

Molekylära defekter kan orsaka epilepsi

Nya upptäckter kan ge bättre möjligheter till riktad diagnostik och behandling

Genetiska faktorer beräknas vara orsak till epilepsi i 20–40 procent av fallen. Under senare år har olika molekylära defekter i nervcellernas jonkanaler upptäckts, vilka kan förklara att hjärncellerna blir överretbara. Framstegen baseras på noggrann neurologisk diagnostik i förening med molekylär-genetisk teknik och elektrofysiologi med molekylär upplösning (»patch clamp»-analys.)

Epilepsi beror på ökad impulsaktivitet i CNS-neuron. Generellt sett kan faktorer som underlättar eller förlänger nervcellernas depolarisation orsaka epilepsi. Sådana faktorer kan vara förlängd öppning av Na⁺- och Ca²⁺-kanaler, eller minskad funktion av K⁺-kanaler, ökad frisättning av glutamat, minskad mängd GABA (gammaaminosmör-syra). Det intressanta är mångfalden av jonkanaler inom dessa huvudgrupper som gör att impulsaktiviteten kan moduleras och ge upphov till olika sjukdomar. I denna artikel skall flera nyheter om jonkanaler och epilepsi redovisas.

Epilepsi hos barn orsakas till 30–40 procent av genetiska faktorer och hos vuxna till ca 20 procent, vanligen med en polygen ärftlighet. Vid några typer av epilepsi har man nyligen kunnat identifiera en enstaka genetisk defekt och dess konsekvens för jonkanalernas molekylära struktur och funktion.

Hundratals modifieringar av K⁺-kanalerna

I princip består en jonkanal av två delar: en sensor som styr om kanalen skall vara öppen eller stängd och själva kanalen som kan vara selektiv för en viss jon (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻).

Sensorn kan påverkas av membran-spänningen eller av en ligand, vanligen en transmittorsubstans. Den molekylära uppbyggnaden av jonkanalerna är nu till stora delar känd. Den klassiska K⁺-

kanalen ser ut som en kort cylinder med centralt hål, där väggarna utgörs av fyra kvadranter som är identiska, s k α -subenheter (Figur 1). Varje α -subenhet är en kedja av aminosyror som löper fram och tillbaka sex gånger (6- \rightarrow trans membrane domains», TMD) mellan in- och utsida. De delar av aminosyrakedjan som gränsar mot det centrala hålet bestämmer selektiviteten i jonkanalen, de delar som ligger mer perifert utgör sensorn.

Det finns K⁺-kanaler som inte är spänningskontrollerade, t ex sådana som påverkas av den intracellulära nivån av ATP (adenosintrifosfat; finns i muskelceller och pankreas betaceller). I dessa K⁺-kanaler utgörs varje subenhet av bara två TMD som kontrollerar selektiviteten, resten är en sensor (receptor) känslig för ATP.

Det är särskilt K⁺-kanalerna som uppvisar en stor variation (se <http://k-channels.med.nyu.edu/>). Detta beror på:

- att det finns ett stort antal gener (över 50 hos däggdjur) som kodar för α -subenheterna,
- att »alternative splicing», »RNA-editing» och »post-translational modification» gör att DNA kan uttryckas på olika sätt, vilket ger över 100 olika slags subenheter,
- att en K⁺-kanal inte behöver vara uppbyggd av identiska subenheter (heteromer),
- att det finns accessoriska subenheter som kan modifiera K⁺-kanalens funktion.

Man har beräknat att dessa förhållanden gör att det kan finnas 100–1 000 olika modifieringar av K⁺-kanaler som på olika sätt kan påverka impulsaktiviteten i hjärnbarksneuronen. Egenskaperna hos dessa olika K⁺-kanaler är omöjliga att särskilja utan molekylärbiologisk teknik. Genom att injicera mRNA kan olika gener uttryckas var för sig i oocyter (från klogrodan, *Xenopus*), och egenskaperna kan testas fysiologiskt [1]. Man kan också pröva hur olika kombinationer (heteromerer) av subenheter fungerar [2]. Expressionssystem har dock begränsningar,

