB and Sidman RL. Autoradiographic study of the cell migration during histogenesis of the cerebral cortex in the mouse. *Nature*. 1961;192:766-768.

Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalffy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD. Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet*. 2003;35(3):270-6.

Baldwin, J.M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 1993;12:1693–1703.

Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci*. 2003;6(12):1277-83.

Barkovich AJ, Guerrini R, Battaglia G, Kalifa G, N'Guyen T, Parmeggiani A, Santucci M, Giovanardi-Rossi P, Granata T, D'Incerti L. Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol*. 1994;36(4):609-17.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics*. 1996; 27:59-63.

Barkovich AJ. Congenital malformations of the brain and skull. In: Barkovich A, ed. *Pediatric neuroimaging*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott William & Wilkins, 2000:251-381.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology*. 2001; 57:2168-78.

Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*. 2002;3:370-379.

Baysal BE, Willett-Brozick JE, Filho PA, Lawrence EC, Myers EN, Ferrell RE. An Alu-mediated partial SDHC deletion causes familial and sporadic paraganglioma. *J Med Genet.* 2004;41:703-709.

Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi PA. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *Eur J Biochem.* 1985;151(3):637-49.

Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999;18(7):1723-9.

Bonneau D, Toutain A, Laquerrière A, Marret S, Saugier-veber P, Barthez MA, Radi S, Biran-Mucignat V, Rodriguez D, Gélot A. X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia (XLAG): clinical, magnetic resonance imaging, and neuropathological findings. *Ann Neurol.* 2002;51(3):340-9.

Brodtkorb E, Nilsen G, Smevik O, Rinck PA. Epilepsy and anomalies of neuronal migration: MRI and clinical aspects. *Acta Neurol Scand.* 1992; 86(1):24-32.

Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, Ginsberg MH. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol.* 2001;3(12):1060-8.

Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, Kuc JA, Ramocki MB, Mewborn SK, Dudlicek LL, May LF, Mills PL, Das S, Pilz DT, Dobyns WB, Ledbetter DH. The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet.* 2000;9:3019-3028.

Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, Roseberry JA, Weiss AM, Das S, Martin CL, Pilz DT, Dobyns WB, Ledbetter DH. Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). *Hum Mutat* 2002;19:4–15.

Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH. Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet* 2003;72:918-930.

Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T, Reiner O. Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet.* 2000;9(15):2205-13.

Caviness VS Jr. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res.* 1982;256(3):293-302.

Chang BS, Piao X, Bodell A, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Grant PE, Barkovich AJ, Walsh CA. Bilateral frontoparietal polymicrogyria: clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol.* 2003;53(5):596-606.

Choy YS, Dabora SL, Hall F, Ramesh V, Niida Y, Franz D, Kasprzyk-Obara J, Reeve MP, Kwiatkowski DJ. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. *Ann Hum Genet.* 1999;63:383-391.

Colosimo A, Guida V, Flex E, Conti E, Dallapiccola B. Use of DHPLC for rapid screening of recombinant clones. *Biotechniques.* 2003;34:706-708.

Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A, Walsh CA. Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci.* 2002;22(17):7548-57.

Dancis J, Silvers DN, Balis ME, Cox RP, Schwartz MS. Evidence for the derivation of individual hair roots from three progenitor cells. *Hum Genet.* 1981;58:414-6.

Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 1999; 67:183-193.

Des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J, Beldjord C. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet.* 1998a;7:1063-70.

Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. Identification of a novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell.* 1998b; 92:51-61.

D'Agostino MD, Bernasconi A, Das S, Bastos A, Valerio RM, Palmi A, Costa da Costa J, Scheffer IE, Berkovic S, Guerrini R, Dravet C, Ono J, Gigli G, Federico A, Booth F, Bernardi B, Volpi L, Tassinari CA, Guggenheim MA, Ledbetter DH, Gleeson JG, Lopes-Cendes I, Vossler DG, Malaspina E, Franzoni E, Sartori RJ, Mitchell MH, Mercho S, Dubeau F, Andermann F, Dobyns WB, Andermann E. Subcortical band heterotopia (SBH) in males: clinical, imaging and genetic findings in comparison with females. *Brain*. 2002;125(Pt 11):2507-22.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 1995;374(6524):719-23.

