



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata

*La Morte Improvvisa ed Inaspettata in Soggetti Epilettici
(SUDEP): dalla diagnosi alla prevenzione.*

*Sudden Unexpected Death in Epileptic Subjects (SUDEP):
from diagnosis to prevention.*

Tesi di Laurea Magistrale
di: **DE NICOLA
FRANCESCA**

Relatore
Chiar.mo Prof.
PESARESI MAURO

Sessione Straordinaria Febbraio 2023

Anno Accademico 2021 - 2022

INDICE

Capitolo 1	5
INTRODUZIONE	5
1. <i>Morte Improvvisa e Inaspettata nell'epilessia</i>	5
1.1 <i>Origine e classificazione delle crisi epilettiche</i>	6
1.1.1 <i>Crisi Focali</i>	8
1.1.2 <i>Crisi Generalizzate</i>	9
1.1.3 <i>Crisi ad esordio sconosciuto</i>	10
1.2 <i>Classificazione Sudep</i>	10
1.3 <i>Epidemiologia</i>	11
1.4 <i>Fattori di rischio</i>	12
1.5 <i>Valutazione di rischio Sudep: Biomarcatori ed Inventari</i>	14
1.6 <i>Misure di prevenzione</i>	17
1.6.1 <i>Chirurgia dell'epilessia</i>	18
1.6.2 <i>Misure palliative: VNS e RNS</i>	19
1.7 <i>Valutazione Post-mortem</i>	21
1.7.1 <i>Esame esterno:</i>	21
1.7.3 <i>Esame tossicologico:</i>	24
1.7.4 <i>Esame genetico</i>	25
1.8 <i>Genetica Sudep</i>	27
Capitolo 2	31
INFORMAZIONE GENETICA	31
2. <i>Genetica Molecolare</i>	31
2.1 <i>Struttura ed organizzazione del patrimonio genetico</i>	33
2.2 <i>Variabilità genetica: Mutazioni e Polimorfismi</i>	37
2.2.1 <i>Tipologie di mutazioni</i>	37
2.2.2 <i>Interpretazione delle varianti di sequenza</i>	42
2.2.2.1 <i>Principali tools bioinformatici</i>	45
Capitolo 3	50
SCOPO DELLA TESI	50
Capitolo 4	52
TECNICHE DI ANALISI	52
4. <i>Sequenziamento del DNA</i>	52
4.1 <i>Sequenziamento Sanger</i>	53

4.2	<i>Next Generation Sequencing: NGS</i>	57
4.2.1	<i>Tecnologia Ion Torrent- piattaforma Ion PGM™ System</i>	59
Capitolo 5.....		62
MATERIALI E METODI.....		62
5.	<i>Campionamento</i>	62
5.1	<i>Estrazione del DNA con QIAamp® DNA Micro kit</i>	64
5.2	<i>Quantificazione con Qubit™</i>	67
5.3	<i>Sequenziamento Sanger</i>	70
	<i>Reazione di amplificazione</i>	71
	<i>Quantificazione dei prodotti di amplificazione</i>	72
	<i>Purificazione dei prodotti di amplificazione</i>	74
	<i>Reazione di sequenza</i>	75
	<i>Rimozione dei ddNTPS non incorporati</i>	77
	<i>Elettroforesi capillare</i>	78
	<i>Analisi delle sequenze</i>	79
5.4	<i>Next Generation Sequencing</i>	80
5.4.1	<i>Preparazione delle librerie con kit Ion AmpliSeq™2.0</i>	80
	<i>Amplificazione della regione target</i>	81
	<i>Digestione parziale degli ampliconi</i>	83
	<i>Ligazione dei barcode</i>	84
	<i>Purificazione delle librerie</i>	86
	<i>Amplificazione aggiuntiva delle librerie con Platinum™</i>	88
	<i>Purificazione delle librerie riamplicate con Platinum™</i>	89
	<i>Quantificazione con Agilent 2200 Tape Station System</i>	92
5.4.2	<i>Templating</i>	94
	<i>Emulsion PCR- Ion OneTouch 2™</i>	97
	<i>Arricchimento/Purificazione delle librerie- Ion OneTouch™ ES</i>	100
	<i>Analisi Bioinformatica:</i>	106
Capitolo 6.....		109
RISULTATI.....		109
6.1	<i>Risultati della Quantificazione degli Estratti</i>	109
6.2	<i>Risultati della quantificazione delle librerie</i>	110
6.3	<i>Risultati Sequenziamento Sanger</i>	115
6.4	<i>Risultati del Sequenziamento e analisi del Coverage</i>	120

6.4.1	<i>Risultati del Sequenziamento NGS</i>	127
Capitolo 7		141
DISCUSSIONE		141
PROSPETTIVE FUTURE		149
BIBLIOGRAFIA		150

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1. Morte Improvvisa e Inaspettata nell'epilessia

La Sudep (Sudden Unexpected Death in Epilepsy) è definita come la morte improvvisa, inaspettata, testimoniata o non testimoniata, non traumatica e di non annegamento in pazienti con epilessia con o senza evidenza di un attacco, ed escludendo lo stato epilettico documentato, in cui l'esame post-mortem non rivela una causa strutturale o tossicologica per la morte (Nashef et al, 2012).

Rappresenta la causa più comune di mortalità prematura correlata all'epilessia (Walczak et al., 2001), seconda solo all'ictus nel numero di pazienti morti con malattie neurologiche (Whitney e Donner, 2019).

Pazienti affetti da epilessia hanno tra due o tre volte più probabilità di morire precocemente rispetto alla popolazione generale. Vi sono diverse possibili cause di morte, riportate in pazienti con epilessia, tra cui complicanze convulsive, stato epilettico o persino suicidio, ma la causa principale ed attuale è la SUDEP (Coll et al., 2019). Sebbene il fenomeno di morte improvvisa, ovvero senza una causa chiara, in giovani sani sia stato annotato nei primi scritti scientifici del 19° secolo, negli ultimi 25 anni c'è stato un crescente interesse che ha portato ad una ripresa nelle indagini sulla mortalità correlata

all'epilessia, provvedendo ad identificare strategie in grado di ridurre i casi di morte. Le famiglie in lutto per l'epilessia hanno svolto un ruolo importante nel promuovere la consapevolezza e la ricerca (Panelli et al, 2020).

1.1 Origine e classificazione delle crisi epilettiche

L'epilessia è un disturbo neurologico che coinvolge il sistema nervoso centrale caratterizzato da crisi epilettiche ricorrenti (l'espressione della disorganizzazione di un gruppo di neuroni presenti nella corteccia cerebrale con o senza convulsioni) ed è causata dall'alterazione delle correnti ioniche che attraversano la membrana di queste cellule cerebrali impedendo così il passaggio di un'informazione (Fig. 1).

