

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE GENERALI E SCIENZE DEI SERVIZI

Ciclo 33

**Settore Concorsuale:** 06/G1-Pediatria Generale, specialistica e Neuropsichiatria Infantile

**Settore Scientifico Disciplinare:** MED38 Pediatria Generale e Specialistica

Descrizione dell'evoluzione a lungo termine del fenotipo elettroclinico in una coorte di 40 pazienti con Sindrome di Mowat Wilson

**Presentata da:** Emilia Ricci

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Fabio Piscaglia**

**Supervisore**

**Prof. Giacomo Faldella**

**Esame finale anno 2021**

# INDICE

## 1-Introduzione

- 1.1 Sindrome di Mowat-Wilson, la storia
- 1.2 Fenotipo clinico extraneurologico
  - 1.2.1 Facies
  - 1.2.2 Malformazioni cardiache
  - 1.2.3 Morbo di Hirschsprung
  - 1.2.4 Malformazioni a carico dell'apparato genito-urinario
  - 1.2.5 Caratteristiche auxologiche
  - 1.2.6 Manifestazioni oculari
- 1.3 Fenotipo clinico neurologico
  - 1.3.1 Disabilità intellettiva, profilo relazionale e comportamentale
  - 1.3.2 Malformazioni cerebrali
  - 1.3.3 Disturbo del sonno
  - 1.3.4 Disturbo e caratteristiche del movimento
  - 1.3.5 Epilessia
- 1.4 Gene ZEB2
  - 1.4.1 Struttura del gene ZEB2
  - 1.4.2 Ruolo di ZEB2 a livello del sistema nervoso centrale e periferico
- 1.5 Sindrome di Mowat-Wilson, gene ZEB2 ed epilessia: stato dell'arte
- 1.6 Fenotipi "Mild" e mutazioni missenso di ZEB2

## **2-Scopo dello studio**

## **3-Pazienti e Metodi**

## **4-Risultati**

- 4.1 Incidenza dell'epilessia, semeiologia delle crisi e risposta alla terapia antiepilettica
- 4.2 Caratteristiche elettroencefalografiche
- 4.3 Caratteristiche genetiche

## **5-Discussioni**

## **6-Bibliografia**

# 1-Introduzione

## 1.1-Sindrome di Mowat-Wilson, la storia

La sindrome di Mowat Wilson è stata per la prima volta descritta nel 1998 da due genetisti australiani (DR Mowat e MJ Wilson) distinguendosi per il particolare fenotipo soprattutto in termini di dismorfismi faciali. ([Mowat et al 1998](#)) Sin da subito la disabilità intellettiva ed una particolare inclinazione alla socializzazione vennero considerate come due manifestazioni costitutive della patologia. Crisi epilettiche, microcefalia, malformazioni congenite (in particolare cardiache/a carico del tratto genitourinario), morbo di Hirschsprung e bassa statura vennero inoltre descritte come molto frequenti nei soggetti affetti. Nei primi pazienti descritti il fenotipo riscontrato fu inizialmente correlato a delezioni a carico della regione 2q22-23. ([Lurie IW et al., 1994](#)) Successivamente, nel 2001, fu individuato il gene SIP1 come causativo della patologia all'interno della medesima regione "critica" precedentemente considerata. ([Cacheux et al., 2001](#); [Zweier C et al., 2002](#); [Yamada et al., 2001](#)) Nel corso degli anni SIP1 fu successivamente rinominato ZFH1B e più tardi ancora ZEB2. Il ruolo cruciale del regolatore della trascrizione SIP1 (ubiquitario nei diversi tessuti nell'uomo), durante lo sviluppo embrionale, venne evidenziato a partire dalle iniziali segnalazioni. Nel tempo, il meccanismo patogenetico con cui si manifesta la sindrome si è confermato essere l'aploinsufficienza ovvero la insufficiente produzione di proteina efficiente. ([Mowat et al., 2003](#); [Wilson et al., 2003](#)) La mutazione a carico di uno solo dei due alleli, con perdita di funzione del relativo prodotto proteico (proteina tronca o assente), è infatti bastevole nel far sì che la quantità di proteina prodotta in toto non sia in grado di soddisfare le fisiologiche necessità dell'organismo. L'ipotesi dell'aploinsufficienza come meccanismo patogenetico è stata sempre sostenuta anche dall'evidenza che le mutazioni geniche causative della sindrome descritte sin dai primi articoli siano di tipo non-senso, frameshift, delezioni/microdelezioni, traslocazioni con o senza delezioni associate

e mutazioni del sito di splicing. Già nei primi articoli pubblicati, venivano segnalati sporadici pazienti, presentanti fenotipicamente la sindrome di Mowat Wilson, in cui era possibile riscontrare persistenza parziale di SIP1 mRNA residuo, in questi casi, è stata inizialmente utilizzata la terminologia di “aploinsufficienza incompleta”. Anche nelle più recenti/numerose casistiche pubblicate, raramente il meccanismo patogenetico descritto non risulta essere l’aploinsufficienza completa (per rilevazione di SIP1 mRNA) senza tuttavia chiare correlazioni genotipo-fenotipo. Le mutazioni sono più spesso de novo (delezioni o mutazioni dominanti), raramente è stata descritta ricorrenza all’interno di alcune famiglie per mosaicismi germinali a livello parentale che vanno comunque considerati nel counseling genetico.

## *1.2-Fenotipo clinico extraneurologico*

### *1.2.1-Facies*

I genetisti appaiono concordi nell’affermare che la sindrome di Mowat-Wilson presenti caratteri fenotipici così caratteristici, in particolare in termini di gestalt faciale, da poter essere facilmente sospettata, con il solo esame clinico, nelle prime fasi del percorso diagnostico nella quasi totalità dei casi. In particolare il lobo dell’orecchio ruotato verso l’alto e con forma biconcava apparirebbe come il tratto fenotipico maggiormente distintivo. In termini di frequenza seguirebbero come aspetti caratteristici i dismorfismi nasali: columella prominente, radice del naso appiattita ed allargata e punta arrotondata. Per quanto riguarda invece gli occhi, il 75% circa dei pazienti presenta ipertelorismo, nella maggior parte dei casi inoltre essi sono di grandi dimensioni ed aspetto infossato, concomitano telecanto in circa la metà dei casi ed epicanto in circa 1/3. In oltre la metà dei pazienti è infine presente strabismo. La bocca è assai spesso descritta come mantenuta aperta e con caratteristico profilo del labbro superiore a “M”. La fronte è ampia in oltre la metà dei casi,

non di rado associata a bossing. Le sopracciglia sono riportate ampie, maggiormente a livello mediale dove appaiono inoltre sparse/diradate; anche i capelli possono divenire radi.

Quasi il 70% dei pazienti si presenta microcefalico, talvolta la microcefalia è congenita ma più spesso secondaria. Il mento è prominente e dall'aspetto triangolare. Negli ultimi studi è stata descritta un'evoluzione ben definita della facies nell'arco della crescita con la maggior salienza di alcuni tratti distintivi come gli ultimi citati dopo l'età scolare. Tuttavia, ad ogni età, la sindrome di Mowat-Wilson appare ben riconoscibile in termini di dismorfismi faciali. ([Garavelli et al., 2009](#))

### *1.2.2-Malformazioni cardiache*

Le anomalie cardiache sono presenti in circa il 60% dei pazienti con sindrome di Mowat-Wilson. La maggior parte di queste (circa un terzo dei casi) sono difetti interatriali o interventricolari e pervietà del Dotto arterioso. In circa il 20% dei pazienti può essere inoltre presente stenosi polmonare e nel 10% coartazione aortica. Nei restanti casi sono stati descritti anche: valvola aortica bicuspidale, tetralogia di Fallot, stenosi della valvola aortica, sling dell'arteria polmonare, atresia polmonare e prolasso della valvola mitrale. ([Ivanovski et al., 2018](#))

### *1.2.3-Morbo di Hirschsprung*

Per quanto riguarda gli aspetti gastrointestinali, certamente il Morbo di Hirschsprung è il più significativo e si osserva nel 30% dei casi; oltre il 40% dei pazienti può comunque soffrire di severa costipazione. L'ernia inguinale e la stenosi pilorica sono state descritte in una minoranza dei casi.

### *1.2.4-Malformazioni a carico dell'apparato genito-urinario*

In oltre la metà dei pazienti sono presenti malformazioni a carico del tratto genito-urinario. Assai più frequenti risultano essere l'ipospadia ed il criptorchidismo sebbene altre malformazioni a carico dei genitali esterni siano riportate in letteratura. Per quanto riguarda il rene, l'idronefrosi ed il

reflusso vescico-ureterale sono le due problematiche più spesso riportate. Casi di rene ectopico (pelvico) sono stati segnalati raramente. ([Garavelli et al., 2005](#); [Ivanovski et al., 2018](#))

#### *1.2.5-Caratteristiche auxologiche*

Alla nascita (età gestazionale paragonabile a quella della popolazione generale) i parametri antropometrici risultano nella norma nella quasi totalità dei pazienti sia in termini di peso, lunghezza e circonferenza cranica. Tuttavia, per quanto riguarda quest'ultima, i valori si attestano più spesso < 50° centile con una media attorno al 25° centile. Per quanto riguarda l'altezza si osserva durante l'infanzia, un rallentamento della velocità di crescita, specie poco dopo l'inizio dell'età scolare con valori medi di altezza dopo i 7 aa inferiori al 3° centile per quanto riguarda i maschi e tra il 3°centile-5° centile per quanto riguarda le femmine. Ragionamento analogo può essere condotto per il peso con valori medi ai 5 anni al 10° centile sia per quanto riguarda i maschi che le femmine. Dopo l'adolescenza questo dato appare più marcato con peso mediamente al 5° centile nei maschi ed inferiore al 3° centile nelle femmine. Infine, la crescita della circonferenza cranica: tra i 2 ed i 3 anni si osserva una importante deflessione della curva di accrescimento con valori medi collocati al 5° centile per entrambi i sessi. Dopo l'adolescenza, l'appiattimento della curva diviene ancor più evidente con franca microcefalia sia per i maschi che per le femmine. ([Ivanovski et al., 2020](#))

#### *1.2.6-Manifestazioni oculari*

Lo strabismo sopracitato è l'anomalia oculare più spesso descritta. Le femmine in particolare (rapporto di oltre 2:1 rispetto ai maschi) presentano inoltre spesso difetti dell'acuità visiva quali miopia ed astigmatismo. Occasionalmente riportati in letteratura anche nistagmo, ptosi, anomalia di Axenfeld, coloboma, microftalmia, ipotrofia-atrofia del nervo ottico ed eterocromia dell'iride. ([Bourchany et al., 2015](#))

#### *1.3-Fenotipo clinico neurologico*

### *1.3.1-Disabilità intellettiva, profilo relazionale e comportamentale*

Per quanto riguarda il profilo cognitivo, tutti i pazienti finora descritti presentano disabilità intellettiva di grado moderato o severo. Ad oggi non esistono studi che si siano concentrati nel delineare più dettagliatamente gli aspetti neuropsicologici ed eventuali disarmonie nel profilo. L'esperienza clinica mostra una severa compromissione delle performance verbali ed in particolare del linguaggio espressivo che apparentemente risulta discrepante rispetto alle capacità relazionali, all'intento comunicativo ed alle performance motorie nella maggior parte dei pazienti. Tipicamente questi pazienti ottengono grande beneficio dall'utilizzo della comunicazione aumentativa. Nelle casistiche più numerose l'assenza completa di linguaggio espressivo pari al 67%.

Nella storia clinica dei pazienti, anche dal punto di vista motorio, lo sviluppo evidenzia ritardo delle acquisizioni sin dalle prime tappe con posizione seduta ottenuta mediamente a 17 mesi e deambulazione ai 3 anni e 9 mesi. E' segnalato che in circa un terzo dei pazienti non venga mai raggiunta la deambulazione autonoma.

Dal punto di vista relazionale, i pazienti con sindrome di Mowat Wilson vengono descritti con una forte predisposizione alla socializzazione ed un aspetto allegro con inclinazione al riso, analogamente a quanto accade per i soggetti con sindrome di Angelman.

Dal punto di vista del comportamento si segnalano inoltre la tendenza al permanere dell'esplorazione orale degli oggetti talvolta anche con ingestione incongrua. Vengono riportati infine repentini cambi del tono timico e rapidi switch tra una attiva partecipazione all'ambiente e momenti di rifiuto/impossibilità della stessa. Infine alcune descrizioni riscontrano una possibile aumentata soglia per quanto riguarda gli stimoli nocicettivi. ([Evans et al., 2012](#))

### *1.3.2-Malformazioni Cerebrali*

Per quanto riguarda gli aspetti malformativi a carico delle strutture encefaliche, un recente studio ha descritto le caratteristiche di neuroimaging (risonanza magnetica cerebrale) in 54 pazienti, riportando anomalie in un numero maggiore di pazienti con MWS rispetto quanto pubblicato in precedenza . Le anomalie a carico del corpo calloso, in uno spettro variabile dalla totale agenesia (25%), alla parziale agenesia (16%) o all'ipoplasia (37%) sono descritte in quasi l'80% della popolazione. Con pressochè la stessa frequenza (78% della popolazione in esame) vengono riportate "anomalie dell'ippocampo". Esse non vengono dettagliatamente definite ma per quanto possibile, non emergono alterazioni a livello della struttura corticale né in termini di spessore che di organizzazione e/o alterazione del segnale alla risonanza magnetica. Si tratterebbe dunque di malrotazioni o aspetto macroscopico morfologicamente atipico. In circa il 40% dei pazienti è inoltre riportata una diffusa ridotta rappresentazione della sostanza bianca, talvolta maggiormente evidente a carico di un emisfero; in circa il 22% vengono invece segnalate alterazioni più circoscritte della sostanza bianca. Entrambe queste osservazioni meriterebbero un miglior inquadramento dal punto di vista neuroradiologico. Un ampliamento dei ventricoli laterali è presente nel 39 % dei pazienti mentre un allargamento dei corni temporali è visibile in circa il 60% dei casi descritti. In 4 pazienti venivano inoltre descritte alterazioni cerebellari, in 3 pazienti un aumento di dimensioni dei gangli della base, in un paziente polimicrogiria, in uno eterotopia periventricolare e nell'ultimo malformazione di Chiari I. Così come le alterazioni a carico della sostanza bianca, gli aspetti malformativi della fossa cranica posteriore destano particolare interesse rispetto alla possibili funzioni di ZEB2 ed andranno approfonditi nel tempo. (Garavelli et al., 2017)

### *1.3.3-Disturbo del sonno*

Unitamente allo studio dell'epilessia, il nostro gruppo si è proposto negli anni di approfondire le caratteristiche del sonno in pazienti con sindrome di Mowat-Wilson. I risultati di uno studio videopolisonnografico con registrazione di almeno un'intera notte di sonno, sono stati

recentemente pubblicati (Di Pisa et al., 2019; Evans et al., 2016) e mostrano, rispetto ai controlli sani, un importante disturbo del sonno nei pazienti con sindrome di Mowat Wilson, in linea con quanto precedentemente emerso dalla somministrazione dei questionari sul sonno SDSC (Sleep Disturbance Scale for Children) consegnati ai genitori. In particolare, nei pazienti con sindrome di Mowat Wilson si assiste ad una netta riduzione del tempo totale di sonno con importante incremento dell'indice di arousal e dell'indice WASO (Wake After Sleep Onset). Effettuando la registrazione EEG prolungata durante il sonno, è stato inoltre possibile osservare come nei pazienti in età scolare si assista ad una netta attivazione delle anomalie parossistiche in sonno (punta-onda a prevalenza anteriore) fino ad andamento subcontinuo/continuo. Quadri di ESES definiti in base al criterio elettroencefalografico (anomalie >85% del sonno NREM) sono però conclusivamente stati osservati in 2 soli pazienti. Ulteriore riscontro è una aumentata rappresentazione della fase N3 del sonno NREM.

