



## **Protocollo dello Studio su gemelli monozigoti con fenotipo epilettico discordante**

*Amedeo Bianchi*

*Pasquale Striano*

*Antonio Gambardella*

*Federico Zara*

*Comm. Gen. LICE*

### **Background e razionale**

Negli ultimi anni stiamo assistendo ad un notevole sviluppo della genetica molecolare che ha modificato le conoscenze in molte patologie neurologiche; anche per le epilessie che sappiamo caratterizzarsi per una notevole variabilità fenotipica e per notevole complessità genetica le attuali tecniche di analisi molecolare hanno permesso la localizzazione di sede cromosomica e l'individuazione di mutazioni geniche. La strategia di studio ha percorso diverse linee di ricerca ed in primo luogo sono state privilegiate le rare forme sindromiche che si caratterizzano per una ereditarietà mendeliana o autosomica dominante (ad esempio crisi neonatali benigne familiari) o autosomica recessiva (ad esempio epilessie miocloniche progressive).

A differenza degli studi sulle famiglie, le indagini sui gemelli offrono il notevole vantaggio di poter direttamente stabilire se l'eventuale aggregazione riscontrata per un certo fenotipo all'interno di nuclei familiari sia causata da fattori genetici o da esposizioni ambientali comuni ai membri delle famiglie. Numerosi studi clinici sui gemelli, sulle famiglie e sull'elettroencefalogramma hanno cercato di definire la modalità di trasmissione genetica delle epilessie e la valutazione del rischio individuale. In particolare, è noto che il tasso di concordanza per epilessia è nettamente più alto nei gemelli monozigoti (circa 60%) rispetto ai gemelli dizigoti (circa 13%) (Bianchi, *Neurol Sci*, 2002). La concordanza appare differente nelle diverse forme sindromiche e Lennox segnala nella sua casistica di gemelli monozigoti una più alta incidenza nelle epilessie con crisi di 'grande male' (82%) e di 'piccolo male' (75%) rispetto alle forme con 'crisi psicomotorie' (39%). Gli studi successivi, e tra questi si segnala il contributo della casistica della Lega Italiana contro l'Epilessia (LICE), hanno confermato la prevalente



importanza del fattore genetico nelle epilessie idiopatiche con evidenza nei gemelli monozigoti di una concordanza anche per l'età di inizio e per il tipo di sindrome.

I gemelli, per le loro caratteristiche particolari, sono stati sempre oggetto di studio al fine di determinare il ruolo di fattori genetici ed ambientali nell'insorgenza e sviluppo di molteplici patologie (Boomsma, Nat Rev Genet 2002). L'applicazione della tecnologia dei microarray allo studio dei gemelli è solo agli inizi, e nonostante ciò apprezzabili risultati sono stati raggiunti. L'analisi dell'espressione genica in coppie di gemelli MZ discordanti per patologie oncologiche e psichiatriche suggerisce che influenze ambientali sia nel periodo prenatale sia post-natale possano determinare differenze fenotipiche. La ricerca a riguardo si sta indirizzando verso lo studio delle modificazioni a carico del DNA definite epigenetiche. Queste interessano principalmente l'acetilazione degli istoni e la metilazione delle citosine e comportano un rimodellamento della cromatina e modificazioni conformazionali. In ultima analisi questi ultimi eventi possono indurre alterazioni nei siti di legame per i fattori di trascrizione con conseguente silenziamento o attivazione dell'espressione genica. L'evoluzione della tecnologia dei microarray permette oggi l'analisi dell'espressione genica alla caratterizzazione di amplificazioni e delezioni geniche, allo studio di siti di legame dei fattori di trascrizione e all'analisi di mutazioni epigenetiche (van Steensel, 2005). Recentemente è stata considerata la possibilità di utilizzare questa tecnologia in epidemiologia genetica che ha l'obiettivo di definire come i fattori genetici e ambientali interagiscono nello sviluppo delle malattie complesse (Devlin et al., 2001), come l'epilessia. L'attuale proposta di studio LICE si prefigge di identificare e studiare coppie di gemelli omozigoti con fenotipo epilettico discordante. L'unico studio esistente in questo senso è di Helbig et al. (2008) che hanno studiato l'espressione 'genome-wide' in linee cellulari linfoblastoidi di gemelli monozigoti discordanti per CAE, dimostrando l'alterazione dell'espressione dei geni EGR1 (un 'immediate early gene') e RCN2 (codificante per la proteina legante il calcio reticulocalbina 2).

## **Pazienti e metodi**

### *Criteria di inclusione*

Saranno inclusi coppie di gemelli monozigoti con diagnosi di epilessia generalizzata o focale idiopatica a fenotipo discordante (e.g., sindromi diverse o caratteristiche EEG



differenti tra loro); la presenza di convulsioni febbrili o familiarità per epilessia non costituirà criterio di inclusione/esclusione.

*Studio genetico*

- Test di zigosità (se non già disponibile) tramite analisi PCR ed OLA (Oligonucleotide Ligation Assay);
- Studio delle metilazione mediante amplificazione delle isole CpG metilate.

*Modalità di prelievo e trattamento del campione*

- Prelievo di 10-20 ml di sangue periferico in EDTA. E' necessario, ai fini dello studio, prelevare anche i genitori. Includere nella spedizione dati clinici dei pazienti.
- Concordare con Federico Zara ([federicozara@ospedale-gaslini.ge.it](mailto:federicozara@ospedale-gaslini.ge.it), 010-5636603) o Pasquale Striano ([pstriano@email.it](mailto:pstriano@email.it)), l'invio del materiale mediante corriere espresso a temperatura ambiente. Non è necessario ghiaccio secco. Indirizzo di spedizione: Laboratorio di Neurogenetica, Dipartimento di Pediatria, Ospedale Gaslini, Largo Gaslini 5, 16147 - Genova.