Sammanfattat

- Epilepsi beror på ökad impulsaktivitet i CNS-neuron, och genetiska faktorer har stor betydelse. Med molekylärbiologisk teknik har man nu i några former av hereditär epilepsi påvisat förändringar i koden för de gener som bestämmer aminosyrasekvensen i olika jonkanalproteiner. Effekten av dessa förändringar har demonstrerats i expressions-system och identifierats elektrofysiologiskt.
- Neuronens elektriska »stabilisering» är rubbad vid benigna familjära neonatala kramper – de proteiner som utgör K⁺-kanalerna saknar ett avsnitt av drygt 300 aminosyror. Na⁺-kanalsjukdom har visats ha ett samband med generaliserad epilepsi med feberkramper. Vid autosomalt dominant nokturn frontallobepilepsi föreligger en punktmutation i genen för acetylkolinreceptorn. Defekter i Ca²⁺-kanalens uppbyggnad har identifierats i tre former av epilepsi hos möss med en sjukdoms- och EEG-bild som liknar petit mal.
- Dessa framsteg kan vara en utgångspunkt för mer differentierad diagnostik och farmakologisk behandling vid epilepsi.

eftersom faktorerna här inte är desamma som i den cell där jonkanalen normalt uttrycks [3, 4].

Defekt K⁺-kanal orsakar benigna neonatala kramper

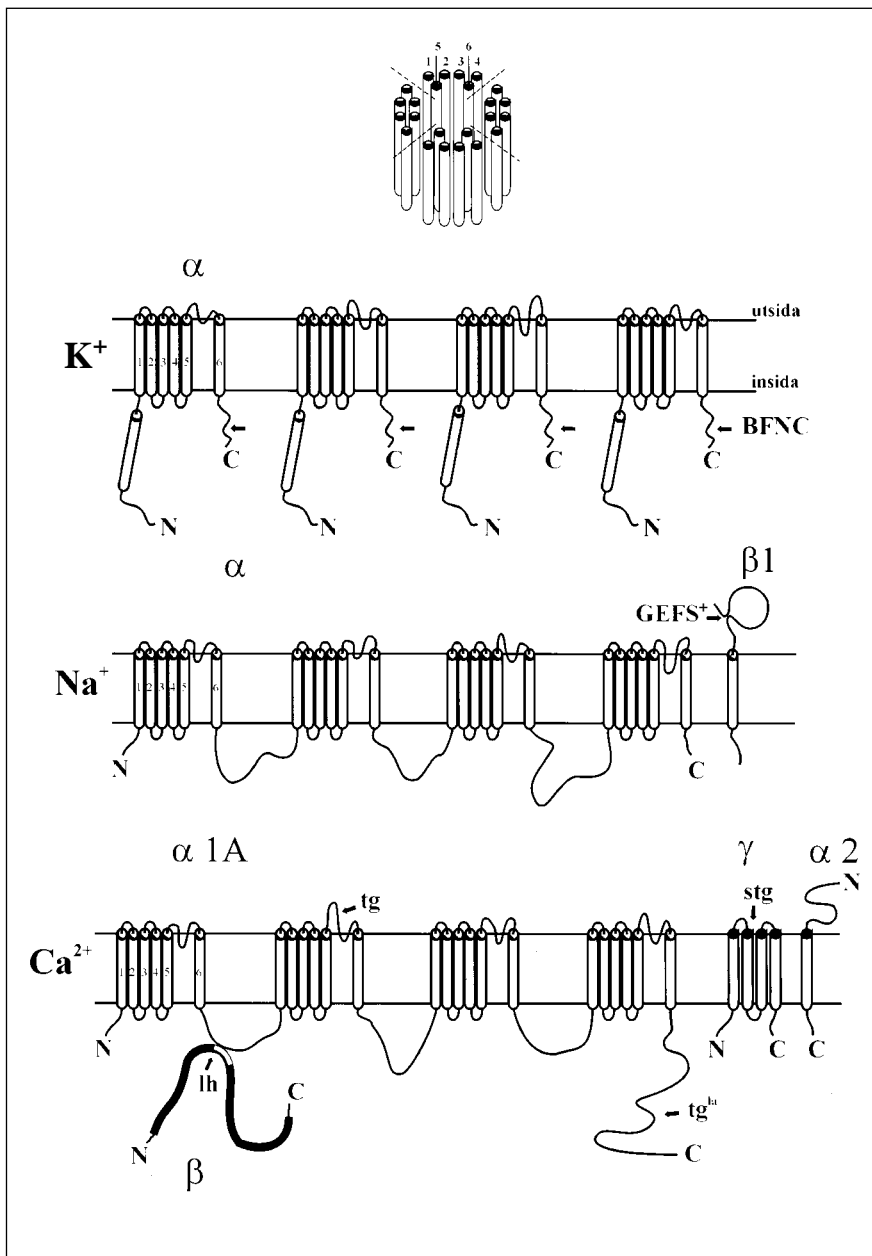
Benigna familjära neonatala kramper (benign familial neonatal convul-