D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T. Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody. *J Neurosci*. 1997; 17(1):23-31.

D'Arcangelo G. Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav*. 2006;8:81-90.

Devaney JM, Girard JE, Marino MA. DNA microsatellite analysis using ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*. 2000; 72:858-864.

Dobson-Stone C, Cox RD, Lonie L, Southam L, Fraser M, Wise C, Bernier F, Hodgson S, Porter DE, Simpson AH, Monaco AP. Comparison of fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis and denaturing high-performance liquid chromatography for detection of EXT1 and EXT2 mutations in hereditary multiple exostoses. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8:24-32.

Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R, Ledbetter DH. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA*. 1993;270:2838-2842.

Dobyns WB, Truwit CL. Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 update. *Neuropediatrics*. 1995;26(3):132-47.

Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, Czapansky-Beilman D, Dubeau F, Dulac O, Guerrini R, Hirsch B, Ledbetter DH, Lee NS, Motte J, Pinard JM, Radtke RA, Ross ME, Tampieri D, Walsh CA, Truwit CL. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology*. 1996;47:331-339.

Dobyns WB, Guerrini R, Czapansky-Beilman DK, Pierpont ME, Breningstall G, Yock DH Jr, Bonanni P, Truwit CL. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and syndactyly in boys: a new X-linked mental retardation syndrome. *Neurology*. 1997;49(4):1042-7.

Dobyns WB, Berry-Kravis E, Havernick NJ, Holden KR, Viskochil D. X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet*. 1999;86(4):331-7.

Eksioglu YZ, Scheffer IE, Cardenas P, Knoll J, DiMario F, Ramsby G, Berg M, Kamuro K, Berkovic SF, Duyk GM, Parisi J, Huttenlocher PR, Walsh CA. Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron*. 1996;16:77-87.

Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Hum Mutat*. 2000;15:556-564.

Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian SV, Nathanson KL, Ostrander E, Frank TS. Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium. Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1. *J Med Genet*. 2001;38:824-33.

Englund GD, Bodnar RJ, Li Z, Ruggeri ZM, Du X. Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal. *J Biol Chem*. 2001; 276(20):16952-9.

Falconer J, Wada JA, Martin W, Li D. PET, CT, and MRI imaging of neuronal migration anomalies in epileptic patients. *Can J Neurol Sci*. 1990;17:35-9.

Federico A, Tomasetti P, Zollino M, Diomedi M, Dotti MT, De Stefano N, Gualdi GF, Neri G, Gigli GL. Association of trisomy 9p and band heterotopia. *Neurology*. 1999;53(2):430-2.

Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(52):19836-41.

Ferland RJ, Gaitanis JN, Apse K, Tantravahi U, Walsh CA, Sheen VL. Periventricular nodular heterotopia and Williams syndrome. *Am J Med Genet A.* 2006;140(12):1305-11.

Fink JM, Dobyns WB, Guerrini R, Hirsch BA. Identification of a duplication of Xq28 associated with bilateral periventricular nodular heterotopia. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:379-87.

Flintoff KJ, Sheridan E, Turner G, Chu CE, Taylor GR. Submicroscopic deletions of the APC gene: a frequent cause of familial adenomatous polyposis that may be overlooked by conventional mutation scanning. *J Med Genet.* 2001;38:129–132.

Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron.* 1998;21:1315-1325.

Fox JW, Walsh CA. Periventricular heterotopia and the genetics of neuronal migration in the cerebral cortex. *Am J Hum Genet.* 1999;65(1):19-24.

Fredriksson R, Gloriam DE, Hoglund PJ, Lagerstrom MC, Schioth HB. There exist at least 30 human G-protein-coupled receptors with long Ser/Thr-rich N-termini. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301(3):725-34.

Friede RL. *Developmental Neuropathology.* Springer-Verlag, New York 1989 p.577.

