

Antonietta Coppola

Titolo

Dissecting the genetic aetiology of Eyelid Myoclonia with Absences by Exome Sequencing

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Dr Antonietta Coppola MD, PhD

Epilepsy Centre, Department of Neuroscience, Reproductive and Odontostomatological Sciences, Federico II University of Naples

Building 17, Via Pansini 5, 80131, Napoli

Durante il progetto sono state svolte le seguenti attività rispettando gli obiettivi dello studio in oggetto:

- 1) Selezione di pazienti affetti da Eyelid Myoclonia with Absences (EMA) secondo i criteri clinici ed elettrofisiologici stabiliti dal progetto (mesi 0-9 dall'inizio del progetto).
 - Sono stati selezionati 81 probandi reclutati presso 13 Centri Epilessia di cui 12 centri appartenenti al network di centri riconosciuti dalla Lega Italiana Contro l'Epilessia (il tredicesimo centro è il Dipartimento di Epilessia sperimentale della University college of London). Per ogni paziente è stato ottenuto DNA genomico (estratto da sangue in EDTA presso l'Istituto Giannina Gaslini di Genova). Di questi pazienti per 32 è stato possibile ottenere il trios (raccolta del dna sia del probando che dei due genitori); per altri 36 non è stato possibile prelevare i genitori (singletons); in due casi il trios è rimasto incompleto non essendo stato possibile prelevare uno dei due genitori. Sono state inoltre raccolte 4 famiglie: tre con due membri affetti ed una con 4 membri affetti. Il numero totale di campioni raccolti è 154.
- 2) Un totale di 112 campioni (58 probandi) sono stati sequenziati presso l'Istituto deCODE in Islanda (mesi 3-10) mediante piattaforma Illumina HiSeq 2000 utilizzando il kit Nextera Exome Enrichment specificamente utilizzato per analizzare le regioni codificanti del genoma (esoma). La lettura delle varianti è stata effettuata con il software GATK.
- 3) Analisi bioinformatica dei dati ottenuti mediante exome sequencing (mesi 6-10). L'analisi è stata suddivisa in due sotto-analisi principali. La prima analisi è stata condotta sui trios alla ricerca di mutazioni *de novo* (presenti nei probandi ed assenti nei genitori).

La seconda analisi è stata effettuata sui singletons alla ricerca di varianti ultra-rare con predizione di patogenicità secondo i software utilizzati.

- 4) Le varianti risultate patogene dopo analisi dei dati di exome sequencing sono state confermate con seconda metodica ovvero con sequenziamento diretto di Sanger (mesi 8-12).

RISULTATI

1. Sono stati raccolti un totale di 154 campioni, di cui 81 sono i probandi. Per ogni probando è stata raccolta una dettagliata storia clinica, familiare, EEG-grafica, di neuroimaging e farmacologica.
2. Sono stati sequenziati con successo 107 campioni (per 5 campioni la qualità dell'analisi non ha permesso di superare gli standard qualitativi). Di questi 107 campioni, 52 sono probandi.
3. L'analisi dei trios è stata possibile per 24 trios. Questa analisi ha permesso di individuare 11 mutazioni *de novo* in nove geni differenti, tutte confermate mediante sequenziamento Sanger: *CHD2* (2 casi), *KIAA2022*, *SPARCL1*, *SCO1*, *MSL2*, *SNX13*, *FBN1*, *TYRO3*, *CTNNA2*, *GPR161*, *MYO10*.
4. La seconda analisi è stata effettuata sui singletons alla ricerca di varianti ultrarare. Sono stati analizzati gli esomi di 28 probandi individuando due mutazioni: una nel gene *CHD2* ed una nel gene *KCNH5*. Entrambe sono state confermate mediante sequenziamento Sanger.
5. Lo studio in oggetto ha permesso di individuare una certa eterogeneità genetica, essendo state riscontrate mutazioni in geni diversi. La raccolta dei dati anamnestici ha permesso di fare correlazioni genotipo-fenotipo per i tre pazienti con mutazione in *CHD2*: tutti e tre i pazienti con mutazione in *CHD2* presentano oltre all'EMA, disabilità intellettive e/o disturbi neuropsichiatrici peculiari.

SVILUPPI FUTURI

L'analisi dei risultati è tutt'ora in corso, e sarà integrata con i dati ottenuti dal sequenziamento dei campioni rimanenti. Questo studio ha permesso di porre le basi per studi futuri che saranno volti a:

- completare l'analisi dei dati (analisi di network e di enrichment su tutta la popolazione;

ricerca di CNVs e burden analysis)

- effettuare correlazioni con dati funzionali in vivo mediante fMRI
- studi funzionali su modello animale (zebrafish)

I risultati di questo progetto saranno presentati alla Riunione Policentrica che si terrà a Roma il 26 Gennaio 2018 e alla riunione Nazionale della Lega Italiana contro l'Epilessia che si terrà a Roma a Giugno 2018.

Il progetto prevede la pubblicazione di due lavori scientifici, in fase di elaborazione: uno relativo alle correlazioni genotipo-fenotipo e l'altro relativo ai dati funzionali.

Napoli 21/11/2017