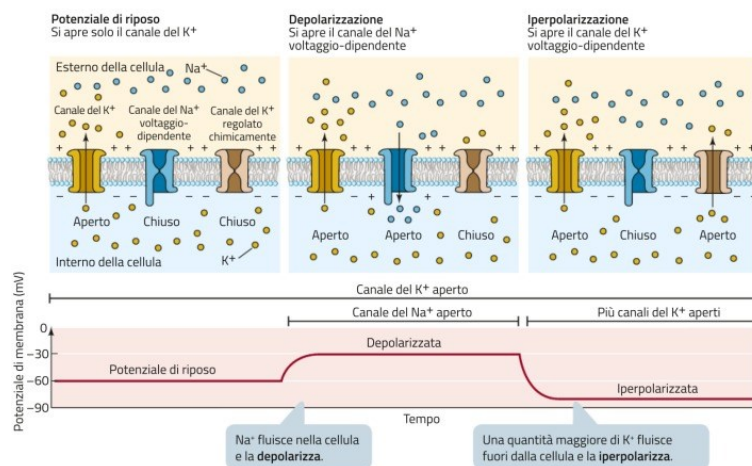


Fig.1 Rappresentazione dei flussi ionici che portano ai cambiamenti del potenziale di membrana. (Sadava et al. La nuova biologia. Blu© Zanichelli 2016)

Ciò che si verifica è uno sbilanciamento tra le correnti eccitatorie (neurotrasmettitori GABA) e le correnti inibitorie (neurotrasmettitore glutammato) e si verifica uno stato in cui il neurone è sempre eccitato e questo comporta l'interruzione transitoria della normale funzionalità cerebrale. Questo meccanismo è considerato alla base dell'epilettogenesi (Zara F., 2006).

Dopo la prima crisi, dovuto ad un evento scatenante, si assiste ad un periodo latente durante il quale il processo di epilettogenesi induce alterazioni progressive dello stato di coscienza, sensazioni anomale, movimenti focali involontari o convulsioni (diffuse e violente contrazioni involontarie della muscolatura volontaria) (Militeri, 2009). Oggi, l'epilessia è identificata come malattia sociale con D.M. n° 249/65 (Manzoni et al., 2012).

Sulla base delle manifestazioni cliniche, siamo in grado di classificare le crisi epilettiche, mediante strumenti diagnostici (per esempio l'elettroencefalogramma- EEG) in focali, generalizzate e ad esordio sconosciuto (Fisher et al. 2017) (*Fig.2*).

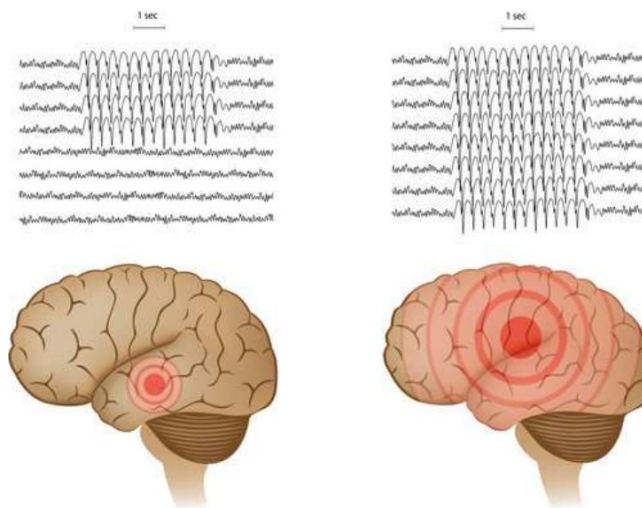


Fig.2 Raffigurazione della variazione del tracciato EEG nelle crisi parziali (sinistra) e nelle crisi generalizzate (destra) in un secondo. (<https://www.medimagazine.it/epilessia-e-depressione-possono-condividere-una-causa-genetica-comune/>)

1.1.1 Crisi Focali

Le crisi focali sono tali se originate all'interno di reti neuronali limitate ad un solo emisfero cerebrale, più o meno circoscritte e localizzate in sede corticale e/o sottocorticale. Nell'ambito delle crisi focali è importante, quando possibile, stabilire se la consapevolezza, durante l'evento, sia conservata o compromessa. Nel primo caso, la persona è consapevole di ciò che accade intorno a sé e di ciò che vive durante la crisi e, in genere, è in grado di riferirlo in un secondo momento. Le crisi focali possono evolvere in crisi bilaterali tonico-cloniche (in precedenza note come crisi secondariamente generalizzate) qualora avvenga il

coinvolgimento di circuiti corticali bi-emisferici ovvero quando la scarica epilettica si diffonde da un emisfero cerebrale all'altro (Fisher et al. 2017).

1.1.2 Crisi Generalizzate

Le crisi generalizzate, un tempo note come crisi del grande male, sono dovute all'attivazione patologica simultanea di reti corticali che interessano entrambi gli emisferi. Le crisi generalizzate sono per la maggioranza con compromissione della consapevolezza e della coscienza (Fisher et al. 2017).

Si distinguono in:

- motorie, tra cui le più ricorrenti sono le tonico-cloniche (GTCS), che coincidono con l'inizio della crisi in cui il paziente tende a contrarre la muscolatura, se è in piedi cade a terra, si irrigidiscono i 4 arti e può avvenire la morsicatura della lingua.
- non motorie, definite come crisi di assenza. Sono tipiche dell'età infantile e alla fine della crisi, che dura pochi secondi, il paziente riprende l'attività che stava svolgendo. Possono manifestarsi molto frequentemente durante la giornata mantenendo il tono muscolare. Nel caso in cui il paziente perda il tono muscolare vengono dette assenti *atipiche* con prognosi più sfavorevoli (Bertora et al, 2015)

È evidente come la diagnosi differenziale tra i due tipi possa essere non sempre agevole, in questi casi l'EEG rappresenta uno strumento indispensabile, utile particolarmente per differenziare le crisi focali con consapevolezza compromessa dalle generalizzate (Fisher et al. 2017).

1.1.3 Crisi ad esordio sconosciuto

Con questo termini ci si riferisce a quelle situazioni in cui non è possibile distinguere se l'esordio clinico sia focale o generalizzato (Fisher et al. 2017).

1.2 Classificazione Sudep

Secondo la più recente proposta di definizione e classificazione unificata di SUDEP (Fazel et al., 2013; Nashef et al., 2012), SUDEP può essere classificato nelle seguenti categorie:

- SUDEP Definita (Definite SUDEP): morte non traumatica e di non annegamento in un individuo con epilessia. L'esame post-mortem non rivela una causa di morte strutturale nota;
- SUDEP Definita Plus (Definite SUDEP plus): presenza di una concomitante condizione oltre l'epilessia, ed entrambe concorrono alla morte;

- SUDEP probabile o SUDEP Plus (probable SUDEP O SUDEP plus): stesse condizioni di Definite SUDEP e Definite SUDEP plus ma senza aver condotto un esame post-mortem;
- SUDEP possibile (Possible SUDEP): quando è presente una possibile causa di morte oltre alla sudep;
- Quasi SUDEP o quasi SUDEP plus: un paziente con epilessia che sopravvive per più di un'ora dall'arresto cardiorespiratorio e non ha cause strutturali identificate dopo aver compiuto indagini specifiche;
- Non SUDEP (Not SUDEP): morte improvvisa in un individuo con epilessia con una chiara causa di morte diversa dalla SUDEP (ad esempio, infarto miocardico, emorragia cerebrale);
- Non classificato (Unclassified): quando ci sono informazioni incomplete o impossibile da classificare.

1.3 Epidemiologia

Le crisi, in particolare GTSC (crisi tonico-cloniche generalizzate) incontrollate, sono direttamente proporzionali ad un aumento della mortalità, specialmente nei neonati e nelle popolazioni giovani. L'incidenza della SUDEP varia a seconda della popolazione campione, della fascia di età, del tipo di epilessia,

dei sistemi di classificazione, dei metodi di diagnosi, della causa di morte registrata (Devinsky et al.2016; Dlouhy et al., 2016) e sesso.

Le attuali linee guida dell'American Accademy of Neurology raccomandano che i medici informino che la SUDEP colpisce annualmente 0,2 ogni 1000 persone all'anno nei bambini con epilessia e 1,2 ogni 1000 persone ogni anno negli adulti con epilessia (Harden C. et al, 2017). Le stime sono maggiori nella giovane età adulta e nel sesso maschile.