#### *1.3.4-Disturbo e caratteristiche del movimento*

Per quanto concerne le caratteristiche motorie, le peculiarità descritte con maggior ricorrenza sono la marcia su base allargata e la tendenza a mantenere gli arti superiori flessi al gomito senza alterazioni del tono in termini di ipertonia/distonia e/o iniziali retrazioni tendinee. Diversamente in circa l'80% dei pazienti è descritta ipotonia generalizzata.

Sono spesso osservabili alcune stereotipie a carico delle mani, del capo e del distretto orobuccale (a tipo bruxismo) finora non dettagliatamente caratterizzate. (Ivanovski et al., 2018)

#### *1.3.5-Epilessia*

La descrizione più completa del fenotipo elettroclinico nei pazienti con sindrome di Mowat Wilson è stata pubblicata nel 2013 e descrive 22 casi. Diciannove di questi pazienti sono inclusi anche nello studio attuale, avendo avuto modo di osservare l'evoluzione a lungo termine del fenotipo epilettico.

Quanto emerso dal primo lavoro comprendeva l'osservazione di frequenti crisi febbrili prima dell'esordio definitivo di epilessia che era descritto avvenire più spesso in età prescolare con crisi focali motorie frequentemente con secondaria generalizzazione. Veniva inoltre segnalata la frequente presenza di assenze atipiche. Per quanto riguarda l'attività di fondo all'elettroencefalogramma si riscontrava rallentamento dell'attività di veglia e sonno nella maggior parte dei pazienti. Le anomalie parossistiche erano descritte come punta-onda di ampio voltaggio a carico delle regioni frontali, spesso tendenti alla diffusione. In sonno veniva segnalato un netto incremento in frequenza delle anomalie parossistiche sopracitate con tendenza all'assumere andamento subcontinuo-continuo. ([Cordelli et al. 2013](#))

In merito all'ESES sono inoltre stati pubblicati i dati di un'altra casistica composta da 5 pazienti che avevano effettuato videopolisonnografia notturna. ([Bonanni et al., 2017](#)) Nella totalità dei casi viene descritto un quadro elettroencefalografico compatibile con ESES. Meritevole inoltre di approfondimenti la constatazione che in 3/5 pazienti, la comparsa dell'ESES sarebbe stata concomitante con regressione cognitiva/motoria. In aggiunta, a seguito di terapia con corticosteroidi, in 2/3 di questi pazienti veniva riportato un miglioramento in termini cognitivi oltre che elettroclinici.

#### *1.4-Gene ZEB2*

##### *1.4.1-Struttura del gene ZEB2*

Il gene ZEB2 codifica per la proteina omonima che appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione molto ristretta, il cui altro unico componente risulta essere ZEB1 (denominato anche EF1). La struttura che li accomuna è costituita da un omeodominio che separa, alle estremità, due cluster di domini zinc-fingers (il primo N terminale ed il secondo C terminale), entrambi in grado di legare il DNA con una affinità assai elevata ([Nells et al., 2003](#); [Verschueren et al., 1999](#); [Higashi et](#)

al. 2002). Per quanto riguarda ZEB2, esso è espresso in numerosi tessuti ed il suo ruolo è fondamentale a più livelli per un corretto sviluppo embrionale. Negli studi effettuati finora principalmente su topi knockout, è stato possibile definire come si costituiscono problematiche di diverse entità, coinvolgenti diversi tessuti, in base allo stadio di sviluppo embrionale in cui si disattiva ZEB2. Il primo nome che fu attribuito all'attuale ZEB2, SIP1, rispecchiava l'importante interazione con il cofattore di trascrizione SMAD, proprietà che ZEB1 non possiede (Epifanova et al., 2018). ZEB2 è una proteina di 140 kDA, la sua lunghezza totale è di 1215 aminoacidi nel topo e 1214 nell'uomo. Essa agisce principalmente come repressore della trascrizione ma può comportarsi, in situazioni specifiche anche da attivatore. (Conidi et al., 2011; Weng et al., 2012). Un ruolo importante rispetto alla declinazione che ZEB2 può assumere è la presenza di diversi cofattori. (Chng et al., 2010) I domini Zinc finger sono tra i più comuni e conservati siti di legame con il DNA nelle cellule eucariote, la loro integrità è fondamentale per una corretta interazione con lo stesso. Questa constatazione è importante da ricordare quando si considerano i potenziali effetti di una mutazione del gene in base alla sua localizzazione: una mutazione a livello dei domini Zinc-finger potrebbe infatti impedire il legame con il DNA rendendo la proteina completamente inefficace e probabilmente inducendola verso la degradazione. Allo stesso modo però, una mutazione che permetta di mantenere intatto il dominio Zinc-finger potrebbe sì facilitare una residuale funzionalità della proteina con legame al DNA ma, d'altro canto, potrebbe anche renderne più complessa la degradazione con accumulo di materiale tossico a livello citoplasmatico.

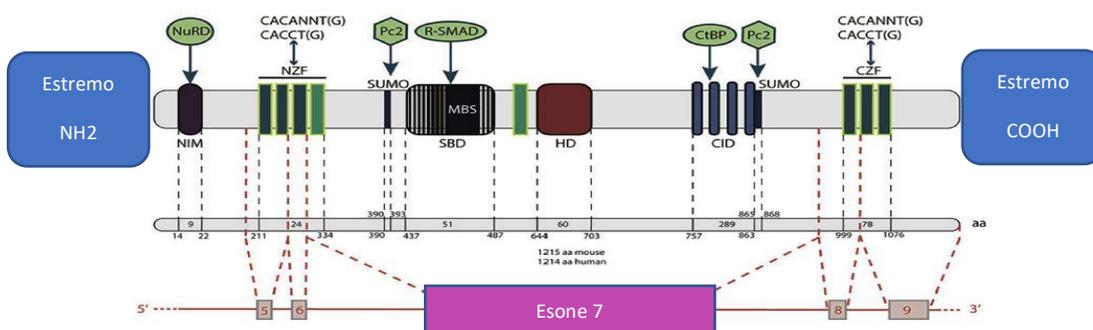


Figura 1. Struttura del gene ZEB2. (Modificata da Epifanova et al., 2018)

Tra le regioni più importanti meritano un approfondimento:

-Nurd (estremo N-terminale) e CtBP (estremo C terminale): entrambi sono due corepressori adiuvanti la funzione di ZEB2, il primo agirebbe tramite mediazione di P300/PCAF ([Postigo and Dean 1999](#); [van Grunsven et al., 2007](#); [van Grunsven et al., 2006](#))

-SUMO 390-393 e SUMO 865-868: due siti di sumoilazione post-traduzionali per ZEB2, una variazione con loro coinvolgimento può compromettere l'attività di repressore di ZEB2 ([Long et al., 2005](#))

-SBD (SMAD BINDING DOMAIN): come indica il nome, è a questo livello che avviene il legame con le proteine SMADS (Classe R e I; Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 7). Questa classe di proteine ha un ruolo chiave nella modulazione del segnale TGF-beta mediato ([Verschuere et al., 1999](#); [Kretzschmar and Massague, 1998](#)). Esse sono attivate dal legame con i complessi ligando-recettore TGF-beta e BMP. ([Attisano and Wrana, 2000](#); [Massague, 2012](#)) Da sottolineare come tra ZEB2, TGF-beta e BMP si articolino in una complessa interazione di attivazione/inattivazione reciproca.

#### *1.4.2-Ruolo di ZEB2 a livello del sistema nervoso centrale e periferico*

Nel 2013 due articoli confermavano in modo indipendente il ruolo del fattore di trascrizione SIP1 (conosciuto anche come ZEB2 o ZFH1B) nel regolare la differenziazione e migrazione degli interneuroni GABA-ergici agendo a monte di un altro fattore di trascrizione, Nkx2-1, che presenta un ruolo chiave in tal senso. ([Van den Berghe et al., 2013](#); [Tomassy et al., 2013](#))

Sia gli interneuroni corticali che striatali risultano derivare da cellule progenitrici a livello della eminenza gangliare mediale. Durante lo sviluppo embrionale, i meccanismi con cui le sottopopolazioni interneuronali si differenziano tra loro e, di conseguenza, si collocano in determinate strutture all'interno del sistema nervoso centrale non sono ancora del tutto

chiariti. Tuttavia, studi sperimentali hanno dimostrato ripetutamente che la perdita/disfunzione di Nkx2-1 provoca importanti alterazioni nella differenziazione e migrazione degli interneuroni GABAergici (e di quelli colinergici) che variano tra loro in base al periodo evolutivo durante il quale viene a manifestarsi la mancata attività di Nkx2-1. In particolare, nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, la presenza di Nkx2-1 è essenziale nel differenziare gli interneuroni nelle sottopopolazioni (striatali e corticali) fisiologicamente derivanti dall'eminenza gangliare mediale (interneuroni GABAergici Parvalbumina positivi PV+ e Somatostatina positivi Sst+) piuttosto che nell'attribuirgli un'identità analoga alle popolazioni di interneuroni derivanti dalle strutture più dorsali, a livello della eminenza gangliare laterale. In caso di assenza di Nkx2-1 dunque, in queste fasi precoci di sviluppo embrionale, si assiste ad una drastica riduzione del numero degli interneuroni GABA-ergici sia a livello corticale che striatale. Se, al contrario, la mancanza di Nkx2-1 impatta più tardivamente, il numero di interneuroni GABAergici totale non subisce variazioni ma sarà nettamente preponderante una sottopopolazione di essi CR+/VIP+ (Calretinina positivi; Peptide Intestinale Vasoattivo positivi) al livello corticale, i quali normalmente derivano dalla eminenza gangliare caudale. Infine, nelle fasi più tardive, il persistere dell'espressione di Nkx2-1, permetterebbe agli interneuroni GABAergici di essere respinti dallo striato e migrare verso la corteccia cerebrale.

Tornando all'impatto di SIP1 nella regolazione su Nkx2-1, la prima considerazione riguarda il suo ruolo nel modificare l'entità di espressione di Nkx2-1 negli interneuroni GABAergici (derivanti dalla eminenza gangliare mediale) che si trovano inizialmente a livello striatale e devono iniziare a migrare dorsalmente per raggiungere la corteccia. Se Nkx2-1 resta altamente espresso, tali interneuroni non subiscono la fisiologica repulsione da parte della regione striale (e di altre regioni del telencefalo ventrale) dove restano dunque ectopicamente collocati. In sintesi, in assenza di SIP1, Nkx2-1 non può essere fisiologicamente downregolato, facendo sì che gli interneuroni GABAergici

ad origine dalla eminenza gangliare mediale non raggiungano la corteccia. Si noti come, mentre Nkx2-1 possiede un ruolo anche nella differenziazione degli interneuroni colinergici, la alterazione di SIP1 impatti esclusivamente sulla concentrazione degli interneuroni GABAergici a livello corticale.

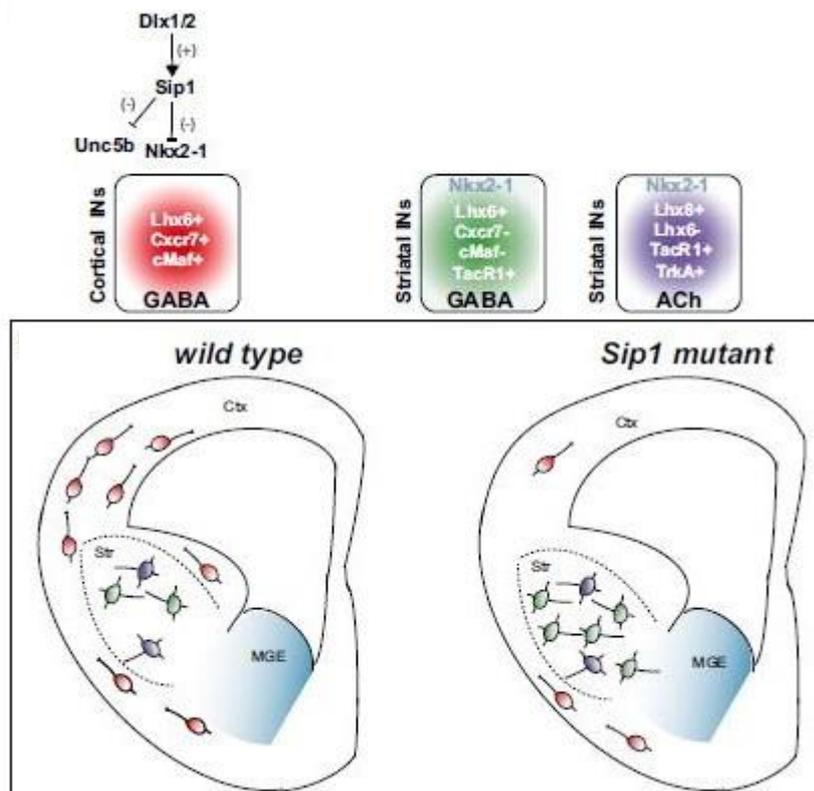


Figura 2. Alterazioni della migrazione e differenziazione degli interneuroni GABAergici a livello corticale nel modello murino mutato per ZEB2/SIP1. (Modificata da Tomassy et al., 2013)

Nel corso degli anni alcuni studi hanno aggiunto come Sip1 non intervenga sulla migrazione solo tramite Nkx2-1 ma anche tramite Unc5b. Per quanto riguarda invece i fattori che intervengono a monte di Sip1, Dix2 è stato individuato come suo regolatore positivo.

In aggiunta al ruolo di Sip1 nella regolazione della migrazione neuronale tramite Nkx2-1, alcuni studi hanno mostrato come nel topo knockout per SIP1, siano downregolati numerosi trascritti prevalentemente espressi a livello corticale (Cxcr4, Gria1, Ets1, Cxcr7, Grik1, Cntnap4, Grip1, Chl1, Cacng2, Csdc2, Scn1a, Cux2) mentre sono iperespressi alcuni geni normalmente presenti a livello degli interneuroni GABAergici striatali (Nkx2-1, TacR1+ e NYP). Questo riscontro è stato ottenuto

prelevando gli interneuroni rimasti “fermi” a livello del subpallido nel modello murino mutato. L’esatta combinazione di geni iperespressi ed ipoespressi non è ancora stata chiarita in modo univoco, quello che appare certo è che, in assenza di SIP1, gli interneuroni GABAergici mantengano preferenzialmente caratteristiche molecolari rappresentative delle sottopopolazioni striatali a scapito di quelle corticali. Si è confermata inoltre nel tempo la selettività di SIP1 nell’impatto sugli interneuroni GABAergici versus quelli colinergici. Nella complessità di quanto esposto va anche considerato che non è a tutt’oggi chiaro se e come, gli interneuroni GABAergici che riescono (in piccola quantità) a raggiungere comunque la corteccia, a fronte di alterazioni di Sip1, presentino profili di espressione genica almeno in parte alterati con potenziale condizionamento della loro funzione. Dati preliminari mostrerebbero una loro espressione genica sovrapponibile a quella dei “regolari” interneuroni corticali. L’ipotesi più accreditata è infatti che sia da considerare anche il ruolo dell’ “ambiente” in cui si trovano gli interneuroni: in base alla loro collocazione ectopica a livello striatale viene a modificarsi il loro profilo di espressione genica; al contrario, se la migrazione a livello corticale riesce ad essere preservata, si suppone che gli interneuroni acquisiscano il loro “corretto” profilo di espressione genica e preservino la propria funzione. Tuttavia non esistono dati certi a riguardo.

A latere di questo principale tema di ricerca, alcuni significativi studi hanno inoltre imputato a Sip1 altri ruoli chiave nel corretto sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico. E’ importante ribadire come gli studi siano stati finora condotti quasi esclusivamente sul modello di topo knockout e sottolineare come in esso la mutazione debba essere provocata in omozigosi per ottenere fenotipo significativo mentre in eterozigosi si osservi un fenotipo molto lieve. Sono in fase di studio alcuni modelli su organoidi di cellule embrionali ed anche modelli con iPSc (induced pluripotent stem cells) che potrebbero, per alcuni aspetti, essere maggiormente informativi circa le funzioni del gene nel

neurone umano. Infine va evidenziato come ZEB2 non risulti impattante esclusivamente durante lo sviluppo embrionale ma anche nella neurogenesi postnatale.