Författare

TOM BRISMAR

professor i klinisk neurofysiologi, neurofysiologiska kliniken, Karolinska sjukhuset, Stockholm.

E-post: tom.brismar@ks.se



Figur 1. Små ändringar i jonkanalernas struktur orsakar epilepsi: Bilden visar att den sekundära strukturen är likartad hos jonkanaler för K^+ , Na^+ och Ca^{2+} . α -subenheten utgörs av en aminosyrakedja som löper genom membranen. Dessutom finns β -, γ - och δ -subenheter med moderulerande funktion. Mutationer markerade BFNC (benigna familjära neonatala kramper), GEFS+ (generaliserad epilepsi med feberkramper), tg och tg^h (»tottering mice» = stapplande möss), lh (letargiska möss) och stg (»stargazer mice» = stjärnskådande möss).

sions, BFNC) är en epilepsisjukdom hos nyfödda med autosomt dominant arvsång. Den debuterar de första dygnen med spontan remission efter 2–15 veckor. Symtomen är apné, cyanos, tonusökning och okulära symtom som övergår till kloniska kramper. Neurologisk och kognitiv utveckling är normal, men det finns en ökad risk för senare epilepsi. Den interiktala EEG-bilden är normal.

Leppert och medarbetare [1] studerade en familj med fyra generationer där 19 av 48 familjemedlemmar hade BFNC och en defekt på långa armen (q) av kromosom 20. Denna gen med lokus

20q13.3 har nyligen visats vara genen för KCNQ2, som är en spänningsberoende K^+ -kanal, och det förelåg en specifik skillnad mellan den KCNQ2 hos sjukdomsbärarna och de friska [3]. Skillnaden i den muterade genen är att den saknar ett avsnitt av drygt 300 aminosyror i COOH-terminalen av proteinkedjan av normalt 844 aminosyror (Figur 1). Ingen liknande trunkering av genen har kunnat påvisas hos friska, dvs den bedöms vara specifik för BFNC.

Xenopus-oocyter injicerade med normal RNA resulterade i typiska K^+ -strömmar i oocyten, medan sådana som

injicerats med muterat RNA ej hade K^+ -strömmar. För att efterlikna förhållandet hos heterozygota anlagsbärare injicerades muterad och normal RNA i förhållandet 1:1, vilket resulterade i K^+ -strömmar som var mindre än normalt. Hos möss finns K^+ -kanaler av KCNQ2-typ normalt uttryckta i hippocampus, gyrus dentatus, neocortex och granulär-cellslagret i cerebellum [2].

Eftersom K^+ -kanalerna bidrar till att upprätthålla nervcellernas negativa vilospänning, är det uppenbart att nedsatt funktion hos dessa kan orsaka epilepsi. Detta har tidigare visats djurexperimentellt, exempelvis med K^+ -blockerare (4-aminopyridin), men nu är det första gången man har sett att en sådan defekt funktion hos K^+ -kanalen verkligen kan knytas samman med en känd epilepsisjukdom, och dessutom att den kunnat kartläggas på molekylär nivå.