Fukuchi-Shimogori T, Grove EA. Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signalling. *Nat Neurosci.* 2003;6:825–31.

Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen J, Van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, De Jong D, McElgunn CJ, Schouten JP, Menko FH. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer.* 2002;87:892–897.

Gilmore EC, Ohshima T, Goffinet AM, Kulkarni AB, Herrup K. Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci.* 1998;18(16):6370-7.

Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 1998;92:63-72.

Gleeson JG, Luo RF, Grant PE. Genetic and neuroradiological heterogeneity of double cortex syndrome. *Annals of Neurology* 2000a;47:265–269.

Gleeson JG, Walsh CA. Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci*. 2000b;23(8):352-9.

Gleeson JG, Minnerath S, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Young ID, Ross ME, Walsh CA. Somatic and germline mosaic mutations in the doublecortin gene are associated with variable phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2000c;67:574-581.

Goffinet AM. Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice. *Brain Res*. 1984;319(3):261-96.

Golden AJ, Harding BN. *Pathology and Genetics*. Developmental Neurophatology. ISN Neuropath Press, Basel 2004. 386 pages.

Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol*. 1990;111:1089-1105.

Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet*. 1999; 105:72-78.

Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, Dobyns WB, Kuzniecky R, Silver K, Van Bogaert P, Gillain C, David P, Ambrosetto G, Rosati A, Bartolomei F, Parmeggiani A, Paetau R, Salonen O, Ignatius J, Borgatti R, Zucca C, Bastos AC, Palmi A, Fernandes W, Montenegro MA, Cendes F, Andermann F. Familial perisylvian polymicrogyria: a new familial syndrome of cortical maldevelopment. *Ann Neurol*. 2000;48(1):39-48.

Guerrini R, Dravet C, Raybaud C, Roger J, Bureau M, Battaglia A, Livet MO, Colicchio G, Robain O. Neurological findings and seizure outcome in children with

bilateral opercular macrogyric-like changes detected by MRI. *Dev Med Child Neurol.* 1992;34(8):694-705.

Guerrini R, Dravet Ch, Bureau M, Mancini J, Canapicchi R, Livet MO, Belmonte A. Diffuse and localized dysplasias of cerebral cortex: clinical presentation, outcome, and proposal for a morphologic MRI classification based on a study of 90 patients. In: *Dysplasias of Cerebral Cortex and Epilepsy.* (Eds. Guerrini R, Andermann F, Canapicchi R, Roger J, Zifkin BG, Pfanner P.) Philadelphia, Lippincot-Raven, 1996.

Guerrini R, Dubeau F, Dulac O, Barkovich AJ, Kuzniecky R, Fett C, Jones-Gotman M, Canapicchi R, Cross H, Fish D, Bonanni P, Jambaqué I, Andermann F. Bilateral parasagittal parietooccipital polymicrogyria and epilepsy. *Ann Neurol.* 1997;41(1):65-73.

Guerrini R, Dobyns WB. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and frontonasal malformation. *Neurology.* 1998; 51:499-503.

Guerrini R, Genton P, Bureau M, Parmeggiani A, Salas-Puig X, Santucci M, Bonanni P, Ambrosetto G, Dravet C. Multilobar polymicrogyria, intractable drop attack seizures, and sleep-related electrical status epilepticus. *Neurology.* 1998;51(2):504-12.

Guerrini R, Barkovich AJ, Sztriha L, Dobyns WB. Bilateral frontal polymicrogyria: a newly recognized brain malformation syndrome. *Neurology.* 2000;54:909-913.

Guerrini R, Carrozzo R. Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure.* 2001;10: 532-543.

Guerrini R, Moro F, Andermann E, Hughes E, D'Agostino D, Carrozzo R, Bernasconi A, Flinter F, Parmeggiani L, Volzone A, Parrini E, Mei D, Jarosz JM, Morris RG, Pratt P, Tortorella G, Dubeau F, Andermann F, Dobyns WB, Das S. Nonsyndromic mental retardation and cryptogenic epilepsy in women with doublecortin gene mutations. *Ann Neurol.* 2003;54(1):30-7.