Per quanto riguarda le diverse fasi dello sviluppo embrionale:

- La mutazione di ZEB2 avviene durante la fase di formazione della cresta neurale e del tubo neurale: non si assiste alla completa chiusura del tubo neurale (Van de Putte et al., 2003). Inoltre, a livello della cresta neurale, tramite riduzione del segnale BMP-Smad mediato, non si svolge la fisiologica differenziazione tra ectoderma epidermico e neuroectoderma (Hegarty et al., 2013). In aggiunta, a causa della alterata interazione con Cdh1 (e-caderina) anche la transizione tra epitelio e mesenchima risulta inficiata poiché ZEB2 appare esserne un fondamentale regolatore (Rogers et al., 2013). E' stato poi dimostrato che in assenza di ZEB2 non vi è corretta differenziazione/formazione delle cellule che costituiranno il plesso nervoso a livello enterico (da cui deriverà il morbo di Hirschsprung) né delle cellule che si apprestano a divenire la componente muscoloscheletrica a livello cranico (da cui la microcefalia e i dismorfismi). (Van de Putte et al., 2007) Per concludere l'up-regolazione di ZEB2 unitamente a quella di Sox2 è indispensabile nella formazione definitiva delle cellule staminali neuronali a livello del neuroectoderma nel topo.
- La mutazione di ZEB2 avviene durante lo sviluppo della neocorteccia e dell'ippocampo: in alcune fasi dello sviluppo embrionale (non troppo precoci: è stata riscontrata un'elevata espressione di ZEB2 nei neuroni ippocampali post-mitotici contrariamente a quanto osservato nelle cellule progenitrici) si osserva una degenerazione apoptotica delle cellule dell'ippocampo fino a completa sparizione in particolare delle cellule del giro dentato. Essa sarebbe dovuta alla non più efficace inibizione di Sfrp1 (effettore della via di trasduzione "Wnt non canonical" promuovente l'apoptosi) normalmente effettuata da ZEB2 con sbilanciamento a sfavore di JNK (effettore della via di trasduzione "Wnt non canonical")

inibente l'apoptosi). (Miquelajauregui et al., 2007; Lee et al., 2000; Davies and Tournier, 2012)

- La mutazione avviene al termine dello sviluppo neuronale, all'inizio della gliogenesi: in condizioni fisiologiche, la gliogenesi nella neocorteccia inizia al termine della neurogenesi. L'assenza di ZEB2 provoca up-regolazione di Fgf9 nelle cellule neocorticali post-mitotiche con conseguente prematura fine della neurogenesi ed inizio precoce di produzione di un più alto numero di astrociti. (Seuntjens et al., 2009) Le mutazioni di ZEB2 influenzano inoltre lo sviluppo postnatale delle cellule staminali a livello del telencefalo dorsale con incremento dei GFAP + astrociti tipo B. Essi vanno poi a collocarsi a livello del sistema migratorio dorsale, fisiologicamente attraversato dalle cellule staminali che si dirigono verso il bulbo olfattorio. (Nityanandam et al., 2012) Anche a livello cerebellare ZEB2 appare influenzare la corretta differenziazione in cellule di Purkinje. (He et al., 2018) Il suddetto gene partecipa inoltre alla differenziazione delle diverse sottoclassi di oligodendrociti attraverso interazione alterata con Smad7. (Weng et al., 2012) Lo stesso gruppo di ricercatori ha infine evidenziato la necessità del corretto funzionamento di ZEB2 (reclutante il corepressore NuRD e inibente l'asse di signaling Notch-Hey2) per la maturazione delle cellule di Schwann soprattutto in termini di mielinizzazione. Questa funzione sarebbe attuata anche tramite l'inibizione di due regolatori negativi della maturazione delle cellule di Schwann (Sox2 e Ednr). (Quintes et al., 2016) In modo analogo esso sarebbe fondamentale in termini più generali per la mielinizzazione e per provvedere alla riparazione di eventuali danni delle guaine mieliniche anche a livello del sistema nervoso periferico.

Alcuni recenti articoli hanno inoltre dimostrato che la downregolazione di ZEB2, rendendo inefficace l'inibizione attuata fisiologicamente sul signaling BMP, provocherebbe una iperinnervazione in termini dopaminergici dello striato. Le cellule striatali ricevono infatti le afferenze assionali dei

neuroni dopaminergici collocati a livello del tronco encefalico (popolazione di neuroni catecolaminergici maggiormente rappresentata in questa sede) e rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione del movimento volontario e della memoria di lavoro. ([Hegarty et al., 2017](#); [Roepers, 2013](#))

L'ultimo punto della attuale dissertazione si concentrerà nuovamente sul coinvolgimento di ZEB2 rispetto all'omeostasi strutturale e funzionale all'interno dei circuiti corticali, trattandosi dell'argomento di maggior interesse rispetto alla ricerca di meccanismi etiopatogenetici alla base dell'epilessia. In questo ambito, ZEB2 controllerebbe un ulteriore successivo passaggio critico nello sviluppo e crescita delle proiezioni assionali a livello neocorticale (in particolare delle cellule piramidali). E' noto che nei pazienti affetti da sindrome di Mowat Wilson sia spesso presente in grado variabile ipoplasia del corpo calloso sia con forme parziali che con totale agenesia. Nel topo knockout per ZEB2 svariati tratti assionali a partenza corticale sono coinvolti tra cui: corpo calloso, commissura anteriore (interemisferici) e tratto corticospinale (apparentemente conservato invece il tratto corticotalamico). In aggiunta ZEB2 contribuirebbe alla corretta formazione dei circuiti intracorticali intraemisferici tramite la adeguata arborizzazione ed organizzazione della rete assonale. La lunghezza media degli assoni dei neuroni corticali nel topo ZEB2 knockout è significativamente ridotta rispetto a quella del topo wild-type. Entrambi questi effetti sembrerebbero imputabili al mancato effetto di ZEB2 su Ninein (una proteina microtubulo-associata). ([Srivatsa et al., 2015](#)) Proseguendo nella trattazione degli effetti di ZEB2 a livello della neocorteccia, Turovskaya et al. hanno inoltre recentemente dimostrato come abbia un importante ruolo nel mantenere l'attività dei recettori NMDA-, AMPA- e KA-. Il meccanismo molecolare alla base di questo processo non è ancora stato chiarito. ([Turovskaya et al., 2017](#)) Analogamente a quanto accade nei neuroni dell'ippocampo, è stato infine osservato come ZEB2 sia molto espresso nei neuroni neocorticali in postmitosi mentre sia relativamente basso nelle cellule progenitrici.

Quando vi è una mutazione di ZEB2 a livello della neocorteccia si osserva non soltanto una disorganizzazione nella formazione dei diversi strati della stessa ma anche uno sbilanciamento tra le diverse sottopopolazioni neuronali. Tali problematiche sarebbero mediate da un'iperpressione di Ntf3 (neurotropina3) ed il ruolo ipotizzato per ZEB2 sarebbe quello di fornire un feedback reciproco controllato tra i "giovani" neuroni a livello degli strati di corteccia più superficiali (secondo strato) ed i progenitori cellulari collocati nella zona ventricolare. (Seuntjens et al., 2009; Rubenstein, 2011)

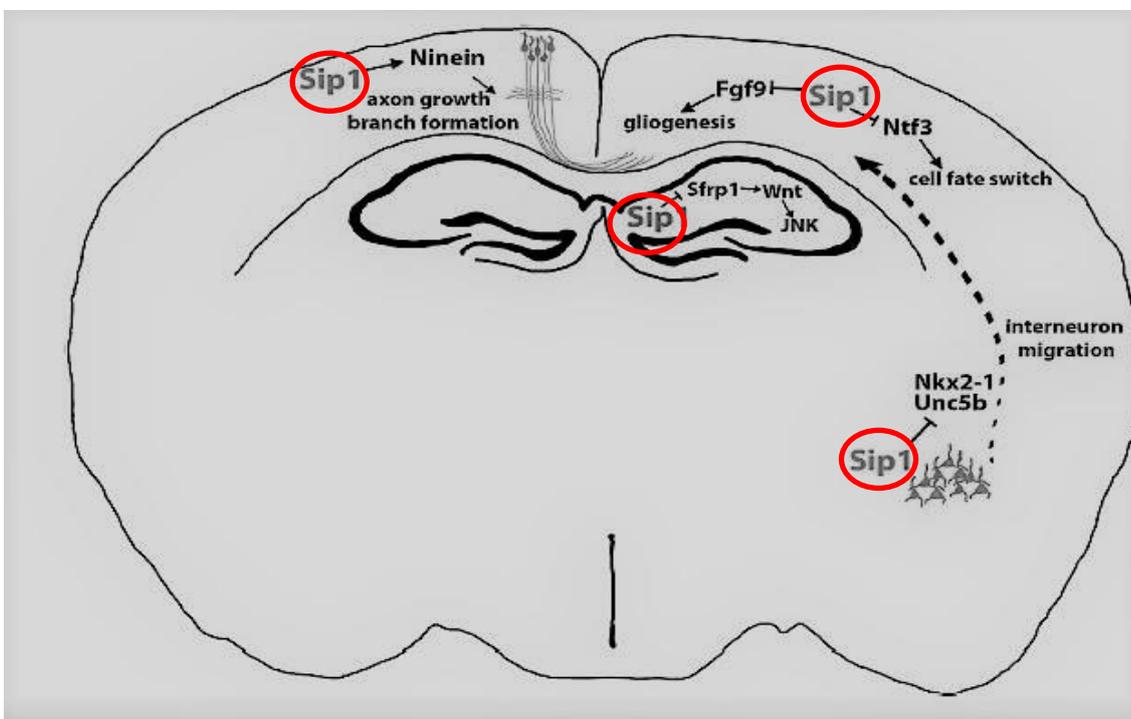


Figura 3. Differenti target di ZEB2 nell'encefalo durante lo sviluppo embrionale. (Modificata da Epifanova et al., 2018)

Sintetizzando, ZEB2 è un importante regolatore dello sviluppo del sistema nervoso, sia livello neuronale che gliale. Non solo ha un'importante funzione nella formazione morfologica e nella differenziazione di queste cellule ma è un importante regolatore delle connessioni intracorticali, intercorticali e cortico-sottocorticali (Epifanova et al., 2018). Un progressivo incremento delle conoscenze circa i suoi effetti, risulterà estremamente utile nell'approccio target-based alla sindrome di Mowat-Wilson.

### *1.5-Sindrome di Mowat-Wilson, gene ZEB2 ed epilessia: stato dell'arte*

L'epilessia è stata inizialmente descritta nel 90% dei pazienti con sindrome di Mowat-Wilson, le ultime casistiche presentate mostrano invece un'incidenza inferiore che si attesta intorno all'80%. Le recenti constatazioni in merito al ruolo di ZEB2 nel mantenimento dell'omeostasi all'interno circuiti inibitori GABAergici cortico-sottocorticali, sembrerebbero facilitare la comprensione delle manifestazioni epilettiche nei pazienti con sindrome di Mowat-Wilson, come già accennato in un precedente articolo. (Cordelli et al., 2013) In particolare l'alterata funzione di ZEB2 nella differenziazione e migrazione degli interneuroni GABAergici corticali, esitando nella riduzione di due precise popolazioni derivanti dall'eminenza gangliare mediale (PV+ e Sst+), potrebbe essere cardinale nella patogenesi dell'epilessia in questa condizione.

### *1.6 Fenotipi "Mild" e mutazioni missenso di ZEB2*

Il primo caso di mutazione missenso di ZEB2 venne descritto in un paziente in cui concomitava Trisomia 21 e presentava morbo di Hirschsprung, severa miopia e coloboma. (Gregory-Evans et al., 2004) Successivamente nel 2006 venne descritto un paziente di 2 ½ aa con alcune caratteristiche (facies, megacolon, ipoplasia del corpo calloso) della sindrome di Mowat Wilson sommate però ad ulteriori aspetti fenotipici (labiopalatoschisi e brachitelefalangia) non caratteristici di questa condizione. Dal punto di vista neurologico erano riportate diffusa atrofia cerebrale e crisi farmacoresistenti generalizzate ad esordio nel secondo anno di vita. (Heinritz et al., 2006) Un anno più tardi una ulteriore segnalazione, all'interno di un'ampia casistica, descriveva un paziente con fenotipo clinico tipico di MWS ma decorso molto severo, deceduto a 3 anni. (Dastot-Le Moal et al., 2007) In tutti questi 3 casi la mutazione si trovava al di fuori di domini noti di ZEB2.

Più recentemente uno studio ha riportato una serie di 3 casi di pazienti in cui definiscono un fenotipo mild di sindrome di Mowat-Wilson associato a mutazioni missenso di ZEB2 con esito in un allele

ipomorfico. In questi tre pazienti la mutazione era collocata all'interno del dominio C-zing finger, mentre le precedenti segnalazioni non coinvolgevano domini noti di ZEB2. Essi presentavano faccial gestalt tipica per MWS, disabilità intellettiva moderata ma non altre malformazioni congenite. Per quanto riguarda il fenotipo neurologico, la risonanza magnetica era normale in 2 pazienti mentre presentava "lieve atrofia frontale" e malrotazione dell'ippocampo nel restante caso. Un unico paziente (con risonanza cerebrale nella norma) ha presentato epilessia ad esordio nel terzo anno di vita, ben controllata dalla terapia con Acido Valproico. La compromissione del linguaggio in questi pazienti appariva molto più lieve di quanto accada solitamente nella sindrome MWS. ([Ghoumid et al., 2013](#))

Negli ultimi anni, forse in seguito all'inserimento di ZEB2 all'interno dei pannelli per epilessia, sono stati descritti due casi di mutazioni missenso responsabili di epilessia.

Nel primo caso il paziente presentava encefalopatia epilettica farmaco-resistente (pattern EEG a tipo burst suppression in epoca neonatale poi spasmi epilettici) ad esordio nel primo mese di vita e severo ritardo dello sviluppo psicomotorio. Atrofia corticale ed ipomielinizzazione venivano descritte alla risonanza magnetica cerebrale. Il paziente non presentava invece gli aspetti fenotipici peculiari di MWS (facies; malformazioni congenite). Si segnala concomitanza di mutazione di CNTNAP2 ereditata però dal genitore. ([Babkina et al., 2016](#))

Recentissima è invece la segnalazione di una paziente presentante mutazione missenso a carico di ZEB2 associata ad ulteriore mutazione, anch'essa di verosimile significato patogenetico su SCN1A sebbene ereditata dal padre (ipotizzata penetranza incompleta). In questo caso la presentazione clinica era caratterizzata da severo ritardo dello sviluppo psicomotorio, difficoltà relazionali (stereotipie, non aggancio visivo), microcefalia, pervietà del dotto arterioso, difetto interventricolare, dismorfismi faciali (ipotelorismo, radice del naso allargata), atresia e fistola

perineale. Risonanza magnetica cerebrale nella norma. Nei primi anni di vita l'EEG presentava anomalie parossistiche su entrambe le regioni frontali, a 3 anni comparivano assenze atipiche. Successivamente veniva rilevato ESES. L'epilessia nel tempo ha mantenuto andamento fluttuante; le crisi sono state spesso scatenate/peggiorate dalla febbre. Il linguaggio non è stato acquisito, la marcia permane atassica. Questo caso risulta di particolare interesse per la concomitanza di due mutazioni interessanti lo stesso pathway, nel confronto con gli altri pazienti con MWS numerose analogie possono essere fatte rispetto al fenotipo elettroclinico, tuttavia il restante quadro neurologico appare di maggior gravità. ([Nardello et al., 2020](#))

## **2. Scopo dello studio**

Lo scopo del presente studio è stato quello di approfondire le caratteristiche del fenotipo elettroclinico nei pazienti con sindrome di Mowat Wilson. In continuità con quanto precedentemente pubblicato dal nostro gruppo, abbiamo dunque proseguito la descrizione dell'epilessia e delle caratteristiche elettroencefalografiche con tre principali obiettivi: aumentare la numerosità del campione, delineare in modo più dettagliato le caratteristiche epilettologiche ed infine osservare l'evoluzione a lungo termine del fenotipo in esame. In letteratura non esistono altri lavori che si siano concentrati in modo esaustivo su questo scopo e certamente mai su un campione di queste dimensioni. Secondariamente l'attuale studio si è proposto di contribuire, in base ai risultati emersi, all'approfondimento della conoscenza dei meccanismi patogenetici implicati nelle condizioni ZEB2 relate.