1.4 Fattori di rischio

La causa principale di SUDEP rimane sconosciuta e più di un meccanismo sembra svolgere un ruolo. I fattori di rischio identificati in studi caso-controllo variano, ma alcuni di questi fattori risultano più ricorrenti (Coll et al, 2019). Difatti, una recente analisi ha classificato i 10 principali fattori di rischio derivati da studi basati su una coorte di individui morti improvvisamente per epilessia, i quali sono mostrati nella *Tabella 1 (Harden et al.,2017)* riportati qui di seguito:

Fattori di rischio	Odds ratio ponderato (Log OR ± Errore Standard (SE))
>3 GTCS per anno (contro 0 convulsioni)	12.10
>13 convulsioni di qualsiasi tipo (contro 0-2 convulsioni)	4.20
Nessun trattamento con AED * (contro 1-2 AEDs)	3.78
3 AEDs (versus 1)	3.24
≥3 GTCS nell'ultimo anno (contro 0)	3.04
11-20 GTCS negli ultimi 3 mesi (contro 0-5)	2.39
Età all'esordio 0-15 years (contro >45 anni)	2.29
IQ <70	2.23
3-5 variazioni di AEDs all'anno (contro 0)	2.16
>3 AEDs nell'ultima visita (contro 0-2)	1.96

Tab. 1 Principali fattori di rischio: SUDEP, morte improvvisa e inaspettata nell'epilessia; GTCS, crisi tonico-cloniche generalizzate; AED, farmaci antiepilettici; IQ, quoziente intellettuale. (Coll et al., 2019)

Inoltre, per convenzione, i fattori di rischio sono classificati in:

-*Statici*: costituiti principalmente da fattori demografici. Il sesso maschile e l'età di insorgenza precoce delle crisi (<16 anni), la durata più lunga dell'epilessia (>15 anni), l'età compresa tra 20-40 anni e la disabilità intellettiva sono responsabili del rischio di SUDEP (Tomson et al., 2016; Hesdorffer et al., 2011). Inoltre, oltre alle condizioni neurologiche, anche le comorbidità psichiatriche predispongono alla Sudep (Harden et al., 2017).

-*Genetici*: Numerosi geni neurocardiaci sono stati identificati come biomarcatori genomici di gravità e dell'esito della malattia, aiutando a

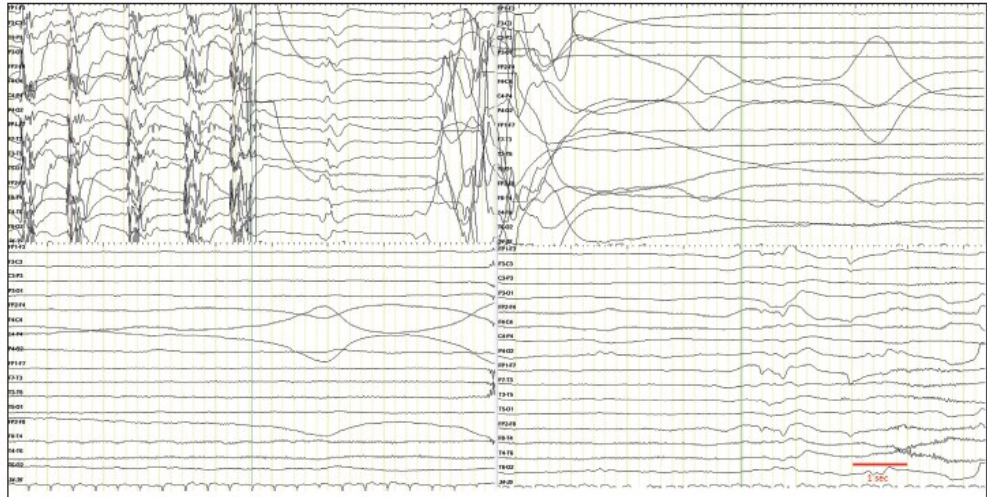
prevedere l'incidenza di Sudep (Manolis et al., 2018). Inoltre, è stato evidenziato che diverse alterazioni patogene comportano un aumento del rischio di Sudep. Questi geni codificano per proteine correlate all'epilessia e al sistema cardiorespiratorio (Leu et al., 2015; Thom et al., 2018).

-Modificabili: Da un punto di vista clinico, appaiono come fattori molto importanti da tenere in considerazione poiché tramite essi è possibile intervenire per ridurre il rischio di SUDEP. Tra queste si annoverano la frequenza delle convulsioni, mancanza di adeguato trattamento farmacologico antiepilettico (AED), abuso di alcool, comorbidità, problemi di salute correlati, quali aritmie e problemi respiratori legati al sonno, in particolar modo l'apnea ostruttiva (Elmali et al., 2019).

1.5 Valutazione di rischio Sudep: Biomarcatori ed Inventari

Per valutare il rischio di SUDEP in pazienti epilettici si valutano safety checklist, ovvero liste di controllo di sicurezza, inventario Sudep-7 e test genetici, studiando i cambiamenti EEG associati a SUDEP (Bhasin et al., 2021). Inoltre, è importante identificare un sottogruppo di persone che sono ad alto rischio di SUDEP per lo sviluppo di misure preventive e per l'elaborazione di potenziali strategie terapeutiche (Elmali et al. 2019). Distinguiamo:

-Biomarcatori: sono indicatori biologici, genetici o biochimici con alto valore prognostico e predittivo, ovvero in grado di predire una malattia e di indirizzarla verso trattamenti che potrebbero aver maggior successo. Sono per lo più rilevati tramite studi elettrofisiologici (EEG, elettroencefalogramma; ECG, elettrocardiogramma) e di neuro-imaging. Tra i principali biomarcatori, rilevati tramite elettrocardiogramma (ECG) troviamo l'HRV (variazione della frequenza cardiaca) il quale è inversamente proporzionale al rischio di Sudep. Difatti, elevate frequenze cardiache ictali, anomalie di ripolarizzazione cardiaca (accorciamento o allungamento dell'intervallo QT) sono associate a rischio di SUDEP aumentato (Nei et al., 2004; Surges et al., 2010). Tramite elettroencefalografia si può rilevare PGES, altro biomarcatore per Sudep, soprattutto se dura più di 80 secondi. PGES è la soppressione EEG generalizzata post-ictale vista in seguito ad un attacco tonico-clonico generalizzato. In alcuni pazienti SUDEP, le registrazioni EEG dopo crisi terminali avevano dimostrato PGES (*Fig. 3*) (Bhasin et al., 2021). Queste conclusioni hanno avviato il dibattito sul suo potenziale ruolo come predittore del rischio futuro di SUDEP e anche nella fisiopatologia della SUDEP, in cui l'evento scatenante è considerato come "arresto elettrocerebrale". "



*Fig.3 Un esempio di soppressione elettroencefalografica generalizzata post-ictale nell'EEG a seguito di un attacco clonico tonico generalizzato. (Filtro passa-basso, 70 Hz; Filtro passa-alto, 0,5 Hz; Filtro notch, 50 Hz; Sensibilità, 100 μ V).
(Ayşe Deniz ELMALI Nerses BEBEK Betül BAYKAN, let's talk Sudep)*

-Inventari: sono strumenti più pratici in ambito clinico e più adatti per uno screening preciso. L'idea di prevedere il rischio di Sudep ha portato allo sviluppo dell'inventario SUDEP-7 utilizzando i fattori più convalidati come elementi, presenti di seguito nella *Tabella 2*.