Guerrini R, Mei D, Sisodiya S, Sicca F, Harding B, Takahashi Y, Dorn T, Yoshida A, Campistol J, Krämer G, Moro F, Dobyns WB, Parrini E. Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology.* 2004;63(1):51-6.

Guerrini R, Filippi T. Neuronal migration disorders, genetics, and epileptogenesis. *J Child Neurol.* 2005;20:287-299.

Guion-Almeida ML and Richieri-Costa A. Frontonasal dysplasia, macroblepharon, eyelid colobomas, ear anomalies, macrostomia, mental retardation, and CNS structural anomalies. A new syndrome? *Clin Dysmorphol.* 1999; 81:1-4.

Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet.* 1999;21:42-47.

Harding B, Copp A. Malformations of the nervous system. In: Graham J, Lantos PL (eds): *Greenfields Neuropathology.* London-Melbourne-Auckland: Edward Arnold, 1997:521-538.

Hecker KH, Turpie B, Kuklin A. Optimization of cloning efficacy by pre-cloning DNA fragment analysis. *Biotechniques.* 1999;26:216-222.

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron.* 1999;24(2):481-9.

Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet.* 1998;19(4):333-9.

Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk Menko FH, Kluijdt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten van't Veer LJ, Pals G. Large genomic deletions duplications in the BRCA1 gene identified by quantitative method. *Cancer Res.* 2003;63:1449-1453.

Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet.* 2004;36: 801-8.

Hoogendoorn B, Owen MJ, Oefner PJ, Williams N, Austin J, O'Donovan MC. Genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension and high performance liquid chromatography. *Hum Genet.* 1999;104:89-93.

Hoogendoorn B, Norton N, Kirov G, Williams N, Hamshere ML, Spurlock G, Austin J, Stephens MK, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC. Cheap, accurate and rapid allele frequency estimation of single nucleotide polymorphisms by primer extension and DHPLC in DNA pools. *Hum Genet.* 2000;107:488-493.

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet.* 2000;26(1):93-6.

Huber CG, Oefner PJ, Bonn GK. High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on nonporous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. *Anal Biochem.* 1993a; 212(2):351-8.

Huber CG, Oefner PJ, Preuss E, Bonn GK. High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res.* 1993b; 21(5):1061-6.

Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem.* 1999;45:1133-1140.

Jones AC, Sampson JR, Cheadle JP. Low level mosaicism detectable by DHPLC but not by direct sequencing. *Hum Mutat.* 2001; 17:233-234.

Kato M, Kanai M, Soma O, Takusa Y, Kimura T, Numakura C, Matsuki T, Nakamura S, Hayasaka K. Mutation of the doublecortin gene in male patients with double cortex syndrome: somatic mosaicism detected by hair root analysis. *Ann Neurol.* 2001; 50:547-551.

Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi K, Abuelo DN, Barr M, Bonneau D, Brady AF, Carpenter NJ, Cipero KL, Frisone F, Fukuda T, Guerrini R, Iida E, Itoh M, Lewanda AF, Nanba Y, Oka A, Proud VK, Saugier-veber P, Schelley SL, Selicorni A, Shaner R, Silengo M, Stewart F, Sugiyama N, Toyama J, Toutain A, Vargas AL, Yanazawa M, Zackai EH, Dobyns WB. Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 2004;23(2):147-59.

Keays DA, Tian G, Poirier K, Huang GJ, Siebold C, Cleak J, Oliver PL, Fray M, Harvey RJ, Molnár Z, Piñon MC, Dear N, Valdar W, Brown SD, Davies KE,

Rawlins JN, Cowan NJ, Nolan P, Chelly J, Flint J. Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*. 2007;128(1):45-57.

Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N et al. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 2002;32:359-369.

Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, Squire JA. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood*. 2001;97:3581-3588.

