

# PROPOSTA DI STUDIO GENETICO SULL'EPilessIA IDIOPATICA GENERALIZZATA

## SCOPO DELLO STUDIO.

Malgrado le intense ricerche nel campo della genetica molecolare, i fattori genetici responsabili dell'epilessia idiopatica generalizzata sono in gran parte sconosciuti. Alla base di questo insuccesso vi è da una parte l'elevata eterogeneità genetica alla base di questo gruppo di epilessie e dall'altra l'inadeguatezza metodologica degli studi condotti fino ad oggi, in particolare la limitatezza del campione studiato e la scarsa efficacia dei metodi di analisi genetica.

Con lo scopo di individuare fattori genetici responsabili di IGE il consorzio Europeo EPICURE coordinato dal Prof. Giuliano Avanzini ha promosso un progetto di ricerca ad ampio respiro organizzato in tre diverse attività: studi "genome-wide" di linkage e di associazione e studi di sequenziamento di geni candidati.

Il progetto è stato finanziato dalla Comunità Europea nell'ambito del 6 programma quadro e, per la prima volta, esistono le risorse necessarie per condurre uno studio su una ampia casistica multicentrica e con tecnologie realmente efficaci.

## DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio si propone di identificare fattori genetici associati ad IGE attraverso 3 diverse linee di ricerca:

- L'attività 1 prevede lo studio di linkage "genome-wide" su famiglie nucleari affette da IGE;
- L'attività 2 prevede studi di associazione "genome-wide" in casi sporadici affetti da IGE;
- L'attività 3 prevede il sequenziamento dei geni codificanti 102 canali ionici neuronali in soggetti IGE appartenente a famiglie con più casi affetti.

L'attività 1 e 2 si propongono di identificare fattori genetici predisponenti alle IGE attraverso un approccio genetico "alla cieca" della patogenesi. Tali approcci richiedono popolazioni molto ampie e consentono di identificare fattori genetici di suscettibilità ad elevata frequenza nella popolazione.

L'attività 3 si propone di identificare varianti genetiche associate a IGE attraverso lo screening sistematico di geni candidati per funzioni ad essere coinvolti in processi epilettogeni. Tale approccio consente di identificare fattori genetici con bassa frequenza nella popolazione.

La complementarietà degli approcci consentirà al consorzio EPICURE di verificare contemporaneamente l'esistenza di fattori genetici rari e comuni.

Al fine di reperire una casistica adeguata sono stati coinvolti diversi paesi europei (Spagna, Francia, Germania, Olanda, Inghilterra, Danimarca, Finlandia, Turchia).

## *Coordinamento dello studio*

La raccolta della casistica sarà coordinata a livello nazionale e monitorata a livello Europeo dal Dr. Heils, Dr. Sander, Dr. Uzbek e dal Dr. Zara.

La Commissione Genetica della Lega Italiana contro l'Epilessia si è fatta carico di coordinare la selezione della casistica per il progetto EPICURE in Italia.

La raccolta dei casi della LICE sarà supervisionata da Amedeo Bianchi (bianchi.epigenet@tin.it). La gestione dei dati clinici e l'aggiornamento del database sarà affidata a Pasquale Striano (sstriano@libero.it).

Lo studio molecolare è coordinato da Thomas Sander (attività 1 e 2) e da Federico Zara (attività 3).

## SELEZIONE DELLA CASISTICA

### *Criteri di inclusione*

Saranno incluse nello studio le famiglie con:

- 1 probando affetto da CAE, JAE, JME
- almeno un fratello con IGE (IGE, JAE, JME, GTCS)

Lo stato di affezione dei genitori di coppie di fratelli affetti non costituirà elemento di inclusione o di esclusione. Pertanto verranno incluse le famiglie con nessuno, uno o entrambi i genitori affetti.

La presenza di convulsioni febbrili in soggetti IGE non costituirà criterio di esclusione.

I criteri clinici per le diverse forme di IGE sono quelli adottati nella Classificazione Internazionale della ILAE.

Le famiglie con più casi affetti da IGE saranno utilizzate per le linee di ricerca 1 e 3 di EPICURE.

Nell'attività 3 (sequenziamento) saranno analizzate prioritariamente le famiglie con 3 membri affetti.

### *Modalità di prelievo e trattamento del campione*

- concordare con il Dott. Federico Zara (federicozara@ospedale-gaslini.ge.it, 010-5636603) l'invio del materiale.