1. Più di 3 crisi tonico-cloniche nell'ultimo anno	0 o 2
2. Uno o più attacchi tonico-clonici nell'ultimo anno (Non assegnare un punteggio se è selezionato il fattore di rischio 1)	0 o 1
3. Uno o più crisi di qualsiasi tipo negli ultimi 12 mesi (Non assegnare un punteggio se è selezionato il fattore di rischio 4)	0 o 1
4. >50 crisi di qualsiasi tipo al mese negli ultimi 12 mesi	0 o 2
5. Durata dell'epilessia \geq 30 anni	0 o 3
6. Uso attuale di 3 o più DAE	0 o 1
7. Ritardo mentale, QI <70, troppo compromesso per essere testato	0 o 2

*Tab.2 Inventario fattori di rischio Sudep-7: DAE: farmaci anti-epilettici; QI: quoziente intellettuale.
(DeGiorgio CM, Curtis A, Hertling D, Moseley BD. Morte improvvisa inaspettata nell'epilessia: fattori di rischio, biomarcatori e prevenzione. Acta Neurol Scand 2018;139:220–230)*

Lo studio di Novak et al., del 2015 si poneva l'obiettivo di esplorare l'inventario SUDEP-7 in una coorte di pazienti epilettici resistenti ai farmaci (DRE) e determinare l'associazione con la frequenza cardiaca e altre covariate quali, età e sesso. Sono stati raccolti dati demografici, durata dell'epilessia, tipi di convulsioni, frequenza e gravità delle crisi e DAE. La variabilità della frequenza cardiaca (HRV) è stata calcolata da registrazioni di 1 h di ECG. I risultati suggeriscono che l'età avanzata, la maggiore durata dell'epilessia e la presenza di disabilità intellettiva dello sviluppo possono aumentare il rischio di SUDEP attraverso la loro influenza diretta sulla riduzione dell'HRV mediata dal nervo vago. È indicata un'ulteriore convalida dell'inventario SUDEP-7.

1.6 Misure di prevenzione

Le strategie che possono essere attuate per limitare il rischio SUDEP tenendo conto fattori di rischio modificabili, includono: supervisione notturna, monitoraggio delle crisi, cuscini anti-suff per proteggere le vie aeree, evitare di dormire in posizione prona, inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina ed inibitori degli oppiacei (Bhasin et al., 2021)

Al fine di prevenire le crisi, una delle prime misure di prevenzione del rischio SUDEP, è senza dubbio il trattamento con farmaci antiepilettici (AED).

Trattamenti efficaci sono possibili solo in due terzi dei pazienti in quanto, un terzo dei pazienti con epilessia potrebbe sviluppare una resistenza a farmaci antiepilettici (DRE) e perciò non sarà libero da crisi con i soli AED. Questa tipologia di pazienti richiederà un'ulteriore valutazione e ulteriori modalità di trattamento come interventi chirurgici per l'epilessia e stimolatori neurali (Elmali et al., 2019).

1.6.1 Chirurgia dell'epilessia

Sperling et al. hanno dimostrato che la chirurgia dell'epilessia è associata ad una ridotta mortalità nei pazienti idonei rispetto al solo trattamento con AED (Sperling et al., 2016). Alla chirurgia, infatti, è associata a una drastica diminuzione del rischio di SUDEP, ma solo se ha successo (Sperling et al., 1999). I tassi di SUDEP scendono da 6,3-9,3 a 1,8-4,0 per 1000 pazienti/anno dopo il successo della chirurgia resettiva (DeGiorgio et al., 2018). Ci sono prove convincenti che i pazienti con crisi scarsamente controllate, sono a rischio maggiore di SUDEP e un attacco è spesso visto come l'evoluzione terminale. Intuitivamente, quindi, un buon controllo delle crisi dovrebbe tradursi in un ridotto rischio di SUDEP. La rimozione chirurgica della zona epilettogena è un efficace trattamento di controllo delle crisi, ma il suo ruolo nella prevenzione Sudep è discutibile (Salanova et al., 2002; Sperling et al.,

2015). È probabile che pazienti che falliscono la chirurgia del lobo temporale possano avere la zona epilettogena che coinvolge regioni extratemporali del cervello che controllano le funzioni cardiorespiratorie, portando ad un aumento del rischio di Sudep post-operatorio (Ryvlin et al., 2006). Uno studio ha valutato i tassi di mortalità di 393 pazienti sottoposti a chirurgia epilettica; il tasso di mortalità standardizzato (SMR) per i pazienti con crisi ricorrenti post-operatorie è stato di 4,69, con un'incidenza SUDEP di 7,5/1000 pazienti-anno, mentre nei pazienti liberi da crisi, non vi è stata alcuna differenza nel tasso di mortalità rispetto a una popolazione comparata per età e sesso (Sperling et al, 1999). Questo si confronta con studi simili che, ad esempio, hanno trovato un SMR di 1,8 in quelli con un buon esito post-operatorio contro 7,4 in coloro che hanno fallito l'intervento chirurgico (Salanova et al., 2002). Sfortunatamente, i programmi di chirurgia dell'epilessia sono costosi e non disponibili per molti pazienti resistenti ai farmaci.

1.6.2 Misure palliative: VNS e RNS

La stimolazione del nervo vago (VNS) e la neuro stimolazione responsiva (RNS) viene applicata a pazienti con crisi epilettiche resistenti a farmaci AED e che non sono candidati ad interventi di chirurgia epilettica. Consiste nell'impianto chirurgico sottocutaneo di un piccolo generatore di impulsi a

batteria, posizionato nel torace, e mediante l'utilizzo di fili sottili, erogano impulsi al nervo vago sinistro che a sua volta trasmette impulsi alle aree del cervello coinvolte nel sonno (Wikipedia). L'impianto di stimolatori è una tecnica piuttosto recente, difatti, sono state approvate negli ultimi dieci anni e sebbene si sospetti che l'utilizzo di queste tecniche aumenti il rischio di SUDEP, causando l'aritmia cardiaca e la soppressione della respirazione, nessuno studio ha fornito prove soddisfacenti (Giordano et al., 2017). D'altro canto, esistono numerosi studi che hanno dimostrato che la VNS riduce significativamente il rischio di SUDEP (Grambichler et al., 2015). La riduzione del rischio aumenta nei primi due anni successivi dall'impianto e successivamente si stabilizza (Annagers et al., 1998; Annagers et al., 2000).

Devinsky et al. hanno riportato un modesto tasso di SUDEP (2,0/1000 paziente/anno di stimolazione) con un controllo favorevole delle crisi con sistemi RNS. Bergey et al. hanno riportato un tasso SUDEP (3,5 per 1000 pazienti/ anno di stimolazione) con un controllo delle crisi favorevole e profilo di sicurezza per i sistemi RNS in pazienti con epilessia focale.

1.7 Valutazione Post-mortem

Nei casi di morte improvvisa correlata all'epilessia, è necessario ed obbligatorio, un esame post-mortem che comprenda: esame esterno, autopsia, valutazione istologica e tossicologica con la misurazione dei livelli di anticonvulsivanti (Clark et al., 2016), principalmente per escludere una causa anatomica (ad es. cardiaca) o altra causa di morte. La morte può essere il risultato diretto di un attacco epilettico stesso o il risultato di cause secondarie innaturali come traumi o annegamento in pazienti epilettici. È stato riportato che attacchi epilettici improvvisi sono responsabili del 2-17% dei decessi tra gli individui epilettici (Barranco et al., 2020).