Krasnoperov V, Lu Y, Buryanovsky L, Neubert TA, Ichtchenko K, Petrenko AG. Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif. *J Biol Chem*. 2002 277(48):46518-2

Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P. Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet Test*. 1997-98; 1:201-206.

Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini R, Study CMC. Congenital bilateral perisylvian syndrome: study of 31 patients. *The Lancet*. 1993;341:608-612.

Lewandoski M, Sun X, Martin GR. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 2000;26:460-3.

Liu M, Parker RM, Darby K, Eyre HJ, Copeland NG, Crawford J, Gilbert DJ, Sutherland GR, Jenkins NA, Herzog H. GPR56, a novel secretin-like human G-protein-coupled receptor gene. *Genomics* 1999;55(3):296-305.

Maestrini E, Tamanini F, Kioschis P. An archipelago of CpG islands in Xq28: identification and fine mapping of 20 new CpG islands of the human X chromosome. *Hum Mol Genet*. 1992; 1:275-280.

Maestrini E, Patrosso C, Mancini M, Rivella S, Rocchi M, Repetto M, Villa A, Frattini A, Zoppe M, Vezzoni P, et al. Mapping of two genes encoding isoforms of the

actin binding protein ABP-280, a dystrophin like protein, to Xq28 and to chromosome 7. *Hum Mol Genet.* 1993;2:761-766.

Marin-Padilla M. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl).* 1978;20:109-26.

Markand ON. Lennox-Gastaut syndrome (childhood epileptic encephalopathy). *J Clin Neurophysiol.* 2003;20(6):426-41.

Matell M. Ein fall von heterotopie der frauen substanz in den beiden hemispheren des grosshirns. *Archives of Psychiatric Nervenkr.* 1893;25:124–136.

Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH, Dobyns WB. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:5–12.

Mighell AJ, Markham AF, Robinson PA. Alu sequences. *FEBS Lett.* 1997;417:1-5.

Montagna M, Palma MD, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet.* 2003; 12:1055–1061.

Moro F, Carrozzo R, Veggiotti P, Tortorella G, Toniolo D, Volzone A, Guerrini R. Familial periventricular heterotopia. Missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology.* 2002;58:916-921.

Munari C, Francione S, Kahane P. *Usefulness of stereo EEG investigations in partial epilepsy associated with cortical dysplastic lesions and gray matter heterotopia.* In: R. Guerrini, F. Andermann, R. Canapicchi, J. Roger, B. Zifkin and P. Pfanner, Editors, *Dysplasias of Cerebral Cortex and Epilepsy*, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York 1996 p.383–394.

Nabbout R, Dulac O. Epileptic encephalopathies: a brief overview. *J Clin Neurophysiol.* 2003;20(6):393-7.

Neal J, Apse K, Sahin M, Walsh CA, Sheen VL. Deletion of chromosome 1p36 is associated with periventricular nodular heterotopia. *Am J Med Genet A*. 2006;140(15):1692-5.

Nezelof C, Jaubert F, Lyon G. Syndrome familial associant grele court, malrotation intestinale, hypertrophie du pylore et malformation cerebrale: etude anatomo-clinique de trois observations. *Ann. Anat. Pathol. (Paris)* 1976;21:401-412.

Niethammer M, Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, Morabito M, Tsai LH. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron*. 2000;28(3):697-711.

Nikolic M, Chou MM, Lu W, Mayer BJ, Tsai LH. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature*. 1998;395:194-198.

Oefner PJ. Allelic discrimination by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2000;739:345-355.

Oefner PJ, Huber CG. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B*. 2002;782(1-2):27-55.

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*. 1995;14(5):899-912.

Ohira R, Zhang YH, Guo W, Dipple K, Shih SL, Doerr J, Huang BL, Fu LJ, Abu-Khalil A, Geschwind D, McCabe ER. Human ARX gene: genomic characterization and expression. *Mol Genet Metab*. 2002;77(1-2):179-88.

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohnweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell*. 1996;87:543-552.

Palm L, Hagerstrand I, Kristoffersson U, Blennow G, Brun A, Jorgensen C. Nephrosis and disturbances of neuronal migration in male siblings-a new hereditary disorder? *Arch. Dis. Child*. 1986;61:545-548.

Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P, Marini C, Brilstra EH, Dalla Bernardina B, Goodwin L, Bodell A, Jones MC, Nangeroni M, Palmeri S, Said E, Sander JW, Striano P, Takahashi Y, Van Maldergem L, Leonardi G, Wright M, Walsh CA, Guerrini R. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain*. 2006;129(Pt 7):1892-906

Patrosso MC, Repetto M, Villa A, Milanesi L, Frattini A, Faranda S, Mancini M, Maestrini E, Toniolo D, Vezzoni P. The exon-intron organization of the human X-linked gene (FLN1) encoding actin-binding protein 280. *Genomics*. 1994;21(1):71-6.

Piao X, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Grant PE, Pugh EW, Doheny K, Doan B, Hong SE, Shugart YY, Walsh CA. An autosomal recessive form of bilateral frontoparietal polymicrogyria maps to chromosome 16q12.2–21. *Am J Hum Genet*. 2002;70:1028–33.

Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Ross ME, Michaud JL, Descarie JC, Barkovich AJ, Walsh CA. G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science*. 2004;303(5666):2033-6.

Piao X, Chang BS, Bodell A, Woods K, Benzeev B, Topcu M, Guerrini R, Goldberg-Stern H, Sztriha L, Dobyns WB, Barkovich AJ, Walsh CA. Genotype-phenotype analysis of human frontoparietal polymicrogyria syndromes. *Ann Neurol*. 2005;58(5):680-7.

Pilz DT, Macha ME, Precht KS, Smith AC, Dobyns WB, Ledbetter DH. Fluorescence in situ hybridization analysis with LIS1 specific probes reveals a high deletion mutation rate in isolated lissencephaly sequence. *Genet Med*. 1998;1:29-33.

Pilz DT, Kuc J, Matsumoto N, Bodurtha J, Bernadi B, Tassinari CA, Dobyns WB, Ledbetter DH. Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX [XLIS] or LIS1. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1757-1760.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*. 2000;407(6803):535-8.

Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, Fallet-Bianco C, Pasquier L, Toutain A, Tuy FP, Bienvenu T, Joriot S, Odent S, Ville D, Desguerre I, Goldenberg A, Moutard ML, Fryns JP, van Esch H, Harvey RJ,

Siebold C, Flint J, Beldjord C, Chelly J. Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum Mutat.* 2000;28(11):1055-64.

Poussaint TY, Fox JW, Dobyns WB, Radtke R, Scheffer IE, Berkovic SF, Barnes PD, Huttenlocher PR, Walsh CA. Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. *Pediatr Radiol.* 2000;30:748-755.

Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 1972;145(1):61-83.

Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH. Isolation of a Miller–Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 1993;364:717–721.

Reiner O. LIS1. let's interact sometimes... (part 1). *Neuron.* 2000;28(3):633-6.

Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwrick SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, Orstavik KH, Quarrell OW, Schwartz CE, Shears DJ, Suri M, Kendrick-Jones J, Wilkie AO. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet.* 2003; 33:487-491.

Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, Valenti MP, Roedel-Trevisiol N, Jamali S, Beclin C, Seegmuller C, Metz-Lutz MN, Lemainque A, Delepine M, Caloustian C, de Saint Martin A, Bruneau N, Depétris D, Mattéi MG, Flori E, Robaglia-Schlupp A, Lévy N, Neubauer BA, Ravid R, Marescaux C, Berkovic SF, Hirsch E, Lathrop M, Cau P, Szepetowski P. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet.* 2006;15(7):1195-207.

Ross ME, Allen KM, Srivastava AK, Featherstone T, Gleeson JG, Hirsch B, Harding BN, Andermann E, Abdullah R, Berg M, Czapansky-Bielman D, Flanders DJ, Guerrini R, Motte J, Mira AP, Scheffer I, Berkovic S, Scaravilli F, King RA, Ledbetter DH, Schlessinger D, Dobyns WB, Walsh CA. Linkage and physical mapping of X-linked lissencephaly/SBH (XLIS): a gene causing neuronal migration defects in human brain. *Hum Mol Genet.* 1997;6:555-562.