## **3. Pazienti e metodi**

Studio longitudinale retrospettivo di coorte coinvolgente 40 pazienti con diagnosi confermata geneticamente di Sindrome di Mowat-Wilson (22 femmine: 18 maschi) seguiti in follow-up per una durata massima di 27 anni (durata media del follow-up 11,3 anni).

I criteri di inclusione sono stati: mutazione all'analisi molecolare coinvolgente il gene ZEB2, diagnosi clinica di sindrome di Mowat-Wilson e follow-up longitudinale a partenza dall'infanzia presso il centro di riferimento, in particolare per quanto riguarda gli aspetti inerenti alla storia di epilessia, i tracciati elettroencefalografici e gli esami di neuroimaging. E' stato scelto di non considerare i dati inerenti le valutazioni cognitive per eccessiva disomogeneità degli strumenti utilizzati.

Sono state retrospettivamente identificate tre fasce di età che potessero rispecchiare l'età prescolare, l'età scolare e l'adolescenza (0-4 anni 11 mesi = T1; 5-12 anni 11 mesi = T2;  $\geq 13$  anni = T3) ed una osservazione clinica per ciascun paziente è stata estrapolata per ciascuna fascia d'età quando possibile. Al tempo T1 è stato possibile indagare retrospettivamente 40 pazienti, al tempo T2 è stato possibile osservarne 34 ed infine al tempo T3 sono state condotte osservazioni cliniche e/o strumentali su 22 pazienti. L'età all'ultimo follow-up varia da 2 a 31 anni con una media di 12,8 anni ed una mediana di 13,9 anni.

Per quanto riguarda l'epilessia sono stati raccolti i dati inerenti alle caratteristiche semeiologiche delle crisi, la loro frequenza e la risposta al trattamento in ciascuna fascia d'età ove possibile. Per la classificazione delle crisi sono stati utilizzati i criteri ILAE del 2017.

I tracciati elettroencefalografici su carta o supporto digitale sono stati centralizzati, rianalizzati in cieco da due epilettologi esperti in pediatria e catalogati all'interno dei tre gruppi sopradescritti. Per ciascun paziente sono stati analizzati i tracciati sia di veglia che di sonno secondo due principali parametri: l'organizzazione dell'attività di fondo e la presenza di anomalie parossistiche con relativa caratterizzazione. Quando possibile, sono stati raccolti e riesaminati anche i tracciati video-elettroencefalografici corrispondenti alle crisi epilettiche. Per alcuni pazienti non è stato possibile ottenere un EEG di veglia ed uno di sonno per ciascuna fascia d'età di osservazione; tuttavia, per tutti i pazienti è stato osservato almeno un EEG di veglia ed almeno un EEG di sonno.

Le informazioni cliniche, EEG e genetiche sono state trasferite su un database elettronico e processate utilizzando sia Microsoft Excel che il software di statistica open-source JASP (JASP Team, 2016, jasp-stats.org). I dati relativi clinici ed elettroencefalografici sono stati in primo luogo analizzati attraverso metodiche di statistica descrittiva. Per le analisi di correlazione tra variabili categoriali è stato utilizzato il test del chi quadrato. In considerazione della dimensione campionaria, per il confronto tra variabili continue ordinali e variabili categoriali sono stati impiegati i seguenti test: il test U di Mann Whitney per il confronto tra variabili non appaiate; l'analisi di varianza per misure ripetute (ANOVA) con analisi post-hoc secondo il metodo Bonferroni per il confronto tra misure ripetute dello stesso parametro elettroclinico nelle tre fasce di età individuate (T1,T2,T3). Per alcune variabili elettrocliniche, sebbene fossero stati raccolti i dati relativi alle tre le fasce di età, non si è raggiunta numerosità sufficiente per il confronto attraverso il test ANOVA a causa della difficoltà nel reperimento dei dati relativi al T1 o della minore dimensione campionaria nel T3 (molti pazienti hanno età inferiore ai 13 anni all'ultimo follow up). Per tali variabili è stato pertanto effettuato un confronto attraverso il test ANOVA tra due osservazioni (T2 e T3) e/o sono state elaborate mediante statistica descrittiva.

Abbiamo considerato statisticamente significativo un p-value two-tailed di 0.05 o inferiore.

La nostra coorte comprende 19 pazienti precedentemente descritti (*Cordelli DM, Garavelli L, Savasta S, et al. Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: delineation of the electroclinical phenotype. Am J Med Genet A. 2013;161A(2):273-284. doi:10.1002/ajmg.a.35717*), in essi abbiamo ulteriormente approfondito il corso dell'epilessia soprattutto nel lungo periodo, integrando i dati clinici/elettroencefalografici dei più recenti follow-up e rianalizzando tutti i tracciati videoEEG disponibili.

## 4. Risultati

### 4.1 Incidenza dell'epilessia, semeiologia delle crisi e risposta alla terapia antiepilettica

L'epilessia è presente in tutti i pazienti tranne quattro, questi ultimi tutti di età < 5 anni al più recente follow-up. In 21 pazienti è descritto più di un tipo di crisi. In tutti i pazienti tranne uno (35 pazienti) l'esordio di epilessia si è presentato con crisi focali (secondariamente generalizzate in 14 di essi). Solo una paziente ha manifestato esordio di epilessia con crisi a tipo assenza che rappresentano l'unica tipologia di episodi nella sua storia clinica.

Le crisi focali sono state dunque riscontrate in 35/36 pazienti. L'età media di esordio risulta essere 3,48 +/- 2,26 anni (range: 13 mesi-9 anni). Questo tipo di episodi tende a persistere nella storia epilettologica dei pazienti: il paziente di età maggiore nel nostro campione con crisi focali presentava 25 anni all'ultimo follow-up.

La manifestazione clinica più frequentemente osservata è l'orientamento laterale del capo (28 pazienti), il secondo segno maggiormente riportato in termini di frequenza (21 pazienti) è un fenomeno motorio (ipertono o clonie) coinvolgente un emisoma (descritto ipsilateralmente all'orientamento del capo). In 19 pazienti viene inoltre descritta, come fenomeno iniziale delle crisi, un'alterazione parziale del contatto (verosimilmente della consapevolezza) con ridotta reattività soprattutto in termini di risposta motoria e vigilanza mantenuta. Spesso essa sarebbe seguita poi dai fenomeni motori sopradescritti. Infine segni vegetativi sono stati descritti in 9 pazienti (segnalati dai genitori dopo l'alterazione del contatto) ed in quattro automatismi.

Per entrambe le 3 osservazioni (T1, T2 e T3) le crisi focali, nella maggior parte dei pazienti, si presentavano esclusivamente in sonno. In particolare, dei 23 pazienti presentanti crisi focali al T1: 13 (56,5%) crisi esclusivamente ipniche, 3 (13%) crisi esclusivamente in veglia e 3 (13%) crisi sia in veglia che in sonno mentre di 4 pazienti non è disponibile il dato. Al T2, su un totale di 31 pazienti

presentanti crisi focali 17 (54,8%) esclusivamente ipniche, 8 (25,8%) crisi esclusivamente in veglia e 6 (19,3%) crisi sia in veglia che in sonno. Infine al T3, tra i 12 pazienti presentanti crisi focali 5 (41,6%) esclusivamente ipniche, 4 (33,3 %) esclusivamente in veglia e 2 (16,6%) crisi sia in veglia che in sonno mentre per un paziente non è disponibile il dato.

Per quanto riguarda la variabilità della frequenza delle crisi focali nelle tre diverse fasce d'età i dati sono riassunti in Tabella 1.

	PLURI QUOTIDIANE	PLURI SETTIMANALI	PLURI MENSILI	<1 CRISI/MESE	<1 CRISI/ANNO	NESSUNA CRISI	ND
T1	2 (8.3%)	2 (8.3%)	4 (16.6%)	7 (29.1%)	5 (20,83%)	0	4 (16.6%)
T2	1 (3.03%)	2 (6.06%)	8 (24.2%)	4 (10%)	4 (10%)	15 (45%)	2 (6.06%)
T3	0	0	0	2 (9.09%)	5 (22.7%)	15 (68%)	0

Tabella 1. Frequenza delle crisi focali nelle diverse fasce d'età

Nella storia clinica dei pazienti, 21 di essi avevano presentato crisi in febbre nei primi anni di vita (età media all'esordio 1,49 +/- 0,82 anni). Tutti questi pazienti hanno poi successivamente presentato crisi senza febbre.

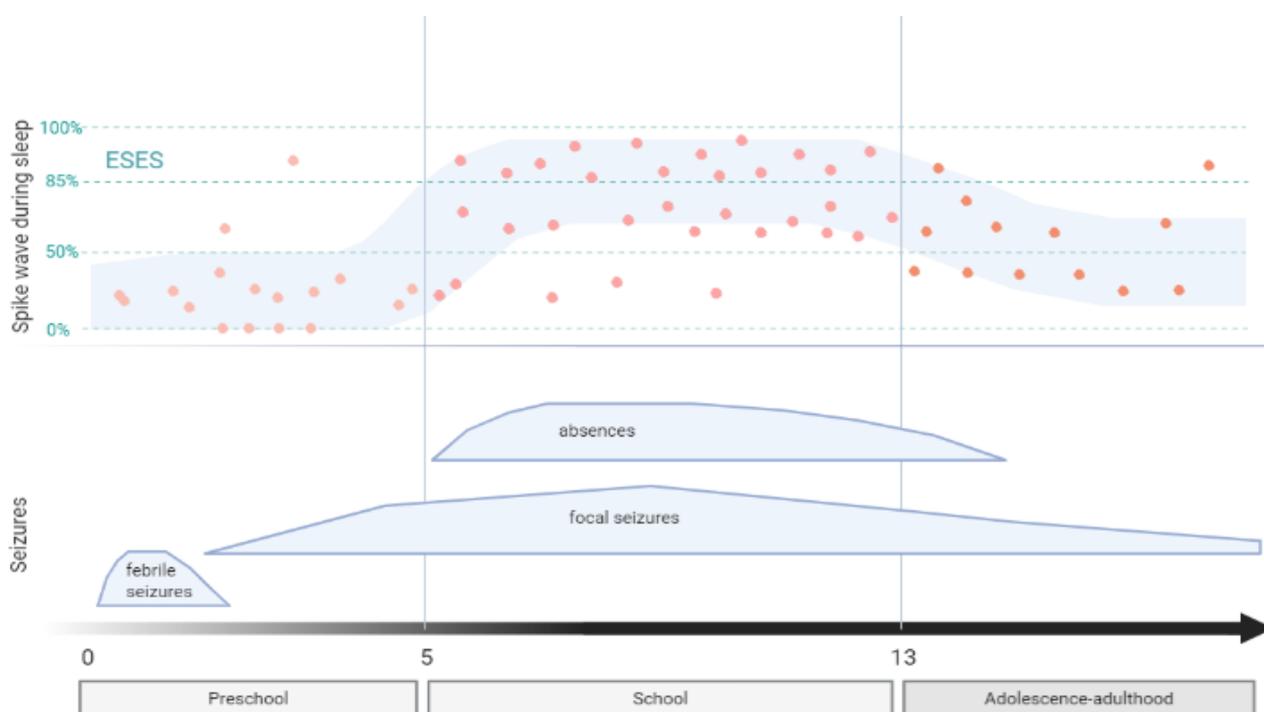


Figura 4: Il grafico mostra la distribuzione della tipologia di crisi e l'attività EEG nel corso delle diverse fasce d'età nella nostra coorte. Ottenuto tramite Biorender.

Per quanto riguarda le crisi a tipo assenza invece, esse sono state riportate in 22 pazienti (età media di esordio 7,24 +/- 0,8 anni). Nessun paziente ha presentato assenze prima dei 6 anni né dopo i 15 anni. La variabilità della frequenza delle crisi a tipo assenza per le diverse fasce d'età è riassunta in Tabella 2.

	PLURI QUOTIDIANE	PLURI SETTIMANALI	PLURI MENSILI	<1 CRISI/MESE	<1 CRISI/ANNO	NESSUNA CRISI	ND
T1	0	0	0	0	0	0	0
T2	4 (20%)	6 (30%)	4 (20%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)
T3	1 (5.9%)	1 (5.9%)	0	1 (5.9%)	0	13 (76%)	0

Tabella 2: Frequenza delle crisi a tipo assenza nelle diverse fasce d'età

Considerando complessivamente le crisi focali sommate alle crisi a tipo assenza, i pazienti seizure free risultano essere il 17,6% in T2 ed il 54.5% in T3.

Sono infine state descritte crisi miocloniche in 3 pazienti, tutti di età inferiore ai 3 anni.

Non sono emerse differenze nella distribuzione della tipologia delle crisi tra maschi e femmine.

Non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative tra le anomalie del corpo calloso e la probabilità di presentare epilessia. In particolare non vi è differenza tra il gruppo di pazienti con anomalie del corpo calloso e quello privo di anomalie del corpo calloso rispetto alla manifestazione di crisi a tipo assenza. Il dato era analizzabile in 38 pazienti.

Agenesia CC	Assenze (si; no)			Chi-Squared Tests		
	no	si	Totale	Value	df	p
no	10	17	27	X <sup>2</sup>	0.983	1 0.321
si	6	5	11	N	38	
Totale	16	22	38			

Figura 5. Statistica inerente la correlazione agenesia del corpo calloso/crisi a tipo assenza

Sono stati ottenuti i tracciati elettroencefalografici delle crisi focali in 7 pazienti; in cinque di essi è stato possibile osservare direttamente la registrazione con videoEEG. In 6/7 pazienti le crisi sono state registrate in sonno (in particolare in fase 2 di sonno NREM). Tutti gli episodi visionati

direttamente presentano analogie semeiologiche e caratteristiche simili in termini di durata e sequenza di svolgimento. Coerentemente con quanto emerso dai dati delle cartelle cliniche, l'orientamento di capo e occhi ricorre nella maggior parte dei pazienti. Importante sottolineare che le crisi osservate possano tutte essere definite ipomotorie con iniziale verosimile inibizione della risposta motoria e successiva possibile comparsa di fenomeni motori che restano comunque molto sottosoglia e difficili da riconoscere (fluttuanti, clonie di piccola ampiezza che si ripetono con una bassa frequenza). Tutte le crisi presentano lunga durata. In 3/5 pazienti si è resa necessaria la somministrazione di benzodiazepine per interrompere la crisi con risoluzione. In 3/4 degli episodi avvenuti in sonno il risveglio non è stato immediato ma preceduto da una lunga crisi elettrica senza evidente correlato clinico. Nell'unico caso in cui la crisi avviene in veglia, la registrazione inizia con episodio già in corso e vengono in seguito registrate numerose crisi subentranti sovrapponibili tra loro.