1.7.1 Esame esterno:

In letteratura esistono diversi studi riguardanti l'ispezione cadaverica esterna nei casi conclamati SUDEP. Lear-kaul et al. hanno esaminato 39 casi di SUDEP in cui nel 58% dei casi vi erano segni compatibili con un attacco precedente come ad esempio morso sulla lingua, lesione cutanea superficiale. Shields et al. hanno riscontrato, nei casi di decessi correlati all'epilessia, petecchie sulla pelle, contusioni della lingua e delle labbra e iperplasia delle gengive. Secondo Coyle et al. su 11 casi di SUDEP il 27,5% hanno indicato

lacerazioni o segni di morsi della lingua. Nel lavoro di Esen Melez et al. Le lesioni della lingua sono state identificate nel 72,5% dei casi di SUDEP. Tuttavia, però, un primo problema nei casi di decessi correlati ad epilessia è che spesso i dati circostanziali (relativi a dati clinici, anamnesi epilettica, agli esami diagnostici e terapia performante) sono assenti o incompleti ed inoltre il decesso non è spesso testimoniato.

1.7.2 Autopsia:

Esame interno volto alla dissezione di parti del corpo interessate, prelievo di un campione di ogni organo per ulteriori analisi microscopiche o tossicologiche al fine di stabilire la causa di morte che ha condotto il paziente al decesso. Organi coinvolti nell'accertamento autoptico sono: cuore, polmoni, cervello.

Cuore: Lo studio di Esen Melz et al, 2016 ha valutato il peso dei cuori, nel loro insieme senza staccare separatamente alcuna camera, di 112 pazienti con una precedente diagnosi di epilessia. Di questi 112, le cause del decesso hanno riportato 40 pazienti morti per Sudep, 14 per malattie cardiovascolari, 10 per altre malattie, 20 per cause innaturali e non è stato possibile determinare una causa di morte in 28 casi. Basandosi solo sui 40 casi Sudep, in 19 casi (47,5%) i cuori erano in sovrappeso e all'esame istologico è stato rilevato ipertrofia in

11 casi. La presenza di ipertrofia e reperti di tessuto cicatriziale miocardico all'esame microscopico sicuramente erano più elevati per i pazienti morti per malattie cardiovascolari rispetto a quelli del gruppo Sudep. Tuttavia, come spiegato nel suo articolo, la malattia cardiaca preesistente è una considerazione importante per la potenziale base cardiaca della SUDEP.

Polmoni: l'indagine autoptica dell'apparato respiratorio è stato ampiamente discusso in letteratura. I testi di Shields et al., Barrow et al., Antoniuk et al. hanno individuato la presenza di un edema polmonare. Nello studio di Esen Melez et al., 2016 l'esame macroscopico ha riportato presenza di petecchie sub pleuriche sulle superfici interlobari dei polmoni ipossici e risultati dell'esame microscopico dei polmoni e del cervello ha rivelato edema cerebrale in 24 (60%) ed edema polmonare in 37 (92,5%) casi di SUDEP. Tutti i pazienti con edema cerebrale (n = 24, 60%) avevano anche edema polmonare. L'edema polmonare solitario è stato osservato in 13 casi (32,5%) e non è stato osservato edema polmonare o cerebrale in tre (7,5%).

Cervello: l'esame del cervello, condotto tramite rimozione e analisi dello stesso dopo un periodo di messa in formalina, consiste nel prelevare specifici campioni (ippocampo, amigdala, gangli basali, insula, corteccia frontale, talamo, cervelletto, tronco encefalico e qualsiasi area lesionata o anormale) da

entrambi gli emisferi affinché le lesioni epilettogene possano essere lateralizzate (Thom et al., 2018). Le anomalie macroscopiche più frequentemente riportate, correlate a SUDEP, includono contusioni pregresse o infarto cerebrale, evidenze di precedenti siti di craniotomia, sclerosi ippocampale, atrofia celebrale, emangiomi, tumori di basso grado e malformazioni corticali (Shields et al, 2002). Tuttavia, non ci sono dati accurati riguardanti il rischio relativo o l'associazione di nessuna di queste specifiche lesioni patologiche alla SUDEP (Thom et al., 2018).

A livello microscopico Thom et al., hanno scoperto una perdita di neuroni, e gliosi del nucleo laterale dell'amigdala, la quale potrebbe essere associata ad una patologia comune negli studi post-mortem, ovvero la sclerosi ippocampale. In questi casi l'ippocampo appare di dimensioni ridotte. Non è possibile o necessario per un neuropatologo eseguire tutte le autopsie su pazienti con epilessia. Idealmente, un neuropatologo specialista dovrebbe essere coinvolto nell'interpretazione dei risultati istologici del cervello.

1.7.3 Esame tossicologico:

Gli accertamenti tossicologici consentono di stabilire, anche a distanza di tempo, l'utilizzo o l'abuso di sostanze stupefacenti, farmacologici e/o alcol. Gli

accertamenti si basano sulla ricerca di metaboliti delle suddette sostanze e/o sul dosaggio di marcatori correlati in urine, sangue e capelli. L'esame non è obbligatorio se c'è un lungo trattamento ospedaliero. Nello studio di Esen Melez del 2016 su 40 casi di SUDEP, 38 (95%) pazienti sono stati sottoposti ad analisi tossicologica e nessun agente antiepilettico è stato rilevato in 21 (55,3%) di questi. Negli altri 17 (42,5%) pazienti, è stato rilevato almeno un agente antiepilettico; un singolo agente era presente in 12 (40%) di questi pazienti e sono stati rilevati più antiepilettici in età rilevato negli altri 5 (12,5%) pazienti. Questi risultati indicano che anche se i pazienti erano epilettici, 21 (55,3%) non erano sottoposti ad AED al momento della morte. Ciò implica l'uso incoerente di medicinali antiepilettici è un fattore di rischio maggiore per SUDEP rispetto alla politerapia (combinazione di farmaci). Inoltre, nei casi in cui sono stati utilizzati medicinali antiepilettici, le terapie utilizzate devono essere valutate per la loro efficacia nella prevenzione degli attacchi tonico-clonici generalizzati e per il loro potenziale rischio.

1.7.4 Esame genetico

Spesso un'autopsia convenzionale (macroscopica e istologica) non è sufficiente a distinguere la SUDEP da altre cause di morte improvvisa. L'attribuzione dei casi SUDEP tramite autopsia molecolare, infatti, rimane un compito difficile

per i patologi forensi innanzitutto a causa della mancanza di dati circostanziali, di segni dovuti a convulsioni e segni spesso non specifici riguardanti esami tossicologici e istologici, perciò, la causa della morte potrebbe essere attribuita ad una patologia piuttosto che all'epilessia. (Barranco et al., 2020). Mentre un'indagine genetica, con le attuali tecniche di biologia molecolare, potrebbe essere estremamente utile nelle diagnosi post-mortem di casi di presunti decessi correlati all'epilessia e no, evidenziando delle alterazioni che potrebbero essere correlate a patologie ereditarie.

Il primo caso studio di autopsia molecolare, in caso di morte inaspettata di un paziente epilettico, è stato condotto da Johnson et al nel 2010 su un campione necroscopico archiviato in cui è stata scoperta una nuova, sporadica mutazione missenso nell'esone 104 del canale di rilascio del recettore/calcio della rianodina codificato con RYR2 (c. 14806G>A, p.Gly4936Arg). Questa mutazione era assente in > 600 alleli di riferimento inclusi entrambi i genitori.

Recenti studi hanno sottolineato l'importanza di includere i test genetici nelle indagini autoptiche poiché sono state identificate varianti patogene o possibilmente patogene, tra il 30 e il 50 % dei pazienti, tra la quali risaltano le mutazioni geniche dei canali ionici implicati anche nelle sindromi di aritmia cardiaca (Sahly et al., 2022).