Ross ME, Swanson K, Dobyns WB. Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations. *Neuropediatrics.* 2001;32:256-263.

Rossi M, Guerrini R, Dobyns WB, Andria G, Winter RM. Characterization of brain malformations in the Baraitser-Winter syndrome and review of the literature. *Neuropediatrics*. 2003;34:287–292.

Roth DB, Chang XB, Wilson JH. Comparison of filler DNA at immune, nonimmune, and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanism of formation. *Mol Cell Biol*. 1989;9:3049-3057.

Rowold DJ, Herrera RJ. Alu elements and the human genome. *Genetica* 2000;108:57-72.

Sakamoto M, Ono J, Okada S, Nakamura Y, Kurahashi H. Genetic alteration of the DCX gene in Japanese patients with subcortical laminar heterotopia or isolated lissencephaly sequence. *J Hum Genet*. 2000;45:167–170.

Sapir T, Horesh D, Caspi M, Atlas R, Burgess HA, Wolf SG, Francis F, Chelly J, Elbaum M, Pietrokovski S, Reiner O. Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum Mol Genet*. 2000;9(5):703-12.

Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron*. 2000;28(3):681-96.

Saxe CL. Learning from the slime mold: Dictyostelium and human disease. *Am J Hum Genet*. 1999;65:25-30.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.

Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*. 2004;23(5):413-9.

Senzaki K, Ogawa M, Yagi T. Proteins of the CNR family are multiple receptors for Reelin. *Cell*. 1999;99(6):635-47.

Sharma CP, Ezzell RM, Arnaout MA. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol*. 1995;154(7):3461-70.

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet.* 2001;10:1775-1783.

Sheen VL, Feng Y, Graham D, Takafuta T, Shapiro SS, Walsh CA. Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum Mol Genet.* 2002;11(23):2845-54.

Sheen VL, Topcu M, Berkovic S, Yalnizoglu D, Blatt I, Bodell A, Hill RS, Ganesh VS, Cherry TJ, Shugart YY, Walsh CA. Autosomal recessive form of periventricular heterotopia. *Neurology.* 2003a;60:1108-1112.

Sheen VL, Wheless JW, Bodell A, Braverman E, Cotter PD, Rauen KA, Glenn O, Weisiger K, Packman S, Walsh CA, Sherr EH. Periventricular heterotopia associated with chromosome 5p anomalies. *Neurology.* 2003b;60(6):1033-6.

Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, Grant PE, Shugart YY, Imitola J, Houry SJ, Guerrini R, Walsh CA. Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet.* 2004a;36(1):69-76.

Sheen VL, Basel-Vanagaite L, Goodman JR, Scheffer IE, Bodell A, Ganesh VS, Ravenscroft R, Hill RS, Cherry TJ, Shugart YY, Barkovich J, Straussberg R, Walsh CA. Etiological heterogeneity of familial periventricular heterotopia and hydrocephalus. *Brain Dev.* 2004b;26(5):326-34.

Sheen VL, Jansen A, Chen MH, Parrini E, Morgan T, Ravenscroft R, Ganesh V, Underwood T, Wiley J, Leventer R, Vaid RR, Ruiz DE, Hutchins GM, Menasha J, Willner J, Geng Y, Gripp KW, Nicholson L, Berry-Kravis E, Bodell A, Apse K, Hill RS, Dubeau F, Andermann F, Barkovich J, Andermann E, Shugart YY, Thomas P, Viri M, Veggiotti P, Robertson S, Guerrini R, Walsh CA. Filamin A mutations cause periventricular heterotopia with Ehlers-Danlos syndrome. *Neurology.* 2005;64(2):254-62.

Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T. Scrambler and yotari disrupt the

disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature*. 1997; 389(6652):730-3.