	Veglia/ sonno	Semeiologia	Durata	EEG critico	Segni motori facilmente riconoscibili	Risoluzione
1. F, 2aa 9 mesi	Sonno	Prima fase crisi elettrica prolungata poi apertura occhi ed iporeattività, segue blinking (Odx>Osn) e, successivamente, automatismi gestuali ASsn	602 sec (fase clinica 300 sec)	Punte e punta-onda reclutanti sulle regioni del vertice e centroparietali sn; successivo coinvolgimento temporale ed occipitale sn	No	BDZ

2. M, 4aa 8 mesi	Sonno	Prima fase crisi elettrica prolungata poi ipopnea a cui segue apertura occhi e risveglio con breve fase di iporeattività	480 sec (fase clinica <30 sec)	Punte e punta-onda reclutanti frontali e temporali anteriori sinistre con progressiva diffusione dapprima all'emisfero sinistro e poi alle regioni omologhe controlaterali	No	spontanea
3. F, 8 aa e 4 mesi	Sonno	Apertura occhi, iporeattiva, orientamento capo verso destra poi blinking bilaterale, seguono clonie di piccola ampiezza Asdx	438 sec	Punte e punta-onda reclutanti frontocentrali sinistre (importante coinvolgimento vertice) poi coinvolgimento regioni temporali medie	No	BDZ
4. F, 6 aa e 3 mesi	Veglia	Registrazione inizia con crisi già iniziata. Iporeattività. Orientamento-deviazione sguardo a sinistra associato ad incostante orientamento del capo + verosimile ipertono vibratorio ASdx, seguiti da automatismi di masticazione	145+126+360+120 sec	Punte e punta-onda reclutanti sulle regioni parieto-occipitali sinistre (importante coinvolgimento vertice) poi coinvolgimento regioni temporali posteriori dello stesso emisfero e successivamente omologhe controlaterali (sovrapponibile per le diverse crisi)	No	BDZ
5. F, 3aa 6 mesi	Sonno	Prima fase crisi elettrica prolungata poi apertura occhi ed iporeattività, orientamento incostante capo e sguardo a sn	1170 sec (fase clinica 240 sec)	Punta e punta-onda reclutanti sulle regioni fronto-centrali di sinistra e del vertice con successiva diffusione a regioni omologhe controlaterali e parietali ipsilaterali	No	spontanea
6. M, 5aa 1 mese	Sonno	Apertura occhi ed orientamento verso sinistra	ND	Punte reclutanti in parietale dx	No	spontanea
7. M, 3aa 5 mesi	Sonno	Alterazione del contatto, iporeattività, al termine clonie di piccola ampiezza generalizzate	ND	Punte e Punta-onda reclutanti frontocentrali	No	ND

Tabella 3: Caratteristiche elettrocliniche delle crisi focali registrate (in grigio i pazienti di cui non è stato direttamente visionato videoEEG della crisi)

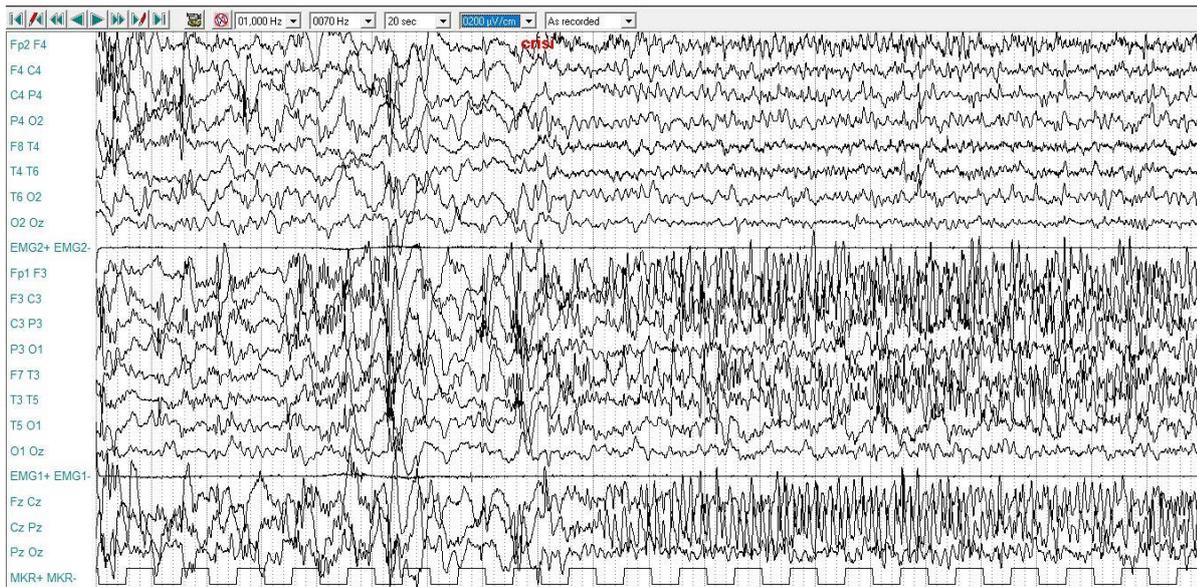


Figura 6: Tracciato EEG corrispondente alla crisi focale nella paziente 3 della tabella

Per quanto riguarda le assenze, non è stato possibile ottenere sempre una valutazione univoca in merito alla correlazione elettroclinica in quanto i tracciati ottenuti in età scolare sono più spesso ricchi in veglia di frequentissime anomalie generalizzate a prevalenza frontale, di ampio voltaggio a circa 3 hz a tipo punta-onda irregolare, raccolte spesso in sequenze, talvolta prevalenti su un solo emisfero. In aggiunta, a causa del grado di disabilità intellettiva moderato-severo non è di facile esecuzione la valutazione completa dell'alterazione del contatto. Tuttavia durante gli episodi certi le crisi sono a tipo assenza atipica con modificazione dello sguardo/variazione della postura e rallentamento motorio (conservata la possibilità di compiere alcuni gesti finalizzati). Non evidenti fenomeni mioclonici associati.

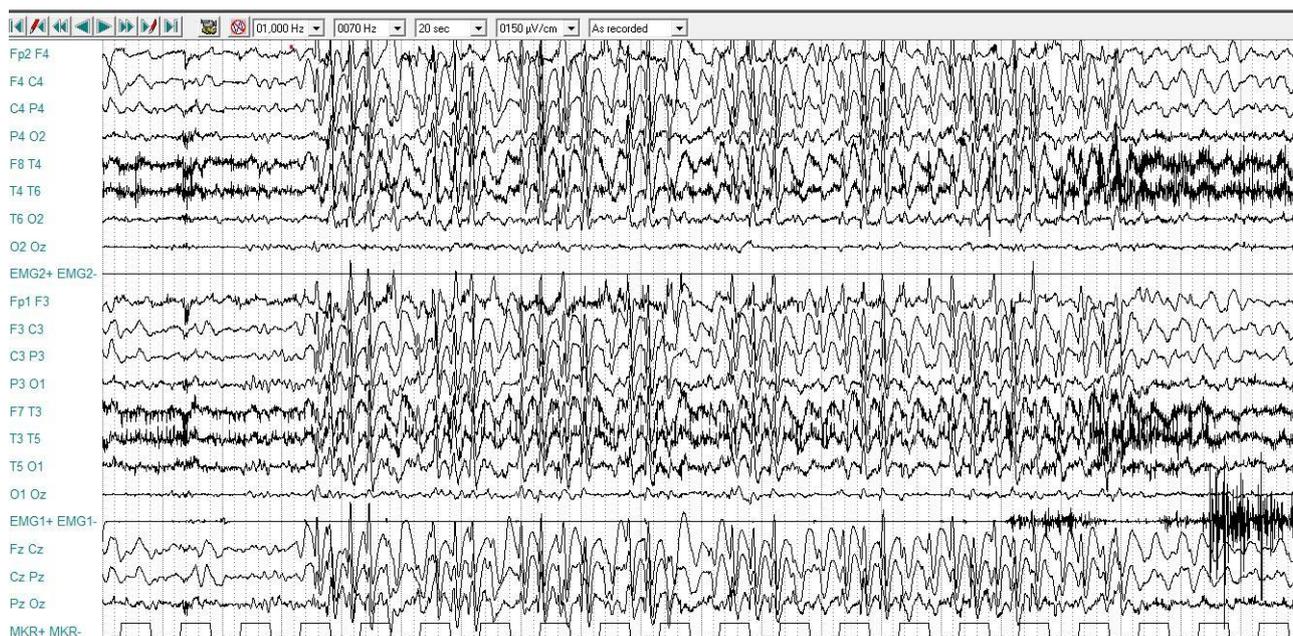


Figura 7: Tracciato elettroencefalografico corrispondente ad una assenza atipica registrata

I dati epilettologici e neuroradiologici sono riassunti nella Tabella 4.

Patient number	Gender	Age last Follow up	MRI data	Epilepsy Yes/No	Febrile seizures Yes/No (age at onset aa, mm)	Focal seizures Yes/No (age at onset aa, mm)	Absences Yes/No (age at onset aa, mm)	Myoclonic seizures
1	M	1,4	Partial agenesis of corpus callosum, temporal horns enlargement, hyperintensity of retro-trigonal white matter	No	No	No	No	No
2 (1 Cordelli et al.2013)	M	2	Ventricular temporal horns enlargement	Yes	Yes (1,1)	Yes (1,3)	No	No
3	F	2	N/A	No	No	No	No	No
4	F	2,8	Partial agenesis of the Corpus Callosum	Yes	Yes (2)	Yes (N/A)	No	No
5	M	4,5	Partial agenesis of the Corpus Callosum	No	No	Yes (N/A)	No	No
6	M	4,5	Hypoplasia of the corpus callosum	No	No	No	No	No
7	M	5	Agenesis of corpus callosum, enlarged and dysmorphic lateral ventricles	Yes	No	Yes (1,3)	No	No
8	M	5,2	Agenesis of the corpus callosum	Yes	No	Yes (5,1)	No	No
9 (6 Cordelli et al.)	F	6	Agenesis of the corpus callosum, dysmorphism of hippocampus, periventricular heterotopy	Yes	Yes (0,9)	Yes (N/A)	No	No
10	F	6,3	Hypoplasia of the corpus callosum, enlarged asymmetric and dysmorphic lateral ventricles, cyst of the	Yes	No	Yes (6,3)	No	No

			pineal gland, bilateral white matter hyperintensity						
11	F	7	Agenesis of the corpus callosum	Yes	No	Yes (1,3)	No	No	
12	F	7,4	Hypoplastic corpus callosum	Yes	Yes (0,11)	Yes (6,2)	Yes (7,2)	No	
13	M	8,5	Agenesis of the corpus callosum, dysmorphic lateral ventricles, ventricular temporal horns enlargement	Yes	No	Yes (4,4)	Yes (7)	No	
14	F	9	Mild hypoplasia of the corpus callosum, asymmetric temporal horns	Yes	No	No	Yes (7)	No	
15 (2 Cordelli et al.)	F	9,7	Hypogenesis of the corpus callosum	Yes	Yes (1,4)	Yes (2,6)	Yes (7)	No	
16	F	10	Ventricular temporal horns enlargement	Yes	Yes (1,2)	Yes (2,5)	Yes (7)	No	
17 (19 Cordelli et al.)	F	11	Agenesis of the corpus callosum, lateral ventricles enlargement	Yes	Yes (2,1)	Yes (N/A)	No	No	
18	M	11,2	N/A	Yes	No	Yes (3)	No	No	
19 (3 Cordelli et al.)	F	13	Mild diffuse brain atrophy	Yes	No	Yes (0, 10)	No	No	
20 (8 Cordelli et al.)	M	13,6	Hypoplasia of the splenium of the corpus callosum, ventricular temporal horns enlargement	Yes	Yes (1,2)	Yes (5)	Yes (7,8)	No	
21 (5 Cordelli et al.)	F	14,3	Thickness of the corpus callosum	Yes	No	Yes (5)	Yes (6,8)	No	
22 (4 Cordelli et al.)	F	14,7	Normal	Yes	Yes (1,1)	Yes (4)	Yes (8)	No	
23 (7 Cordelli et al.)	M	15,1	Thickness of the corpus callosum	Yes	Yes (1)	Yes (1,2)	Yes (7)	No	
24 (9 Cordelli et al.)	F	15,6	Thickness of the corpus callosum, lateral ventricular enlargement	Yes	Yes (2,7)	Yes (3,5)	Yes (6,9)	Yes (2,5)	
25	F	15,9	Agenesis of the corpus callosum, ventricular temporal horn enlargement, dysmorphism of the hippocampus.	Yes	No	Yes (6)	Yes (N/A)	No	
26 (18 Cordelli et al.)	F	16	Agenesis of the corpus callosum, ventricular temporal horn enlargement, dysmorphism of hippocampus, periventricular heterotopy	Yes	Yes (1,3)	Yes (1,6)	Yes (9)	No	
27	F	16	Normal	Yes	Yes (0,9)	Yes (1)	Yes (9)	No	
28 (14 Cordelli et al.)	M	16,6	Hypoplasia of the splenium of the corpus callosum, Chiari malformation type 1	Yes	No	Yes (9)	Yes (7,3)	No	
29 (15 Cordelli et al.)	M	17	Hypoplastic corpus callosum	Yes	Yes (1,11)	Yes (1,11)	No	No	
30 (10 Cordelli et al.)	F	17,5	Agenesis of the corpus callosum, lateral ventricular enlargement	Yes	No	Yes (3)	Yes (8)	No	
31 (11 Cordelli et al.)	F	17,6	Agenesis of the corpus callosum	Yes	No	Yes (0,11)	No	Yes (0,11)	
32 (13 Cordelli et al.)	F	17,8	Thickness of the corpus callosum, reduced bilateral paratrighonal white matter	Yes	Yes (2)	Yes (4)	Yes (6,3)	No	

<b>33</b> (16 Cordelli et al.)	M	18	Hypoplastic cerebellar vermis	Yes	No	Yes (3)	Yes (6)	No
<b>34</b> (12 Cordelli et al.)	F	18,6	Agenesis of the corpus callosum	Yes	Yes (1,4)	Yes (4)	Yes (7,3)	No
<b>35</b> (17 Cordelli et al.)	M	19	Ventricular temporal horn enlargement	Yes	Yes (1,1)	Yes (1,6)	Yes (N/A)	No
<b>36</b>	F	22	Hypogenesis of the corpus callosum	Yes	Yes (1,2)	Yes (1,3)	Yes (6)	Yes (2)
<b>37</b>	M	22	Hypoplastic corpus callosum	Yes	Yes (1,6)	Yes (1,6)	Yes (N/A)	No
<b>38</b>	M	25	Hypoplastic corpus callosum, ventricular temporal horns enlargement	Yes	Yes (1,4)	Yes (3)	No	No
<b>39</b>	M	25	Normal	Yes	No	Yes (6)	Yes (7)	No
<b>40</b>	M	31	Thickness of the corpus callosum, colloid cyst of the third ventricle	Yes	Yes (4)	Yes (9)	No	No
<b>TOT: 40</b>	F: 22 M:18	40	Agenesis of CC: 12 Thickness/Hypoplasia/partial agenesis of CC: 18 Ventricular enlargement: 14	Tot: 36	Tot:21	Tot: 35	Tot:22	

*Tabella 4. Sintesi principali dati epilettologici e neuroradiologici*

Trattandosi di uno studio retrospettivo, la valutazione della risposta alla terapia antiepilettica presenta alcune importanti limitazioni, tuttavia è stato possibile ricavare alcuni dati interessanti. L'acido valproico risulta essere il farmaco maggiormente utilizzato in monoterapia (26 pazienti), seguito da Levetiracetam (4 pazienti), Carbamazepina (4 pazienti), Fenobarbitale (3 pazienti), Lamotrigina (2 pazienti), Vigabatrin e Oxcarbazepina (entrambi in 1 paziente). In termini di efficacia, 19/26 pazienti in terapia con Acido Valproico presentano una riduzione in frequenza delle crisi >50% (11 seizure free). Tra i 7 pazienti in terapia con inibitori dei canali del sodio, nessuno ha ottenuto una riduzione in frequenza delle crisi > 50%. Il levetiracetam in monoterapia ha ottenuto riduzione in frequenza delle crisi >50% in 1/4 pazienti mentre ha mostrato buona efficacia in associazione con l'acido valproico (6/6 pazienti con riduzione in frequenza delle crisi >50%). Non è stato possibile distinguere per quale tipologia di crisi ciascun farmaco antiepilettico risultasse maggiormente efficace. Nella nostra popolazione soltanto due pazienti hanno effettuato terapia con corticosteroidi per l'ESES con efficacia temporanea sulle anomalie EEG in sonno senza durature correlazioni con una riduzione in frequenza delle crisi né franche ricadute in termini di performance cognitive (in un

caso riferito transitorio miglioramento della capacità di partecipazione all'ambiente). I dettagli sono mostrati in Figura 8.