1.8 Genetica Sudep

Recentemente sono emerse prove certe riguardanti la suscettibilità genetica alla Sudep, suggerendo un alto contributo poligenico (Leu et al., 2015). Diversi sono stati gli autori che hanno cercato, seppur invano, di identificare variazioni di geni che potessero condurre ad una diagnosi certa, non solo al fine di accertare una causa di morte ma soprattutto per cercare di prevenire la morte inaspettata. Numerosi geni neuro-cardiaci sono stati identificati come biomarcatori genomici di gravità ed esito della malattia, aiutando quantomeno a prevedere l'incidenza di SUDEP. Tuttavia, sempre nuove mutazioni vengono esaminate e va tenuto presente che alcune di queste hanno potuto concorrere alla malattia, ma non sono la sola causa discriminativa.

Nella *Tabella 3* sono riportati i geni associati a morte improvvisa e inaspettata nell'epilessia (Sudep) menzionati in letteratura.

Gene	Riferimento
SCN1A	Bagnall et al. 2017; Coll et al.2019
SCN2A	Bagnall et al. 2016
SCN5A	Aurelien et al. 2008
SCN8A	Johannesen et al.2018
KCNA1	Tu et al. 2011
KCNQ1	Bagnall et al. 2016
KCNH2	Tu et al. 2011
DEPDC5	Bagnall et al. 2016
HCN1-2-4	Tu et al. 2011
μ Oppioidi	Friedman 2018
PHOX2B	Bagnall et al.2014

Tab.3 Geni associati a Sudep con riferimenti bibliografici.

Tra i geni più discussi, SCN1A influenza i canali del sodio nel cuore e nel cervello portando a convulsioni e anomalie del ritmo cardiaco. Importante modulatore dei neuroni inibitori, nei quali una mutazione del gene indurrebbe perdita di funzione provocando uno stato ipereccitabile ed epilettrico (Sahly et al., 2022). Molte mutazioni dei canali del sodio e del potassio sono state associate ad un aumento del rischio di SUDEP, dal momento che secondo la letteratura sembrano essere riconducibili ad una compromissione della normale funzione biologica dei canali ionici (Canalopatie) (Wang et al., 2017). Tra questi ricordiamo una mutazione missenso R523C nell'esone 12 del gene SCN5A che codifica per il canale del sodio cardiaco, voltaggio dipendente, tipo V, subunità alfa, associata a sindrome del QT lungo e sindrome di Brugada (Aurelien et al., 2009); altre mutazioni nei geni LQTS: variante de novo SCN5A Ile397Val, varianti non senso Gly924Ala e Arg744* in KCNH2, e variante non senso Tyr662* in KCNQ1 (*Fig. 4*) associate ad un intervallo QT prolungato e di SCN5A Pro1090Leu riportato in un caso di LQTS e morte improvvisa cardiaca (Tu et al., 2011); una mutazione dei canali del sodio SCN8A, associata ad un alto tasso di mortalità precoce negli epilettici (Johannesen et al., 2018) e sembra essere correlata alla DEE ovvero encefalopatia evolutiva ed epilettrica caratterizzata da un gruppo di gravi epilessie, che porta non solo a convulsioni,

ma anche ad encefalopatia, ovvero un significativo ritardo dello sviluppo o addirittura la perdita delle capacità di sviluppo.

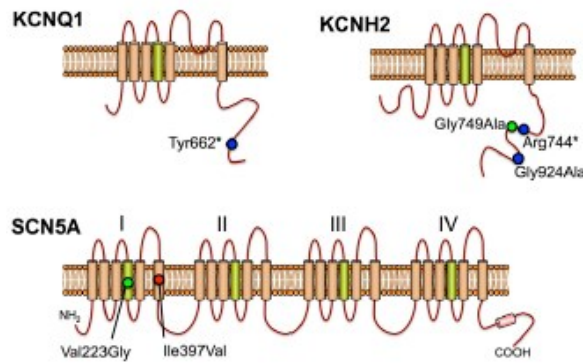


Fig.4 Rappresentazione delle varianti patologiche della sindrome del Q_t dei geni KCNQ1, KCNH2 e SCN5A nei casi Sudep: mutazioni patologiche (cerchi blu), mutazione de novo (cerchio rosso), e varianti patologiche candidate (cerchio verde). (Bagnall et al.,2017)

Ulteriori analisi genetiche hanno identificato nuove varianti non sinonime nei geni dei canali cationici nucleotidi-dipendenti attivati da iperpolarizzazione (HCN1-4) e sono portati di seguito: variante Phe738Cys in HCN1, Pro802Ser in HCN2 e Gly973Arg in HCN4, tutte localizzate nella regione citoplasmatica della coda delle proteine associate a sindromi di bradicardia familiare e sindromi epilettiche familiari (Tu et al., 2011). Altri autori hanno rilevato mutazioni nella via di segnalazione μ -oppioidi, nell'acido gammaaminobutirrico (GABA) e nei geni di segnalazione sinaptica glutammato-mediati (Friendam et al., 2018).

Inoltre, anche il coinvolgimento di varianti in PHOX2B sembra essere ipotesi interessante, in quanto l'espansione di una ripetizione di alanina in questo gene homeobox sembra essere correlata alla sindrome da ipoventilazione congenita, si può manifestare in età avanzata con ipoventilazione notturna ed epilessia coesistente. Tuttavia, necessita di ulteriori conferme (Bagnall et al., 2014).

Capitolo 2

INFORMAZIONE GENETICA

2. *Genetica Molecolare*

La genetica molecolare è un ramo della biologia che studia la struttura, la funzione e l'interazione dei geni al livello molecolare. Questa disciplina ha un grande impatto su diverse aree (come biomedicina e farmacologia) in quanto fornisce una comprensione profonda dei meccanismi alla base della vita, dall'evoluzione della specie alla comprensione delle malattie genetiche (wikipedia.it). Storicamente, la genetica che studia i geni come unità di trasmissione dei caratteri ereditari, è stata fondata da Gregor Mendel nel XIX secolo. Egli, incrociando piante di pisello che mostravano caratteri differenti, giunse a formulare le tre leggi considerate ancora oggi le basi della genetica.

Dall'analisi dei risultati formulò quattro ipotesi:

1. Ogni carattere è trasmesso da un «fattore ereditario» che è presente in due forme alternative. Oggi il fattore ereditario è chiamato gene e le due forme alternative alleli.
2. Per ogni caratteristica un organismo ha due alleli, uno ereditato da un genitore, uno dall'altro. La combinazione dei due alleli costituisce il genotipo dell'individuo per un dato carattere. I due alleli di ciascun gene

possono essere uguali – e in questo caso l'individuo è omozigote per quel carattere – oppure diversi – e quindi l'individuo è eterozigote.

3. Le coppie di alleli di ciascun gene si separano (segregano) al momento della formazione delle cellule riproduttive (i gameti) che pertanto possiedono un solo allele per ogni gene. La coppia di alleli si riforma con la fecondazione.
4. Quando un individuo è eterozigote per un certo carattere, uno dei due alleli viene espresso nel fenotipo mentre l'altro non ha effetti visibili. L'allele che controlla il fenotipo dell'eterozigote è chiamato allele dominante, mentre l'altro è detto allele recessivo.

Queste ipotesi confluiscono nella prima legge di Mendel o «*legge della dominanza dei caratteri*» e nella seconda «*legge della segregazione*»: le coppie di alleli di un gene si separano (segregano) durante la formazione dei gameti, nel processo di meiosi, portando alla manifestazione uno soltanto dei due alleli, quello considerato dominante.