Sicca F, Silengo M, Parrini E, Ferrero GB, Guerrini R. Subcortical band heterotopia with simplified gyral pattern and syndactyly. *Am J Med Genet A*. 2003;119:207–210.

Sicca F, Kelemen A, Genton P, Das S, Mei D, Moro F, Dobyns WB, Guerrini R. Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology*. 2003;61:1042-1046.

Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res*. 1973;62(1):1-35.

Skopek TR, Glaab WE, Monroe JJ, Kort KL, Schaefer W. Analysis of sequence alterations in a defined DNA region: comparison of temperature-modulated heteroduplex analysis and denaturing gradient gel electrophoresis. *Mutat Res*. 1999; 430:13-21.

Sossey-Alaoui K, Hartung AJ, Guerrini R, Manchester DK, Posar A, Puche-Mira A, Andermann E, Dobyns WB, Srivastava AK. Human doublecortin (DCX) and the homologous gene in mouse encode a putative Ca²⁺-dependent signaling protein which is mutated in human X-linked neuronal migration defects. *Hum Mol Genet*. 1998; 7:1327-1332.

Stenger JE, Lobachev KS, Gordenin D, Darden TA, Jurka J, Resnick MA. Biased distribution of inverted and direct Alus in the human genome: implications for insertion, exclusion, and genome stability. *Genome Res*. 2001;11:12-27.

Strømme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SM, Bruyere H, Lütcherath V, Gedeon AK, Wallace RH, Scheffer IE, Turner G, Partington M, Frints SG, Fryns JP, Sutherland GR, Mulley JC, Gécz J. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet*. 2002;30(4):441-5.

Thomas P, Bossan A, Lacour JP, Chanalet S, Ortonne JP, Chatel M. Ehlers-Danlos syndrome with subependymal periventricular heterotopias. *Neurology*. 1996; 46:1165-1167.

Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 1997;7(10):996-1005.

Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, Klapecki J, Gross C, Berman Y, Martin P, Dey L, Spranger S, Korenke GC, Schreyer I, Hertzberg C, Neumann TE, Burkart P, Spaich C, Meng M, Holthausen H, Adès L, Seidel J, Mangold E, Buyse G, Meinecke P, Schara U, Zeschnigk C, Muller D, Helland G, Schulze B, Wright ML, Kortge-Jung S, Hehr A, Bogdahn U, Schuierer G, Kohlhase J, Aigner L, Wolff G, Hehr U, Winkler J. Location and type of mutation in the LIS1 gene do not predict phenotypic severity. *Neurology.* 2007;69:442-447.

Vallee RB, Faulkner NE, Tai CY. The role of cytoplasmic dynein in the human brain developmental disease lissencephaly. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1496(1):89-98.

Van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1538(2-3):99-117.

Vles JS, Fryns JP, Folmer K, Boon P, Buttiens M, Grubben C, Janevski B. Corpus callosum agenesis, spastic quadraparesis and irregular lining of the lateral ventricles on CT-Scan. A distinct X-linked mental retardation syndrome? *Genet Couns.* 1990; 38:97-102.

Vles JS, de Die-Smulders C, van der Hoeven M, Fryns JP. Corpus callosum agenesis in two male infants of a heterozygotic triplet pregnancy. *Genet. Couns.* 1993; 4:239-240.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280:1077-1082.

Walsh C, Reid C. Cell lineage and patterns of migration in the developing cortex. *Ciba Foundation Symposium.* 1995;193:21-40.

Wieck G, Leventer RJ, Squier WM, Jansen A, Andermann E, Dubeau F, Ramazzotti A, Guerrini R, Dobyns WB. Periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. *Brain*. 2005;128(Pt 12):2811-21.

Wynshaw-Boris A, Gambello MJ. LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev*. 2001;15(6):639-51.

Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell*. 1995;6(3):297-310.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001;17:439-474.

Zukerberg LR, Patrick GN, Nikolic M, Humbert S, Wu CL, Lanier LM, Gertler FB, Vidal M, Van Etten RA, Tsai LH. Cdk5 links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron*. 2000;26(3):633-46.