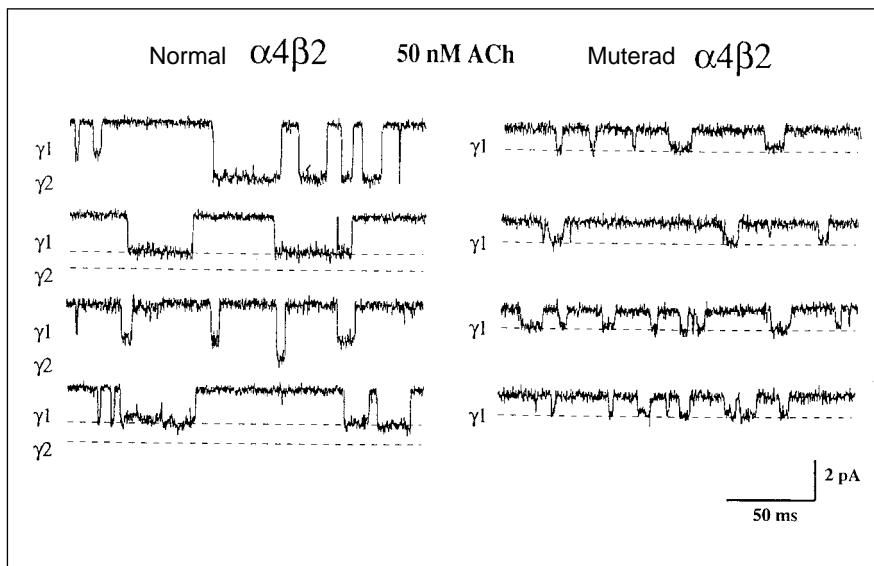
Punktmutation i Na^+ -kanalen vid epilepsi med feberkramper

Även Na^+ -kanalsjukdom kan framkalla epilepsi, och den har visats ha ett samband med generaliserad epilepsi med feberkramper (generalized epilepsy with febrile seizures, GEFS+) som är en familjär form av epilepsi. Den karakteriseras av feberkramper som kvarstår efter sex års ålder eller som är kombinerade med generaliserade anfall även utan samband med feber. Analys av familjer med GEFS+ talar för att sjukdomen har en autosomt dominant arvsång med en penetrans av 60 procent, men den genetiska analysen försvåras av att det kan finnas familjemedlemmar som har »vanliga» feberkramper (förekommer hos 3 procent av alla barn). En kartläggning av genmarkörer har visat en koppling till kromosomlokus 19q13.1, ett område dit genen för Na^+ -kanalens β -subenhet har lokaliserats [4].

Na^+ -kanalen är uppbyggd på liknande sätt som de spänningsberoende K^+ -kanalerna, dvs den är en tetramer med fyra delar som vardera innehåller en aminosyrakedja med sex segment (TMD) som löper fram och tillbaka genom membranen. Till skillnad från K^+ -kanalen är dessa fyra delar inte identiska, utan utgör tillsammans en större enhet som betecknas α -subenhet. (Sålunda betecknar α -subenhet för Na -kanalen hela tetrameren, medan α -subenhet för K -kanalen betecknar en fjärdedel.)

Till detta kommer två mindre β -subenheter som kan påverka funktionen.

Det är genen för en av dessa β -subenheter (SCN1B) som är förändrad vid GEFS+ (Figur 1). Effekten av denna förändring har prövats genom att uttrycka SCN1B tillsammans med genen för α -subenheten i *Xenopus*-oocyter på



Figur 2. Mutation i ACh-receptorns α -subenhet vid hereditär frontallobsepilepsi (ADNFLE): Med s k patch clamp-teknik registreras Ca^{2+} -strömmen i enstaka jonkanaler i oocyter. Oocyterna har injicerats med humant cRNA för acetylkolin(ACh)-receptorer i normal («wild-type») eller muterad form. De stegvisa förändringar som uppkommer när jonkanalen öppnas av ACh är mindre i den muterade kanalen (till höger på bilden). Bilden hämtad från [8].

liknande sätt som i analysen av BFNC (se ovan). Injektion av RNA för muterad SCN1B orsakar mer långvarig Na^{+} -ström jämfört med den normala genen [4].