La terza legge di Mendel prende in considerazione la trasmissione contemporanea di due caratteri differenti, denominata «*legge dell'assortimento indipendente*»: due caratteri vengono trasmessi in maniera indipendente. Il risultato è dato da tutte le possibili combinazioni di alleli di ciascuna coppia e

di conseguenza alla comparsa di individui con caratteri nuovi (Sadava et al.2020).

2.1 Struttura ed organizzazione del patrimonio genetico

Ciascun individuo possiede delle caratteristiche fisiche che permettono di riconoscerlo come appartenente a una certa specie e di distinguerlo rispetto ad altri esemplari della stessa specie. Queste caratteristiche sono trasmesse da una generazione all'altra (dai genitori ai figli): sono, cioè, caratteri ereditari (geni). L'insieme dei geni, o genoma, costituisce il patrimonio genetico che caratterizza ogni organismo vivente. Costituente fondamentale del genoma è il DNA (acido desossiribonucleico) la cui struttura è una doppia elica composta da due filamenti ognuno dei quali composti da zuccheri e fosfati, che fungono da supporto strutturale, e da basi azotate, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T), che formano coppie specifiche (A-T e C-G) e forniscono l'informazione genetica. Una singola base azotata legata ad uno zucchero e un gruppo fosfato viene definita nucleotide e una sequenza di nucleotidi forma un gene, che può essere di due tipi, codificante, che l'informazione in esso contenuta codifica per un determinato amminoacido, oppure non codificante, che nonostante non codifichino proteine o RNA funzionali, svolgono molte importanti funzioni nei processi cellulari ad esempio, possono controllare

l'espressione dei geni vicini, fornire informazioni sulle coordinate dei cromosomi durante la divisione cellulare (Russell et al., 2019).

Nell'uomo vi sono $3,3 \times 10^9$ bp con una lunghezza pari a più di due metri, il DNA viene avvolto attorno a proteine, dette istoni, e organizzato in cromosomi, che si presentano a coppie di omologhi e il cui numero varia a seconda della specie (*Fig. 5*). Il genoma umano è costituito da 46 cromosomi: 22 coppie di autosomi e due cromosomi sessuali, (X e Y) ed è presente in tutte le cellule dell'organismo. Queste, a loro volta, sono distinguibili in due gruppi o "linee": la linea somatica, comprendente la grandissima maggioranza delle cellule dei diversi tessuti, e la linea germinale, che comprende le cellule delle gonadi deputate specificamente alla riproduzione, e quindi alla trasmissione del patrimonio ereditario da una generazione a quella successiva (ovociti nella donna e spermatozoi nell'uomo, nonché le cellule meno specializzate da cui rispettivamente derivano). Durante la riproduzione, i cromosomi vengono trasmessi tramite le cellule germinali al nuovo individuo; i cromatidi che compongono ciascuna coppia derivano uno dall'individuo maschile e l'altro dall'individuo femminile (Russell et al., 2019).

Le cellule della linea somatica possiedono due copie identiche del genoma ($2n$), mentre quelle della linea germinale ne possiedono una sola copia (n).

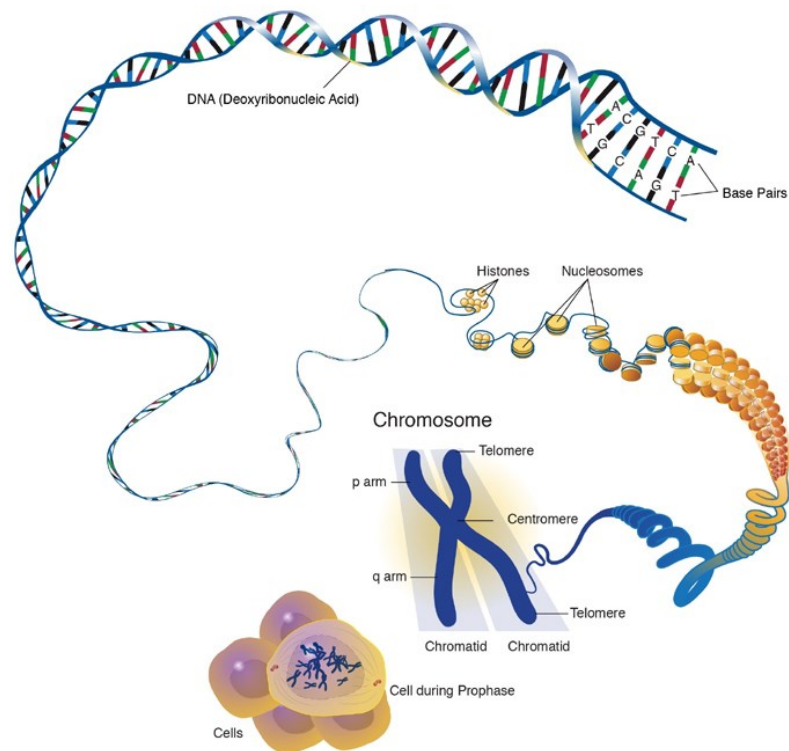


Fig.5 struttura e organizzazione del Dna nella cellula eucariote
 (https://www.instm.it/news/ricercatori_instm_realizzano_sistema_abiotico_per_rivelare_le_lisine_mono_metilate_de.aspx)

Oltre al DNA, all'interno della cellula, vi è anche un altro acido nucleico detto RNA che differisce dal DNA per la sua struttura. L'RNA è costituito da una singola elica di nucleotidi formati da gruppo fosfato, ribosio anziché a desossiribosio, e la base uracile sostituisce la timina presente nel DNA. All'interno della cellula ci sono tre tipi principali di RNA: mRNA (messaggero), tRNA (transfer) e rRNA (ribosomiale). L'mRNA viene sintetizzato, nella fase di trascrizione, dall'enzima RNA polimerasi, che legandosi ad un filamento di DNA “trascrive” l'informazione genetica

sintetizzando il filamento di mRNA. Il tRNA aiuta a tradurre l'informazione genetica in proteine e il rRNA è un componente fondamentale dei ribosomi, le strutture cellulari che sintetizzano le proteine. L'ultima fase della sintesi proteica, la traduzione, avviene nel reticolo endoplasmatico ruvido al livello dei ribosomi, i quali "traducono" i geni di mRNA in catene polipeptidiche (proteine). La sintesi della proteina termina mediante un codone di stop contenuto alla fine del mRNA. Durante la sintesi proteica sono possibili fenomeni di splicing, un processo di modifica dell'RNA messaggero (mRNA) che avviene dopo la trascrizione dell'informazione genetica dal DNA. Durante lo splicing, le sequenze di RNA non necessarie o dannose vengono rimosse dall'mRNA e le sequenze rimanenti sono ricollegate insieme in modo da formare una nuova molecola di mRNA modificata (wikipedia.it).

Va aggiunto che una piccola, ma non trascurabile, parte del patrimonio ereditario si trova fuori dal nucleo, in organelli cellulari denominati mitocondri, deputati alla produzione di energia. Il genoma mitocondriale è ereditato dalla madre ed è meno "stabile" rispetto al genoma cromosomico, cioè è molto più suscettibile all'insorgenza di mutazioni (Russell et al., 2019).

2.2 Variabilità genetica: Mutazioni e Polimorfismi

La variabilità genetica è dovuta a due eventi che si verificano nel processo di divisione delle cellule germinali (meiosi): l'assortimento indipendente dei cromosomi e il crossing-over. Questi eventi fanno sì che le cellule aploidi originatesi contengano un patrimonio genetico diverso tra loro.