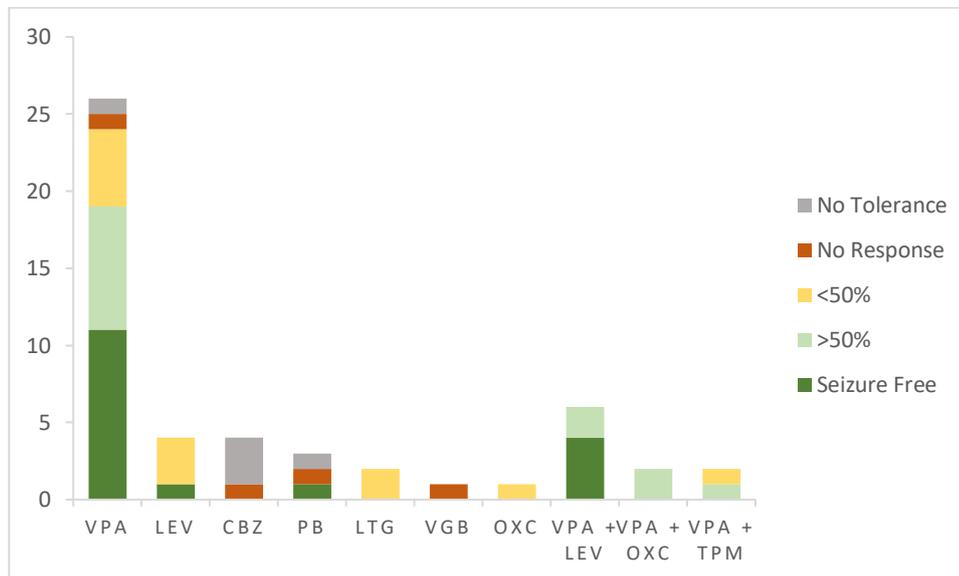


Figura 8. Risposta ai diversi farmaci antiepilettici nella nostra coorte

#### 4.2 Caratteristiche elettroencefalografiche

Gli EEG di veglia sono stati disponibili in 33/40 pazienti in T1, 32/34 in T2 e 20/22 in T3. Per un totale di 16 pazienti era disponibile un EEG di veglia per ciascuna fascia d'età. Per ogni EEG disponibile la attività di veglia è stata esaminata e le è stato attribuito un punteggio del seguente score: 1 nessun rallentamento, 2 lieve rallentamento, 3 moderato rallentamento e 4 severo rallentamento. Successivamente i punteggi attribuiti ai tre gruppi sono stati confrontati ottenendo una differenza statisticamente significativa per netta prevalenza del rallentamento dell'attività di fondo in età scolare. Per quanto riguarda le caratteristiche elettroencefalografiche distintive si segnala in veglia, in 27 pazienti, nei primi anni di vita, attività di fondo caratterizzata, sulle regioni occipitali, da frammiste sharp waves in banda alfa simile ad attività lambda ma indipendenti dalla fissazione di sguardo.

95% CI for Mean Difference						
	Mean Difference	Lower	Upper	SE	t	p bonf
T1 T2	-1.375	-1.871	-0.879	0.195	-7.036	< .001 ***
T3	-0.500	-0.996	-0.004	0.195	-2.558	0.047 *
T2 T3	0.875	0.379	1.371	0.195	4.477	< .001 ***

\* p < .05, \*\*\* p < .001  
 Note. n (T1, T2, T3): 16

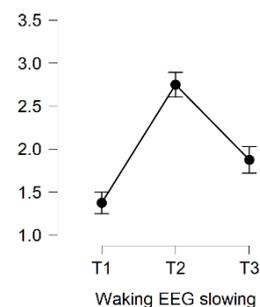


Figura 9: Distribuzione statistica del rallentamento dell'attività EEG di fondo in veglia

La totalità dei pazienti > 3 anni mostra, durante l'età prescolare, in concomitanza dell'esordio delle crisi focali se già presenti, comparsa di anomalie a tipo PO irregolari di ampio voltaggio a livello delle regioni fronto-centrali, inizialmente asincrone sui due emisferi, spesso raccolte in brevi sequenze. Negli anni successivi, si osserva progressiva tendenza alla diffusione fino alla generalizzazione, sempre con netta prevalenza anteriore. Clinicamente, durante l'età scolare, le scariche maggiormente sostenute si associano alle assenze atipiche (vedi descrizione in seguito). Durante l'adolescenza, le anomalie parossistiche generalizzate, tendono a ridursi fino a scomparsa.

In dettaglio, le anomalie EEG in veglia nelle diverse fasce d'età sono distribuite come indicato in Tabella 5.

	Anomalie EEG veglia presenti	Anomalie EEG in veglia assenti	ND
T1	15 (37,5%)	18 (45%)	7 (17.5%)
T2	31 (91.2%)	1 (2.9%)	2 (5.9%)
T3	16 (76.2%)	4 (19%)	1 (4.8%)

Tabella 5. Distribuzione delle anomalie EEG parossistiche in veglia nelle tre diverse fasce d'età

Per quanto riguarda gli EEG di sonno, essi sono disponibili in 19/40 pazienti in T1, 27/34 in T2 e 14/22 in T3. Quattro pazienti hanno 3 o più osservazioni di EEG in sonno mentre di 14 pazienti l'EEG in sonno è disponibile sia a T1 che a T2. Per ciascun EEG di sonno è stata valutata la presenza delle fisiologiche figure ipniche catalogata come segue: 1 normalmente rappresentate, 2 scarsamente rappresentate e 3 assenti. In considerazione della esigua numerosità del campione di EEG in sonno

in T3, il confronto statistico è stato effettuato tra il gruppo T1 ed il gruppo T2. Tra di essi sono emerse differenze significative con un depauperamento della struttura fisiologica di sonno in T2.

		95% CI for Mean Difference					
		Mean Difference	Lower	Upper	SE	t	p bonf
T1	T2	-0.786	-1.249	-0.323	0.214	-3.667	0.003 **

\*\* p < .01

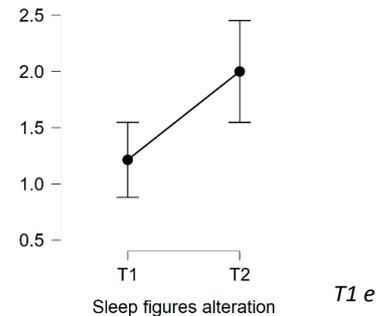
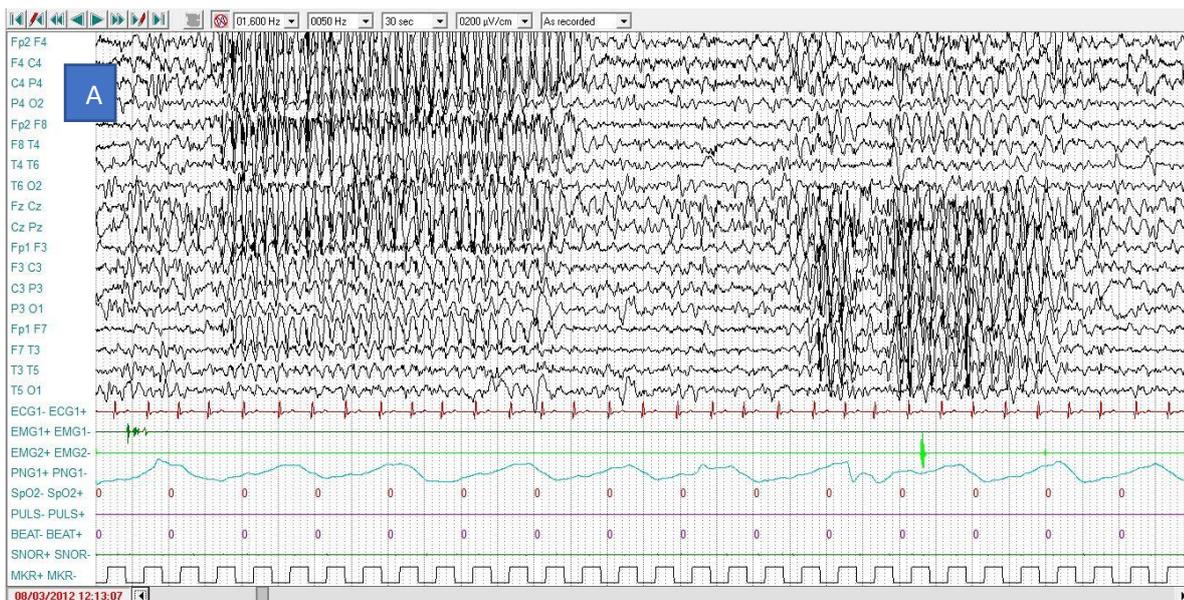


Figura 10: Rappresentazione statistica dell'alterazione delle fisiologiche figure ipniche in T2

Oltre all'organizzazione dell'attività di fondo, è stata valutata la presenza di anomalie parossistiche in sonno classificate come: assenti, presenti in <50% di sonno NREM, presenti tra 50-85% di sonno NREM ed infine presenti in >85% di sonno NREM (definendo dunque una situazione compatibile con ESES "Electrical status epilepticus in sleep" secondo criteri ILAE). I risultati sono illustrati in figura 4.

Un totale di 14 pazienti ha presentato ESES durante il follow-up: in tutti i casi tranne uno l'esordio è stato in T2; un unico paziente ha presentato esordio in T1 e solo in 2 pazienti l'ESES è proseguito anche in T3.



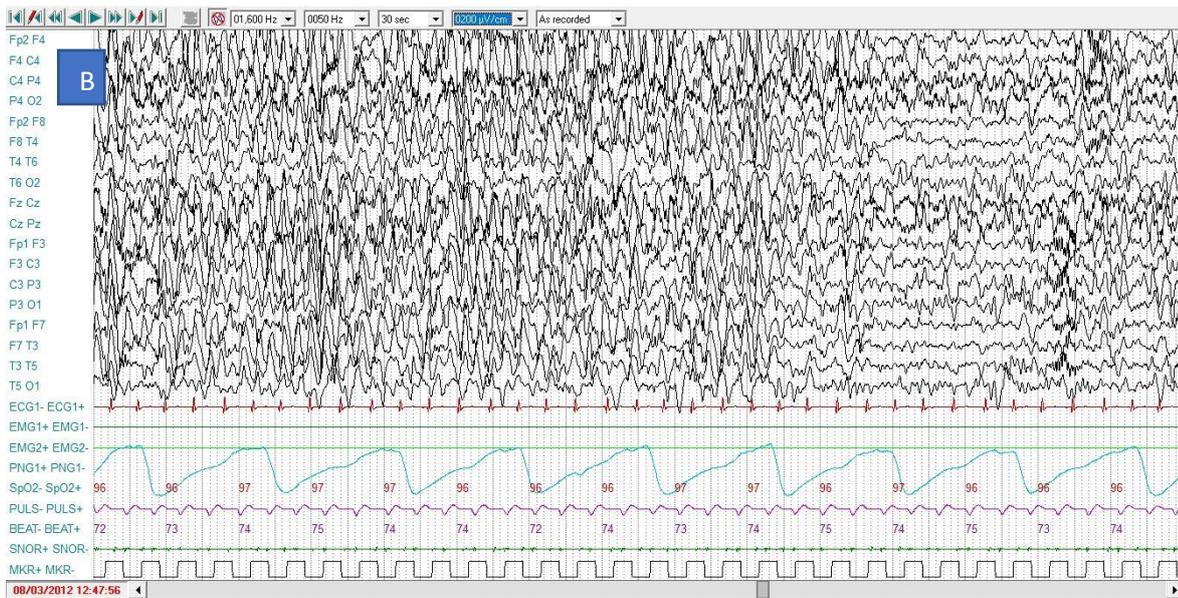


Figura 11: Scariche di anomalie EEG parossistiche durante il sonno non NREM. Si noti nella prima immagine (A) la tendenza della scarica a limitare il coinvolgimento ad un solo emisfero, pochi secondi dopo segue scarica generalizzata (B), alla fine della stessa sono visibili i fusi asincroni sui due emisferi (prima a sinistra e poi a destra)

#### 4.3 Caratteristiche genetiche

Per quanto riguarda le caratteristiche genetiche, il nostro campione si presenta omogeneo: in tutti i pazienti tranne uno il meccanismo patogenetico è l'aploinsufficienza a seguito di mutazioni loss of function (frameshift; non senso) o delezioni che arrivano a coinvolgere l'intero gene ed anche regioni adiacenti. Un'unica paziente ha mantenuto la sintesi di una proteina difettosa, senza che possa essere del tutto chiarita la sua capacità di svolgere la fisiologica funzione. Non vi sono differenze statisticamente significative tra la severità dell'epilessia ed il tipo di mutazioni a carico di ZEB2: in particolare i pazienti con ampie delezioni comprendenti l'intero gene non mostrano un fenotipo più severo (variabili utilizzate: età esordio, crisi febbrili, crisi focali, assenze, ESES). I dati genetici sono riassunti nella Tabella 6.

Patient number	cDNA variant	Protein variant	Type of variant	Exon(s)	Likely consequence	Likely explanation
1	c.714_716delG	p.(E239R fs*23)	Frameshift	6	Haploinsufficiency	c.714_716delG
2 (1 Cordelli et al.)	c.1073_1122 del48ins44	p.(S359Tfs*3)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay

<b>3</b>	c.2726dupT	p.M910Hfs*39	Frameshift	8	Haploinsufficiency	c.2726dupT
<b>4</b>	c.1426dupA	p.(M476Nfs*6)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	c.1426dupA
<b>5</b>	c.936C>A	p.C312*	Nonsense	8	Haploinsufficiency	c.936C>A
<b>6</b>	c.2053C>T	p.(Q685*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	c.2053C>T
<b>7</b>	Deletion incl entire ZEB2	na	Large deletion	All	Haploinsufficiency	Deletion incl entire ZEB2
<b>8</b>	16.7Mb deletion incl. entire ZEB2	na	Large deletion	All	Haploinsufficiency	16.7Mb deletion incl. entire ZEB2
<b>9 (6 Cordelli et al.)</b>	c.3031delA	p.(S1011Afs*64)	Frameshift	9	Synthesis of a defective protein	C-ter truncated protein: degradation? retaining some functionality?
<b>10</b>	7Kb deletion incl. 3' part of ZEB2	p.(?)	Large deletion	10 (incl. all or most of 3'UTR)	Haploinsufficiency?	7Kb deletion incl. 3' part of ZEB2
<b>11</b>	c.1102delC	p.(Q368Sfs*2)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	c.1102delC
<b>12</b>	c.460G>T	p.(E154*)	Nonsense	5	Haploinsufficiency	c.460G>T
<b>13</b>	c.2718delT	p.(A907Lfs*23)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	c.2718delT
<b>14</b>	c.1910C>G	p.(S637*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	c.1910C>G
<b>15 (2 Cordelli et al.)</b>	c.2682_2687delinsTACT	p.(L894Ffs*36)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>16</b>	c.1052_1057delGTTCTTinsTCC TC	p.(G351Vfs*19)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	c.1052_1057delGTTCTTinsTCC TC
<b>17 (19 Cordelli et al.)</b>	c.653_654insA CCG	p.(G219Pfs*21)	Frameshift	6	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>18</b>	Deletion incl. entire ZEB2	na	Large deletion	All	Haploinsufficiency	Deletion incl. entire ZEB2
<b>19 (3 Cordelli et al.)</b>	7.3Mb deletion incl. entire ZEB2	na	Large deletion	All	Haploinsufficiency	Deletion of entire allele
<b>20 (8 Cordelli et al.)</b>	c.2254dupA	p.(Y752Nfs*4)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>21 (5 Cordelli et al.)</b>	c.477_484delT GCAGTCA	p.(H159Qfs*10)	Frameshift	5	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>22 (4 Cordelli et al.)</b>	c.274G>T	p.(G92*)	Nonsense	3	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>23 (7 Cordelli et al.)</b>	c.2701C>T	p.(Q901*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>24 (9 Cordelli et al.)</b>	c.696C>G	p.(Y232*)	Nonsense	6	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>25</b>	c.310C>T	p.(Q104*)	Nonsense	3	Haploinsufficiency	c.310C>T
<b>26</b>	c.289delT	p.(W97Gfs*11)	Frameshift	3	Haploinsufficiency	c.289delT
<b>27 (18 Cordelli et al.)</b>	c.2083C>T	p.(R695*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay

<b>28 (14 Cordelli et al.)</b>	c.2180T>A	p.(L727*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>29 (15 Cordelli et al.)</b>	c.403+?_2887-?del	p.(V135G fs*5)	Intragenic deletion, frameshift	5-8	Haploinsufficiency	mRNA defect/degradation
<b>30 (10 Cordelli et al.)</b>	2.6Mb deletion incl. entire ZEB2	na	Large deletion	All	Haploinsufficiency	Deletion of entire allele
<b>31 (11 Cordelli et al.)</b>	c.310C>T	p.(Q104*)	Nonsense	3	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>32 (13 Cordelli et al.)</b>	c.540delT	p.(E181R fs*31)	Frameshift	5	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>33 (16 Cordelli et al.)</b>	c.625C>T	p.(Q209*)	Nonsense	6	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>34 (12 Cordelli et al.)</b>	c.310C>T	p.(Q104*)	Nonsense	3	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>35 (17 Cordelli et al.)</b>	c.901delC	p.(L301Cfs*37)	Frameshift	7	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>36</b>	c.609delT	p.(P204Q fs*9)	Frameshift	6	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>37</b>	4.6Mb deletion incl. entire ZEB2	na	Large deletion	All	Haploinsufficiency	Deletion of entire allele
<b>38</b>	c.1317_1321delAGGTG	p.(L439Ffs*15)	Frameshift	8	Haploinsufficiency	c.1317_1321delAGGTG
<b>39</b>	c.2083C>T	p.(R695*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>40</b>	c.1381C>T	p.(Q461*)	Nonsense	8	Haploinsufficiency	Nonsense-Mediated mRNA Decay
<b>TOT:40</b>	-	-	Frameshift: 18 Nonsense: 15 Large deletion: 5	-	Haploinsufficiency : 39? Synthesis of a defective protein: 1?	-

Tabella 6. Elenco delle mutazioni genetiche e corrispettive conseguenze

## 5. Discussione

Lo studio condotto ha permesso di descrivere dati inerenti l'epilessia nella sindrome di Mowat Wilson che non erano mai stati riportati in letteratura. Tra gli aspetti di maggior rilevanza vanno senz'altro sottolineati la numerosità del campione mai ottenuta finora e la lunga durata media del follow-up dei pazienti descritti. Nessun lavoro precedentemente svolto, aveva potuto mostrare l'evoluzione a lungo termine dell'epilessia in questi pazienti, l'attuale coorte comprende anche 8 pazienti in età adulta.

Quanto emerso dai nostri dati ci permette di confermare il meccanismo genetico alla base dell'epilessia nei pazienti con sindrome di Mowat-Wilson. Nonostante la variabilità all'interno della popolazione descritta in termini di malformazioni cerebrali, con riferimento particolare a quelle più frequenti a carico del corpo calloso ed in minor misura ai dismorfismi temporali, i pazienti mostrano fenotipi elettroclinici definitivamente sovrapponibili tra loro con un andamento età dipendente fortemente caratterizzato e costante. Fino ad oggi, nelle più significative casistiche pubblicate ([Ivanovski et al., 2018](#); [Dastot-Le Moal et al. 2007](#); [Adam MP et al., 2007](#)), l'epilessia veniva riportata nel 75-80% dei pazienti con MWS; diversamente la nostra coorte mostra epilessia nella totalità dei pazienti nella seconda fascia d'età (35 pazienti; 5-12 anni). Questo dato non era emerso nemmeno nelle ricerche che finora si erano focalizzate proprio sul fenotipo elettroclinico. ([Cordelli et al., 2013](#); [Garavelli et al., 2009](#); [Garavelli and Mainardi, 2007](#); [Miura et al., 2005](#)) In questo senso è importante sottolineare come, nel presente studio non siano stati coinvolti esclusivamente centri di epilessia ma anche di pediatria, auxologia e genetica riducendo un possibile bias di selezione. Ulteriori dati dovranno certamente confermare quanto da noi osservato ma suggeriamo che l'epilessia sia un carattere costitutivo e sempre presente nei pazienti con sindrome di Mowat Wilson, con esordio entro l'età scolare.

Sia dal punto di vista di pattern EEG che di evoluzione di epilessia, tutti i pazienti mostrano andamento fortemente sovrapponibile come riassunto graficamente in *Figura 4*: possibili crisi febbrili intorno ai 2 anni, seguite da crisi focali (più spesso ipniche) ad esordio in età prescolare, assenze atipiche in età scolare, riduzione della frequenza critica dall'adolescenza con remissione completa delle crisi o sporadiche crisi focali. Allo stesso modo il peggioramento dell'attività elettrica di fondo sia in veglia che in sonno unitamente alla maggior frequenza di anomalie parossistiche, si osservano in età scolare con miglioramento dopo l'adolescenza per entrambi gli aspetti. Un andamento età dipendente era già stato ipotizzato in letteratura senza che fosse però disponibile

un lungo periodo di follow-up che lo confermasse; in aggiunta, non era stato precedentemente possibile individuare l'esatta sequenza delle diverse manifestazioni caratteristiche del fenotipo.

(Cordelli et al., 2013; Garavelli et al., 2007)

Rianalizzando quanto citato dettagliatamente, nei primi anni di vita non si osservano evidenti alterazioni elettroencefalografiche, ad eccezione di un caratteristico background rappresentato da attività simil-lambda di aspetto aguzzo sulle regioni occipitali bilateralmente. Questa attività inabituale non era mai stata in precedenza descritta. Né l'attività di sonno né quella di veglia appaiono rallentate. Oltre la metà dei pazienti presenta crisi in febbre intorno ai 2 anni di età come già riportato da numerose segnalazioni in letteratura (Ishihara et al., 2004; Miura et al., 2005).

L'epilessia esordisce poi nella maggior parte dei pazienti in età prescolare, tra i 3 ed i 5 anni con crisi ad esordio focale. In questo senso, all'interno di un range di età d'esordio più ampio in linea con quanto descritto in letteratura (0-10 anni) la nostra coorte ha per prima mostrato un periodo più circoscritto in cui si concentrano per la maggior parte dei pazienti l'esordio di epilessia. (Adam et al., 2007) Per quanto riguarda la semeiologia, vengono più spesso descritti orientamento laterale del capo e, secondariamente fenomeni motori emilateralizzati, seguiti in frequenza da stati di ridotte responsività ed iniziativa motoria. In oltre la metà dei casi segue secondaria generalizzazione con crisi tonico-cloniche generalizzate. In merito a questo è risultato di grande interesse quanto emerso dalla diretta osservazione delle crisi di cui era disponibile videoEEG. E' stato infatti possibile riscontrare come tutte le crisi per lungo tempo risultino mute dal punto di vista clinico o paucisintomatiche. Anche quando presenti, i fenomeni motori quali emiclonie o ipertono emilateralizzato risultano di non immediato riconoscimento per il caregiver in quanto sfumati e non sostenuti nel tempo. L'ipertono è infatti di lieve entità inizialmente e, se non testato, difficile da riconoscere; le clonie sono rare e di piccola ampiezza. Si conferma la ricorrenza dell'orientamento del capo e degli occhi come segno iniziale delle crisi (forse valutati più spesso in precedenza come

fenomeni di deviazione tonica ab initio), non costantemente lateralizzati rispetto alle scariche elettriche e con probabile minor valore localizzatore di quanto precedentemente considerato. (Cordelli et al., 2013) Sommando quanto emerso dalle descrizioni semeiologiche riportate e quanto osservato direttamente, è ipotizzabile che abitualmente le crisi possano presentare una lunga fase elettrica, seguita da alterazione del contatto/ridotte reattività ed iniziativa motoria (associate o meno a fenomeni sottosoglia come orientamento occhi, blinking o incostante orientamento del capo), solo successivamente si presenterebbero dunque fenomeni motori che resterebbero comunque di lieve entità per un ulteriore lungo periodo di tempo. Per quanto riguarda la possibile definizione di un'area cerebrale epilettogena, le crisi non appaiono al momento svilupparsi univocamente dalla medesima regione sebbene le aree fronto-centro-parietali con particolare coinvolgimento del vertice risultino più spesso coinvolte. Tuttavia, alcune importanti analogie semeiologiche e la localizzazione delle scariche elettriche più frequentemente osservate in alcune regioni, potrebbero sostenere l'ipotesi di un circuito neuronale maggiormente coinvolto. Questo si discosta solo parzialmente dal ruolo primario attribuito in precedenza al lobo frontale. (Cordelli et al., 2013) In questo senso, la prosecuzione dell'osservazione diretta di un sempre maggior numero di crisi focali nei pazienti con MWS risulterà assai utile per confermare l'attuale dato così come una maggior uniformità di valutazione testuale delle crisi stesse nei diversi centri; entrambe queste considerazioni sottolineano infatti due limiti dello studio attuale. In merito alle crisi focali, può infine essere notato come, per quanto a noi possibile dedurre finora, il coinvolgimento primario dell'ippocampo appaia escludibile. Questa considerazione diviene rilevante poiché scredita ulteriormente un potenziale ruolo epilettogeno degli aspetti malformativi minori coinvolgenti il lobo temporale, confermando dunque che i dismorfismi dell'ippocampo segnalati difficilmente coinvolgerebbero la struttura della corteccia cerebrale. In aggiunta, il dato risulta nuovamente interessante anche in relazione alle ripetute segnalazioni circa un ruolo preciso di ZEB2 nel corretto

sviluppo embrionale dell'ippocampo. Un'ipotesi è che, come già suggerito e sottolineato in letteratura, l'apoptosi delle cellule dell'ippocampo indotta da mutazioni di ZEB2 nei modelli murini, sia strettamente dipendente dal momento dello sviluppo embrionale in cui inizia a manifestarsi la mutazione genetica. (Miquelajauregui et al., 2007; Lee et al., 2000; Davies and Tournier, 2012) Il risultato che appare ad oggi di immediata rilevanza clinica, è la netta predisposizione di questi pazienti a presentare crisi epilettiche di durata molto protratta con la possibilità di esitare in crisi subentranti/stato di male epilettico. A nostra conoscenza, nessun lavoro in precedenza si era soffermato su questo aspetto, rilevante dal punto di vista della gestione clinica dei pazienti. E' probabile che la sintomatologia inizialmente sfumata ed ancor più difficile da valutare in pazienti con disabilità intellettiva moderata/severa, favorisca il riconoscimento tardivo delle crisi con conseguente ritardo nella somministrazione di terapia con benzodiazepine al bisogno. Il dato inerente l'incidenza dello stato di male epilettico non è stato inizialmente considerato tra gli obiettivi di questo studio, tuttavia quanto emerso dai risultati in nostro possesso, ci spinge a ritenerlo un evento non raro, probabilmente non evidenziatosi finora anche in considerazione della gestione terapeutica relativamente semplice per quanto osservato fino ad oggi. Aneddoticamente, brevi ospedalizzazioni vengono riferite dai genitori in seguito a crisi estremamente prolungate. E' auspicabile che un corretto training dei caregivers possa sostenerli in un più rapido riconoscimento delle crisi, evitando l'instaurarsi di stati di male.

Proseguendo nella descrizione del fenotipo età dipendente, alle crisi focali, in età scolare, si sommano crisi a tipo assenza atipica, sovrapponibili per semeiologia e caratteristiche EEG. Anche in questo caso è utile sottolineare come esse non risultino di immediato riconoscimento a causa di una alterazione del contatto solo parziale con alcune iniziative motorie conservate, come precedentemente reso noto (Cordelli et al., 2013). In modo inaspettato, questo tipo di crisi non è stato più osservato nella nostra popolazione dopo i 15 anni. Anche la frequenza delle crisi focali

nella nostra coorte va riducendosi dopo l'adolescenza, dove la maggior parte dei pazienti si presenta seizure-free o, più raramente, con crisi <1 volta/anno. Questi dati sostengono definitivamente quanto in precedenza ipotizzato. (Cordelli et al. 2013)

Infine, parallelamente alla maggior espressione clinica dell'epilessia, abbiamo riscontrato un netto peggioramento delle anomalie elettroencefalografiche parossistiche, sia in termini di frequenza che di tendenza alla generalizzazione, durante l'età scolare, ugualmente in veglia ed in sonno. Anche in questo caso il ripristino "età dipendente", almeno parziale, di una fisiologica attività elettroencefalografica in veglia e sonno è stato per la prima volta statisticamente dimostrabile. Soprattutto per quanto riguarda l'ESES sarà importante, in futuro, tentare correlazioni tra il profilo cognitivo e la sua comparsa/persistenza anche al fine di stabilire l'opportunità di avviare terapie farmacologiche mirate alla sua risoluzione specialmente nei casi in cui sia già presente un buon controllo delle crisi epilettiche. In merito a questo argomento, in letteratura, uno studio su una piccola casistica suggerisce un impatto dell'ESES sulle performance cognitive dei pazienti (Bonanni et al. 2017), dato che non trova immediato riscontro nella nostra popolazione per quanto riferito dai caregivers. Valutazioni standardizzate e corrette per età, nello stesso paziente, durante l'osservazione longitudinale, eventualmente prima e dopo la terapia antiepilettica, potranno probabilmente essere utili nell'aumentare la conoscenza in tal senso.

Per quanto riguarda la terapia antiepilettica, l'acido valproico si è dimostrato essere il farmaco maggiormente efficace in monoterapia. Nonostante le crisi epilettiche presentate nei primi anni di storia di epilessia siano focali, gli antiepilettici che agiscono bloccando i canali del sodio, hanno ottenuto risultati poco soddisfacenti; non è ancora giudicabile se essi possano riacquisire un ruolo nella gestione dei pazienti adulti. Nei casi in cui l'acido valproico non risulti efficace in monoterapia, l'associazione con Levetiracetam ha mostrato una netta incisività sebbene sia da considerare come quest'ultimo dato sia relativo ad un gruppo numericamente ridotto di pazienti. Nella nostra

casistica, solo due pazienti hanno effettuato terapia con corticosteroidi per l'ESES senza la possibilità di trarre conclusioni circa l'efficacia soprattutto in termini di performance cognitive.