Detta skulle kunna orsaka epilepsi, eftersom mer långvarig Na^{+} -ström ökar retbarheten och tendensen till repetitiv urladdning. Det stämmer också väl med att den anti-epileptiska effekten av fenytoin och karbamazepin tillskrivs deras förmåga att minska Na^{+} -strömmen.

Nyligen har ett andra lokus för GEFS+ påvisats beläget på kromosom 2q21-q33, vilket misstänks resultera i förändringar på Na^{+} -kanalens α -subenhet [5]. Det bör också tilläggas att vanliga feberkramper har relaterats till förändringar på kromosom 8, 19 och 5, men hur dessa påverkar jonkanalfunktionen är inte känt.

Defekt ACh-kanal och ärftlig frontallobsepilepsi

Den första epilepsisjukdom där man kunde identifiera en jonkanaldefekt var autosomt dominant nokturn frontallobsepilepsi (ADNFLE). Detta är en sällsynt epilepsi som karakteriseras av korta partiella anfall under sömn. Analys av en stor australisk familj med denna sjukdom har visat att genen för ADNFLE är lokaliserad till kromosom 20q13.2-13.3 [6], vilket är samma plats som genen för den neuronala nikotineriga acetylkolin(ACh)-receptorn.

ACh-receptorn är en ligandaktiverad jonkanal som är en pentamer, dvs den har fem subenheter med uppbyggnad $(\alpha)_2(\beta)_3$. Jonkanalen är selektiv för katjoner (blandad Na^{+} - Ca^{2+} -ström) och

därmed orsakar ACh depolarisering och excitation.

Steinlein och medarbetare [7] fann i den australiska familjen att alla sjukdomsbärare hade en punktmutation i genen för $\alpha 4$ -subenheten, närmare bestämt är serin ersatt med fenylalanin i position 248. Därigenom får ett av de membranspannande områdena (TMD) i aminosyrakedjan en förändring på en kritisk position, där de fem subenheterna tillsammans konstituerar en trång passage i jonkanalen. Detta resulterar i snabbare desensitisering och långsammare återhämtning av receptorn.

Analys med s k patch clamp-teknik av enstaka jonkanalers funktion uttryckt i *Xenopus*-oocyter visade att strömmen var lägre i muterade jonkanaler jämfört med «wild-type» (Figur 2) [8]. Beräknat som elektrisk ledningsförmåga (konduktans) förelåg två konduktansnivåer (17 och 28 pS) i «wild-type» och endast en lägre nivå (11 pS) i den muterade. Denna minskade konduktans i jonkanalen gör att ACh har mindre effekt, strömmen av positiva joner in i neuronet blir mindre och retbarheten sänks.

Varför skulle mindre retbarhet i detta fall orsaka epilepsi? Den sannolika förklaringen är att ACh-receptorer finns på hämmande interneuron, och när excitationen av dessa hämmande interneuron minskar, minskar också deras inhibitoriska effekt i hjärnbarken genom att mindre GABA frisätts. Slutresultatet blir därför ökad excitabilitet.

Det kan tilläggas att i andra familjer med typisk sjukdomsbild finns inte nå-

gon rubbning på kromosom 20q13.3, vilket tyder på att herediteten för ADNFLE är heterogen.

Dessutom verkar det bara vara en tillfällighet att lokus 20q13.3 också är platsen för defekten vid BFNC (se ovan).

Samband mellan petit mal och Ca^{2+} -kanalrubbningar?

Defekter i Ca^{2+} -kanalens uppbyggnad har identifierats i tre former av epilepsi hos möss med en sjukdomsbild som har likheter med petit mal-epilepsi. Liksom Na^{+} -kanalen består Ca^{2+} -kanalen av en $\alpha 1$ -subenhet med fyra homologa delar, vilka var och en utgör en sektor av den cylinder som är jonkanal. På utsidan av denna cylinder finns $\alpha 2\delta$ -, β - och γ -subenheter påhängda. Ett antal gener (för närvarande tio) har identifierats som uttrycker $\alpha 1$ -subenheten ($\alpha 1A$ - $\alpha 1B$ osv), och fyra olika som uttrycker β -subenheten ($\beta 1$ - $\beta 4$); dessa kan ha olika kombinationer, vilket gör att det finns en betydande variation i Ca^{2+} -kanalernas uppbyggnad.