- prelievo di 10-20 ml di sangue periferico in EDTA ai casi affetti e, possibilmente ai parenti di primo grado (genitori, figli, fratelli).
- spedizione dei prelievi in giornata mediante corriere espresso a temperatura ambiente. Mai il Venerdì'.
- includere nella spedizione albero genealogico, consenso informato e schede cliniche.
- indirizzo di spedizione: Dott. Federico Zara, Laboratorio di Neurogenetica, Dipartimento di Pediatria, Ospedale-Gaslini, Largo Gaslini 5, 16147 - Genova.

### *Schede di raccolta dati*

Per ogni famiglia dovrà essere compilata una scheda riassuntiva (allegato 1, IGE\_family.doc) e per ogni membro familiare prelevato (affetto e non affetto) dovrà essere compilata una scheda clinica (allegato 2, IGE\_member.doc). Le schede verranno allegate ai prelievi ed successivamente verranno inviate allai Banca Dati della (LICE) di Arezzo. Ogni Centro partecipante dovrà fornire inoltre la propria disponibilità a fornire eventuali altri dati clinici e strumentali (EEG, RM o altro) in modo da permettere una valutazione collegiale dell'inquadramento diagnostico. Ogni soggetto prelevato dovrà sottoscrivere il consenso informato della LICE.

### **ANALISI MOLECOLARE**

Il sangue verrà utilizzato per l'estrazione immediata di DNA. Il DNA delle famiglie IGE verrà temporaneamente conservato presso il laboratorio dell'Istituto Gaslini.

Le 2 linee di ricerca in cui saranno incluse le famiglie selezionate richiederanno l'utilizzo di circa 70 microgrammi ( $\mu\text{g}$ ) di DNA. 10  $\mu\text{g}$  di DNA verranno inviati a Thomas Sander per lo svolgimento la linea di ricerca 1. I rimanenti 60  $\mu\text{g}$  di DNA verranno smistati ai 6 laboratori di ricerca coinvolti nella linea di ricerca 3 del progetto Epicure (Zara, Gaslini-Genova; Marini, Meyer-Firenze; LeGuern, Pitié-Parigi; Serratosa, Diaz-Madrid; Lehesjoki, Univ-Helsinki; Heils, Univ-Bonn). Al termine dello studio il DNA rimanente verrà depositato nella banca del DNA della LICE al Besta. Nella linea di ricerca 1. I campioni verranno tipizzati con circa 800 marcatori polimorfici del DNA (microsatelliti) diposti lungo tutto il genoma a una distanza media di 5 cM. I genotipi verranno quindi utilizzati per l'analisi di linkage non parametrica al fine di identificare regioni cromosomiche condivise da soggetti affetti da IGE. Successivamente verranno quindi analizzati i geni candidati presenti nelle regioni di interesse per la ricerca di varianti del DNA con possibile effetto patogenetico.

Nella linea di ricerca 3 i probandi delle famiglie IGE selezionate verranno analizzati per i seguenti geni:

Canali del cloro voltaggio-dipendente	CLCN3, CLCN4, CLCN6
Canali del calcio voltaggio-dipendente	CACNA1A, CACNA1B, CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I, CACNA2D1, CACNB4, CACNG1, CACNG2, CACNG3, CACNG4, CACNG5, CACNG6, CACNG7, CACNG8
Canali del sodio voltaggio-dipendente	SCN2B, SCN3A, SCN3B, SCN4B
Canali del potassio	KCNA1, KCNA10, KCNA2, KCNA3, KCNA6, KCNAB1, KCNAB2, KCNAB3, KCNB1, KCNB2, KCNC1, KCNC2, KCNC3, KCNC4, KCND1, KCND2, KCND3, KCNF1, KCNG1, KCNG2, KCNG3, KCNG4, KCNH1, KCNH3, KCNH4, KCNH5, KCNH6, KCNH7, KCNH8, KCNJ10, KCNJ12, KCNJ13, KCNJ14, KCNJ15, KCNJ16, KCNJ3, KCNJ4, KCNJ5, KCNJ6/KCNJ7, KCNJ8, KCNJ9, KCNK1, KCNK10, KCNK12, KCNK13, KCNK18, KCNK2, KCNK3, KCNK4, KCNK9, KCNMA1, KCNMB3, KCNMB3L, KCNMB4, KCNN1, KCNN2, KCNN3, KCNQ2, KCNQ3, KCNQ5, KCNS1, KCNS2, KCNS3, KCNT1, KCNV1, KCNV2
Recettori del GABA	GABRA2, GABRA3, GABRA4, GABRA5, GABRA6, GABRB1, GABRB2, GABRB3, GABRD, GABRG1, GABRG3, GABRQ, GABRR1, GABRR2.

Successivamente l'analisi delle possibili varianti patogenetiche identificate nel probando verranno estese all'intero nucleo familiare.