L'andamento clinico età dipendente così ben definito con una attenuazione della severità dell'epilessia in età adulta, la tendenza alla diffusione delle anomalie con attivazione ipnica durante l'età scolare, la risposta a determinate categorie di antiepilettici, per certi aspetti richiamano fortemente alcune forme di epilessia potenzialmente autolimitantesi dell'infanzia ed in particolare le forme di epilessia a parossismi rolandici ad evoluzione atipica. E'altresì evidente che alcune caratteristiche semeiologiche e la presunta area di insorgenza delle crisi differenzino le due condizioni. Tuttavia questa analogia ci permette di validare ancora una volta il meccanismo genetico alla base dell'epilessia nei pazienti con sindrome di Mowat Wilson. Ampliando la riflessione, si potrebbe supporre che l'epilessia correlata alla perdita di funzione di ZEB2, fattore di trascrizione di cui sono già in fase di studio le attività a livello cerebrale, possa ritenersi un buon modello per l'analisi più generale dei meccanismi alla base di alcune forme di epilessia molto diffuse. Questa considerazione fa particolare riferimento alla possibilità di approfondire le interazioni cortico-sottocorticali che condizionano probabilmente lo sviluppo, il decorso ed il mantenimento di molte epilessie. Il ruolo centrale dell'alterata regolazione reciproca tra le strutture sottocorticali e quelle corticali nella sindrome di Mowat-Wilson, è verosimilmente comprovato anche dall'osservazione di scariche generalizzate in pazienti con agenesia totale del corpo calloso, i quali contestualmente mostrano spesso elementi fisiologici del sonno asincroni ed iniziale tendenza a mantenere le scariche di anomalie parossistiche diffuse ma coinvolgenti un solo emisfero (vedi Figura 11). Ulteriormente a sostegno del ruolo chiave dei circuiti cortico-sottocorticali può verosimilmente considerarsi la risposta all'acido valproico. Un articolo recente mostra il valore della scarica inibitoria a partenza dallo striato nel protrarre le scariche di anomalie generalizzate nell'epilessia a tipo assenza. Tale scarica sarebbe "sproporzionata" poiché a sua volta scaturita in risposta a potenziali

eccitatori sovrasoglia originati dall'ipersincronismo a livello corticale. ([Arakaki et al., 2016](#)) Traslando questa ipotesi di ricerca all'epilessia nella MWS, diviene facilmente ipotizzabile che l'aumento di interneuroni inibitori concentrati a livello striatale unitamente alla loro riduzione a livello corticale, predisponga a scariche elettriche inizialmente focali ma che divengono generalizzate con estrema facilità.

Indubbiamente, il ruolo ubiquitario di ZEB2 ed i suoi molteplici effetti a livello cerebrale, rendono lo studio dei meccanismi alla base dell'epilessia complesso così come la grande difficoltà nell'ottenere un modello tridimensionale diverso dal cervello murino, tuttavia alcune osservazioni relative allo sbilanciamento tra gli interneuroni GABAergici a livello striatale e corticale sembrano essersi confermate nel tempo. Non è ancora del tutto chiarito se si tratti primariamente di un'alterazione nella migrazione degli interneuroni, nella loro differenziazione o, più probabilmente, in entrambe (fortemente interdipendenti). In modo strettamente connesso con la collocazione ectopica degli interneuroni GABAergici, alcuni studi mostrano infatti un disequilibrio tra le diverse sottopopolazioni di interneuroni ed ancora un alterato profilo dell'espressione di alcuni geni che codificano per proteine caratterizzanti gli interneuroni stessi. Un iniziale passo potrebbe essere quello di approfondire su interneuroni ottenuti da cellule umane tramite Induced Pluripotent Stem Cells (iPS), l'espressione dei trascritti caratterizzanti le sottopopolazioni (con particolare riferimento a quelle PV+ e Sst+) degli interneuroni GABAergici striatali e corticali che finora sono stati riscontrati rispettivamente upregolati e downregolati nei topi mutati per ZEB2. ([Epifanova et al., 2018](#); [Van den Berghe et al., 2013](#); [Tomassy et al., 2013](#)) Nonostante la proteina murina sia infatti estremamente simile tra le due specie, l'evidenza che la patologia si manifesti solo in omozigosi in questo modello animale, suggerisce una possibile differenza nella espressione del meccanismo patogenetico alla base.

L'arricchimento della letteratura sui fenotipi "mild" di Mowat Wilson legati a mutazioni missenso di ZEB2 ed ancor più le descrizioni di alcune forme diverse di epilessia dovute allo stesso tipo di mutazione, ci indicano come il fenotipo si mantenga omogeneo, soprattutto in termini di epilessia, solo a fronte del meccanismo dell'aploinsufficienza con perdita completa di ZEB2 su uno dei due alleli sostanzialmente per mutazioni loss of function. In questo senso la nostra popolazione è omogenea, una sola paziente presenta una sintesi residua della proteina. E' possibile che alcune encefalopatie epilettiche descritte in mutazioni missenso di ZEB2 possano essere ancor più severe a causa di un potenziale accumulo tossico di questo fattore di trascrizione che conserverebbe alcuni domini funzionanti (ad esempio quello in grado di legare il DNA) e non essere degradato.

Ad oggi non sono state approfondite particolari correlazioni genotipo-fenotipo nella sindrome di Mowat Wilson; l'unica evidenza confermata è la maggior gravità nei pazienti con delezioni di grandi dimensioni che contengano anche geni adiacenti a ZEB2 ([Ivanovski et al., 2018](#); [Garavelli et al., 2017](#)). Rispetto all'epilessia, all'interno della nostra casistica, non si sono riscontrate differenze significative del fenotipo nemmeno nei pazienti con ampie delezioni coinvolgenti l'intero gene ed alcune regioni adiacenti.

Ulteriori studi sono auspicabili in primis per proseguire la descrizione dell'evoluzione elettroclinica di questi pazienti e suggerirne la miglior gestione terapeutica. Sarà inoltre interessante comprendere più profondamente i meccanismi etiopatogenetici alla base dell'epilessia e verosimilmente delle altre implicazioni (motorie, cognitive) correlate alle alterazioni dei circuiti cortico-sottocorticali dovuti a mutazioni di ZEB2. Infine è credibile che una miglior comprensione della genesi dell'epilessia in questa popolazione possa supportare la ricerca in merito a meccanismi-epilessia condivisi con diverse patologie.

## 6. Bibliografia

- Adam MP, Schelley S, Gallagher R, et al. **Clinical features and management issues in Mowat-Wilson syndrome.** Am J Med Genet A. 2006;140:2730–2741.
- Arakaki T., Mahon S., Charpier S. et al., **The Role of Striatal Feedforward Inhibition in the Maintenance of Absence Seizures** J Neurosci 2016 Sep 14;36(37):9618-32
- Attisano, L., Wrana, J.L., **Smads as transcriptional co-modulators.** Curr. Opin. Cell Biol. 2000.12, 235–243.
- Babkina N., Deignan JL., Lee H. et al., **Early Infantile Epileptic Encephalopathy with a de novo variant in ZEB2 identified by exome sequencing** European Journal of Medical Genetics 59 (2016) 70e74
- Bonanni P, Negrin S, Volzone A, et al. **Electrical status epilepticus during sleep in Mowat-Wilson syndrome.** Brain Dev 2017 Oct;39(9):727e34.
- Bourchany A, Giurgea I, Thevenon J, et al. **Clinical spectrum of eye malformations in four patients with Mowat-Wilson syndrome.** Am J Med Genet A. 2015;167:1587–1592
- Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kaariainen H, et al. **Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease.** Hum Mol Genet. 2001;10:1503–1510.
- Chng, Z., et al., 2010. **SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells.** Cell Stem Cell 6, 59–70.
- Conidi, A., et al., 2011. **Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGFbeta/BMP signaling in vivo.** Cytokine Growth Factor Rev. 22, 287–300.

- Cordelli DM, Garavelli L, Savasta S, et al. **Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: delineation of the electroclinical phenotype.** Am J Med Genet A. 2013;161A:273–284.
- Cordelli DM, Pellicciari A, Kiriazopoulos D, Franzoni E, Garavelli L. **Epilepsy in Mowat-Wilson syndrome: is it a matter of GABA?** Epilepsia. 2013;54:1331–1332.
- Dastot-Le Moal F, Wilson M, Mowat D, Collot N, Niel F, Goossens M. **ZFH1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome.** Hum Mutat. 2007;28:313–321.
- Davies, C., Tournier, C., **Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies.** Biochem. Soc. 2012. Trans. 40, 85–89.
- Di Pisa V., Provini F., Ubertiello S. et al. **Sleep in Mowat-Wilson Syndrome: a clinical and video-polysomnographic study** Sleep Med. 2019 Sep;61:44-51
- Epifanova E., Babaev A., Newman AG and Tarabykin V. **Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development** Brain Research 1705 (2019) 24-31
- Evans, E., Einfeld, S., Mowat, D., Taffe, J., Tonge, B. and Wilson, M. (2012) **The behavioral phenotype of Mowat–Wilson syndrome.** Am. J. Med. Genet. A., 158A, 358–366.
- Evans E, Mowat D, Wilson M, et al. **Sleep disturbance in mowat-wilson syndrome.** Am J Med Genet A 2016;170(3):654e60.
- Garavelli L, Cerruti-Mainardi P, Viridis R, et al. **Genitourinary anomalies in Mowat-Wilson syndrome with deletion/mutation in the zinc finger homeo box 1B gene (ZFHX1B). Report of three Italian cases with hypospadias and review.** Horm Res. 2005;63:187–192.
- Garavelli L., Mainardi PC. Mowat-Wilson syndrome. Orphanet J Rare Dis.2007;2:42.
- Garavelli L, Zollino M, Mainardi PC, et al. **Mowat-Wilson syndrome: facial phenotype changing with age: study of 19 Italian patients and review of the literature.** Am J Med Genet A. 2009;149A:417–426.

- Garavelli L, Ivanovski I, Caraffi SG, et al. **Neuroimaging findings in Mowat-Wilson syndrome: a study of 54 patients.** Genet Med. 2017;19:691–700.
- Ghoumid, J., Drevillon, L., Alavi-Naini, S.M., Bondurand, N., Rio, M., Briand-Suleau, A., et al., **ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild MowateWilson syndrome,** 1 Hum. Mol. Genet. 2013.22 (13),2652e2661.
- Gregory-Evans, C.Y., Vieira, H., Dalton, R., Adams, G.G., Salt, A., Gregory-Evans, K., **Ocular coloboma and high myopia with Hirschsprung disease associated with a novel ZFH1B missense mutation and trisomy 21.** Am. J. Med. Genet. 2004.131,86e90.
- He, L., et al., **Transcriptional regulator ZEB2 is essential for Bergmann glia development.** J. Neurosci. 2018 38 (6), 1575–1587.
- Hegarty, S.V., O'Keeffe, G.W., Sullivan, A.M., **BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system.** Prog. Neurobiol. 2013.109, 28–41.
- Hegarty, S.V., et al., **Zeb2 is a negative regulator of midbrain dopaminergic axon growth and target innervation.** Sci. Rep. 2017.7 (1), 8568.
- Heinritz, W., Zweier, C., Froster, U.G., Strenge, S., Kujat, A., Syrbe, S., et al., **A missense mutation in the ZFH1B gene associated with an atypical Mowat Wilson syndrome phenotype,** 1 Am. J. Med. Genet. 2006.A 140 (11),1223e1227
- Higashi, Y., et al., **Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse.** Genesis 2002. 32,82–84.
- Ishihara N, Yamada K, Yamada Y et al., **Clinical and molecular analysis of Mowat–Wilson syndrome associated with ZFH1B mutations and deletions at 2q22–q24.1.** J Med Genet 2004 41:387–393.
- Ivanovski I., Djuric O., Caraffi SG. Et al., **Phenotype and genotype of 87 patients with Mowat–Wilson syndrome and recommendations for care.** Genet Med. 2018 Sep;20(9):965-975.

- Ivanovski I., Djuric O., Broccoli S. et al. **Mowat-Wilson syndrome: growth charts** Orphanet J Rare Dis. 2020 Jun 15;15(1):151
- Kretschmar, M., Massague, J., **SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling.** Curr. Opin. Genet. 1998. Dev. 8, 103–111.
- Lee, S.M., et al., **A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus.** Development 2000.127, 457–467.
- Long, J., Zuo, D., Park, M., **Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin.** J. Biol. Chem. 2005.280,35477–35489.
- Lurie IW, Supovitz KR, Rosenblum-Vos LS, Wulfsberg EA. **Phenotypic variability of del(2) (q22-q23): report of a case with a review of the literature.** Genet Couns. 1994;5:11–14.
- Massague, J., **TGFbeta signalling in context.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012.13, 616–630.
- McKinsey GL, Lindtner S, Trzcinski B, et al. **Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons.** Neuron 2013;77:83e98.
- Miquelajauregui, A., et al., **Smad-interacting protein-1 (Zfhx1b) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007.104, 12919–12924.
- Miura K, Kumagai T, Suzuki Y. et al., **Epilepsy in Mowat–Wilson syndrome associated with ZFHX1B gene abnormalities.** Epilepsia 2005 46:13.Abstract.
- Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, et al. **Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features:delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23.** J Med Genet. 1998;35:617–623.
- Mowat DR, MJ Wilson, M Goossens, **Mowat Wilson Syndrome,** J Med Genet 2003;40:305-310
- Nardello R., Fontana A., Mangano GD. **Age-dependent epileptic encephalopathy associated with an unusual co-occurrence of ZEB2 and SCN1A variants** Epileptic Disord 2020; 22 (1): 111-5

- Nelles, L., et al., 2003. **Organization of the mouse Zfhx1b gene encoding the two-handed zinc finger repressor Smad-interacting protein-1.** Genomics 82, 460–469.
- Nityanandam, A., Parthasarathy, S., Tarabykin, V., **Postnatal subventricular zone of the neocortex contributes GFAP+ cells to the rostral migratory stream under the control of Sip1.** Dev. Biol. 2012. 366, 341–356.
- Postigo, A.A., Dean, D.C., **ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. 96, 6683–6688.
- Quintes, S., et al., **Zeb2 is essential for Schwann cell differentiation, myelination and nerve repair.** Nat. Neurosci. 2016.19, 1050–1059.
- Roeper, L., **Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons.** Trends Neurosci. 2013.6, 6.
- Rogers, C.D., Saxena, A., Bronner, M.E., **Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT.** J. Cell Biol. 2013. 203, 835–847.
- Rubenstein, J.L.R., **Development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders.** J. Child Psychol. Psychiatry 2011.52 (4), 339–355.
- Seuntjens, E., et al., **Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors.** Nat. Neurosci. 2009.12, 1373–1380.
- Srivatsa S, Parthasarathy S, Molnar Z, et al. **Sip1 downstream effector ninein controls neocortical axonal growth, ipsilateral branching, and microtubule growth and stability.** Neuron 2015;85:998e1012.
- Tomassy GS, Lodato S., Arlotta P., **A SIP of GABA for the cerebral cortex** Neuron. 2013 Jan 9;77(1):1-3
- Turovskaya, M.V., et al., 2017. **Sip-1 mutations cause disturbances in the activity of NMDA- and AMPA-, but not kainate receptors of neurons in the cerebral cortex.**Neurosci. Lett. 650, 180–186.

- Van den Berghe V, Stappers E, Vandesande B, et al. **Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1.** *Neuron* 2013;77:70e82.
- Van de Putte, T., et al., 2003. **Mice lacking ZFHX1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome.** *Am. J. Hum. Genet.* 72, 465–470.
- Van de Putte, T., et al., 2007. Neural crest-specific removal of Zfhx1b in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1423–1436.
- Van Grunsven, L.A., et al., 2006. **deltaEF1 and SIP1 are differentially expressed and have overlapping activities during Xenopus embryogenesis.** *Dev. Dyn.* 235, 1491–1500.
- Van Grunsven, L.A., et al., 2007. **X<sub>Sip1</sub> neuralizing activity involves the co-repressor CtBP and occurs through BMP dependent and independent mechanisms.** *Dev. Biol.* 306, 34–49.
- Verschueren, K., et al., 1999. **SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes.** *J. Biol. Chem.* 274, 20489–20498.
- Weng, Q., et al., 2012. **Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system.** *Neuron* 73,713–728.
- Wilson M, Mowat D, Dastot-Le Moal F, et al. **Further delineation of the phenotype associated with heterozygous mutations in ZFHX1B.** *Am J Med Genet A.* 2003;119A:257–265.
- Yamada K, Yamada Y, Nomura N, et al. **Nonsense and frameshift mutations in ZFHX1B, encoding Smad-interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features.** *Am J Hum Genet.* 2001;69:1178–1185.

-Zweier C, Albrecht B, Mitulla B, et al. **“Mowat-Wilson” syndrome with and without Hirschsprung disease is a distinct, recognizable multiple congenital anomalies-mental retardation syndrome caused by mutations in the zinc finger homeo box 1B gene.** Am J Med Genet. 2002;108:177–181.