Sedan länge har Ca^{2+} -kanalerna klassificerats i P/Q-, N-, L-, R- och T-typ baserat på sina egenskaper, och detta motsvaras av olika $\alpha 1$ -isoformer. I Purkinjeceller i cerebellum dominerar kanaler av P-typ, vilka är sammansatta av $\alpha 1A$ i olika kombinationer med β -subenheter. Ca^{2+} -kanalens selektivitet för Ca^{2+} , dess spänningsberoende och farmakologiska känslighet tillskrivs $\alpha 1$ -subenheten, medan β -subenheten kan modulera tidsberoendet för kanalens aktivering och inaktivering.

Hos »tottering» (stapplande) möss uppträder anfall vid tre veckors ålder, senare också ataxi. Anfällen består av 1–10 sekunder långa attacker med 5–6 Hz »spike and wave» på EEG med samtidigt absensliknande anfall med uppstannande. Stapplande möss har en mutation (betecknad tg) på kromosom 8 som avbyter genen för $\alpha 1A$ -subenheten [9]. Utbyte av endast en aminosyra i $\alpha 1A$ -subenheten (Figur 1) har en drastisk effekt på Ca^{2+} -kanalen. »Patch-clamp»-analys av Purkinjeceller från cerebellum visar att Ca^{2+} -kanalerna är öppna endast en tredjedel av den normala tiden, vilket resulterar i reducerad Ca^{2+} -ström. Det finns en annan variant av stapplande möss (tg^{1a}) där defekten på $\alpha 1A$ -enheten sitter på C-terminalen (Figur 1).

Hos homozygoter av s k letargiska möss, som har en form av absenser och »spike and wave» i EEG, föreligger en mutation (lh) i en av de gener som uttrycker Ca^{2+} -kanalens β -subenhet [10]. Detta orsakar en avsevärt trunkerad form av β -subenheten som därmed förlorar sitt bindningsställe till α -subenheten och sin regulatoriska inverkan på

ANNONS

Ca²⁺-kanalen. Hos letargiska möss saknas β 4-proteinet i hjärnan. Undersökningar i expressionssystem (Xenopus-oocyter) visar att utan β 4-subenheter blir konduktansen i Ca²⁺-kanalen mycket lägre. Men om den defekta β 4-subenheten ersätts med en annan typ av β -subenhet (β 1– β 3) kan detta i olika grad återställa storleken på konduktansen i Ca²⁺-kanalen.

Detta kan förklara att man faktiskt inte har kunnat påvisa några avvikelser i Ca²⁺-strömmarna som uppmäts i isolerade Purkinjeceller från letargiska möss [11].

Det är ändå sannolikt att bortfallet av β 4-subenheten ger en defekt funktion som ännu inte identifierats, men som sammanhänger med sjukdomsbilden.

Avvikelser i Ca²⁺-kanalerna har också identifierats i en annan typ av absensepilepsi hos möss, »stargazer mice». Som namnet säger har dessa möss petit mal-liknande symtom i form av att de stannar upp och vrider upp huvudet såsom hos en stjärnskadare, och EEG visar »spike and wave»-aktivitet.

Hos dessa möss har man påvisat nedsett expression i en gen (stg) som kodar för ett protein (stargazin) som liknar γ -subenheten i Ca²⁺-kanaler i muskelceller [12]. RNA för stargazin har påvisats i hela hjärnan, men särskilt i cerebellum, luktbulberna, talamus och hippocampus. Effekten av stargazin – som alltså finns normalt – har testats i expressionssystem och synes vara en påverkan på Ca²⁺-kanalens spänningsberoende (inaktiveras lättare). Hos »stargazer»-möss (som saknar stargazin) föreligger sannolikt ökad aktivitet i Ca²⁺-kanalen vid membranens vilospänning, vilket resulterar i ökat Ca²⁺-inflöde (ökad intracellulär Ca²⁺-nivå). Detta kan relateras till att man tidigare visat att det föreligger en ökad excitabilitet och oscillatoriska urladdningar i nervceller hos dessa möss.

Slutsatsen av ovanstående är att olika slags defekter på Ca²⁺-kanalens funktion – ledande till såväl minskat som ökat Ca²⁺-inflöde – kan resultera i absensepilepsi hos möss [13].

Stort framsteg ger nya möjligheter

De genetiska defekter man nyligen upptäckt orsakar molekylära förändringar i nervmembranens jonkanaler, vilka har den karaktären att de ökar nervmembranens excitabilitet. Dessa exempel utgör ännu så länge en liten del av de idiopatiska epilepsisjukdomarna, men upptäckterna har inneburit ett stort framsteg som kan ge nya möjligheter till molekylärgenetisk epilepsidiagnostik och molekylärt riktad farmakologisk behandling.

Referenser

1. Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T, Stauffer D, O'Connell P, Nakamura Y, et al. Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* 1989; 337:647-8.
2. Lerche H, Bievert C, Alekov AK, Schleithoff L, Linder M, Klingner W, et al. A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol* 1999; 46: 305-12.
3. Tinel N, Lauritzen I, Chouabe C, Lazdunski M, Borsotto M. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett* 1998; 438: 171-6.
4. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nature Genetics* 1998; 19: 366-70.
5. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prud'homme JF, Baulac M, et al. A second locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1078-85.
6. Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland GR, Mulley JC. Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q13.2. *Nature Genetics* 1995; 10: 117-8.
7. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor α 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics* 1995; 11: 201-3.
8. Kuryatov A, Gerzanich V, Nelson M, Olale F, Lindstrom J. Mutation causing autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy alters Ca²⁺ permeability, conductance, and gating of human α 4 β 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 1997; 17: 9035-47.
9. Fletcher CF, Lutz CM, O'Sullivan TN, Shaughnessy JD Jr, Hawkes R, Frankel WN, et al. Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* 1996; 87: 607-17.
10. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL. Mutation of the Ca²⁺ channel β subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* 1997; 88: 385-92.
11. Burgess DL, Biddlecome GH, McDonough SI, Diaz ME, Zilinski CA, Bean BP, et al. β subunit reshuffling modifies N- and P/Q-type Ca²⁺ channel subunit compositions in lethargic mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13: 293-311.
12. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, et al. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel γ subunit. *Nature Genetics* 1998; 19: 340-7.
13. Burgess DL, Noebels JL. Single gene defects in mice: the role of voltage dependent calcium channels in absence models. *Epilepsy Res* 1999; 36: 111-22.

Summary

**Molecular defects may cause epilepsy
New discoveries may provide better prospects for direct diagnosis and therapy**

Tom Brismar

Läkartidningen 2000; 97: 5102-6.

Specific defects in neuronal ion channel proteins have recently been identified in some forms of hereditary epilepsy. A deletion of 300 amino acids from the COOH terminal of the K⁺ channel reduces the electrical stability of the neuron in subjects with benign familial neonatal seizures. Defects in the protein subunits of the Na⁺ channel may prolong neuronal depolarization in children with generalized epilepsy with febrile convulsions. A point mutation in one of the ACh receptor subunits may reduce the function of inhibitory interneurons in subjects with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Finally, several different defects in the Ca²⁺ channel amino acid sequence have been identified in various types of epilepsy in mice in which symptoms and EEG show similarities to those in human petit mal. This remarkable progress in the precise localization of ion channel defects in epilepsy provides a novel basis for the development of more differentiated diagnosis and pharmacological therapy.

Correspondence: Tom Brismar, Department of Clinical Neurophysiology, Karolinska sjukhuset, SE-171 76 Stockholm, Sweden.

E-mail: tom.brismar@ks.se