Un'altra importante fonte di variabilità genetica è la mutazione, definita come un qualsiasi cambiamento nella sequenza del DNA, e che ricopre un ampio spettro di eventi con differenti incidenze e meccanismi molecolari. Si parla, infatti, di mutazione quando l'alterazione ereditabile può interessare sia la sequenza di basi del DNA (mutazioni geniche e puntiformi) sia intere porzioni cromosomiche (mutazioni cromosomiche) sia l'intero assetto cromosomico di una cellula (mutazioni genomiche) (microbiologia italia.it). Le mutazioni possono verificarsi a carico di qualsiasi cellula dell'organismo, se si verificano come eventi de novo nel corso della gametogenesi maschile o femminile, saranno presenti in tutte le cellule, germinali e somatiche, dei relativi figli (Russell et al., 2019).

2.2.1 Tipologie di mutazioni

Le mutazioni possono essere classificate in diversi modi. Primo tra quali in base all'ampiezza del difetto genico e della modalità d'insorgenza:

-*SNP*: Variazioni della sequenza del DNA che coinvolgono uno o pochi nucleotidi. Si distinguono in Transizioni, sostituzione di una pirimidina con una pirimidina (C>T) o di una purina con un'altra purina (A>G), e Trasversione, sostituzione di una purina con una pirimidina e viceversa (*Fig. 6*). In genere le transizioni sono più frequenti delle trasversioni (Amaldi et al., 2018).

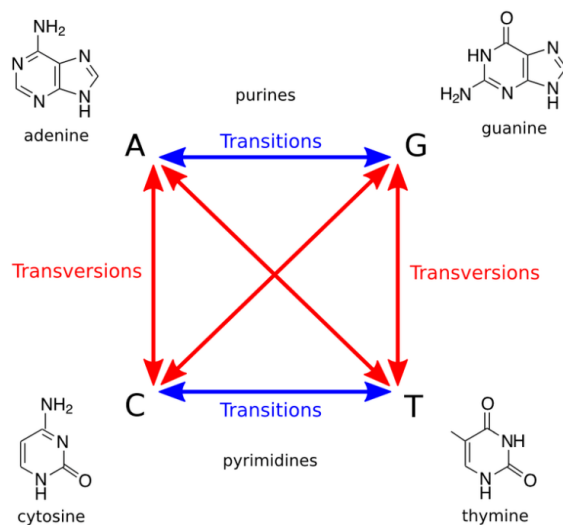


Fig.6 Schema delle mutazioni (transizioni e trasversioni)
(<https://it.wikipedia.org/wiki/Genotossicit%C3%A0>)

Inoltre, in base all'effetto sui prodotti genici possono essere suddivise in:

-*Mutazioni Silenti o sinonime*: quando si verificano modificano la tripletta codificante per un certo amminoacido ma, grazie alla degenerazione del codice genetico, il nuovo codone codificherà per lo stesso amminoacido. Di solito avvengono in terza posizione e sono in prevalenza neutre;

-*Mutazione Missenso*: portano alla formazione di un nuovo codone che codifica per un amminoacido diverso dall'originale. Di solito avvengono con una transizione di base in seconda posizione e possono causare un'alterazione delle proprietà e quindi un possibile cambiamento fenotipico.

-*Mutazioni Non Senso*: si verificano quando una mutazione ad un nucleotide di una tripletta determina la trasformazione di un codone codificante un amminoacido in un codone di stop portando al termine della traduzione e quindi alla generazione, spesso, di una proteina tronca.

-*Delezioni/inserzioni in frame*: dovute alla delezione o inserzione di un numero di nucleotidi divisibile per 3 nella regione codificante di un gene. Determinano la perdita o l'inserimento di amminoacidi nella catena polipeptidica. La cornice di lettura in questo caso rimane intatta, quindi la sequenza a monte e a valle rimane invariata.

-*Delezioni/inserzioni frameshit*: dovute alla delezione o inserzione di un numero di nucleotidi non divisibile per 3 porta a uno slittamento della cornice di lettura e alla formazione di proteine anomale

-*Mutazioni di splicing*: comprendono mutazioni a carico delle sequenze di regolazione dello splicing. Gli effetti di queste mutazioni possono essere di 4 tipi fondamentali: esclusione dell'esone dall'mRNA con formazione della

proteina priva degli aminoacidi codificati dall'esone escluso, ritenzione dell'introne: l'introne non viene eliminato nel corso dello splicing, inclusione di una parte dell'introne nel trascritto maturo, esclusione di una parte dell'esone nell'mRNA (Amaldi et al., 2018).

La prerogativa affinché si possa parlare di SNP e non di mutazione è la sua frequenza e stabilità genetica. Si può parlare di SNP soltanto quando l'allele più raro ha una frequenza maggiore o uguale all'1% nella popolazione (Brookes et al., 1999) (Fig.7).

La stabilità genetica è garantita dal fatto che si stima che gli SNPs compaiano con una frequenza di circa uno su 1.000 paia di basi (bp) in tutto il genoma e oltre tre milioni di SNP sono stati tracciati finora (Shastry et al., 2009). Inoltre, bisogna tener presente che ogni SNP ha due alleli ("polimorfismi biallelici"), i quali possono essere uguali tra di loro (omozigoti) o diversi (eterozigoti).

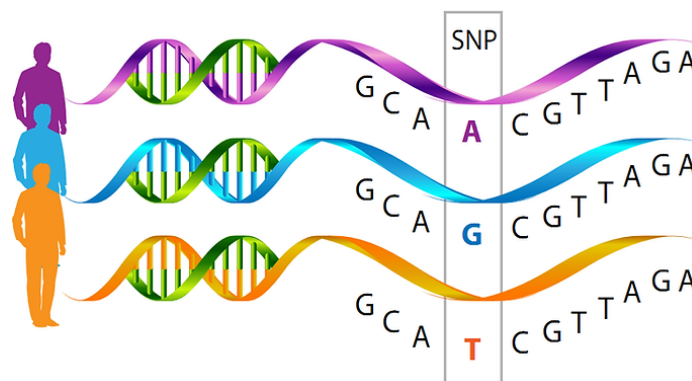


Fig.7 single nucleotide polymorphism (SNP) (<https://www.abanomed.it/nutrigenetica-e-nutrigenomica-cosa-sono-e-a-cosa-servono/>)

-Variant of Uncertain Significance: definite anche con l'acronimo VUS, sono varianti a significato sconosciuto che implicano un cambiamento della sequenza di cui non si conosce l'effetto, rilevate in modo frequente nei laboratori di genetica molecolare quando si effettuano indagini su campioni di pazienti possibilmente affetti da malattie genetiche (mutagens.it). L'interpretazione e la classificazione delle varianti sono notevolmente soggettive, poiché i laboratori hanno sviluppato i propri criteri di classificazione. Questa soggettività è ulteriormente problematica quando ci sono prove che il significato della variante cambia nel tempo. Nasce quindi la necessità di dover interpretare il ruolo di queste varianti. La classificazione delle varianti genetiche, basata sulle linee guida ACMG (American College of Medical Genetics), consiste in 5 grandi classi:

-Patogeno: questa categoria è per le varianti che sono ben documentate per causare malattie.

-Probabile patogeno : questa categoria è per le varianti in cui l'evidenza è convincente, ma non definitiva, di causare la malattia.

-Significato incerto (VUS): questa categoria è per le varianti in cui vi è un significato clinico sconosciuto o conflittuale. Sono necessarie ulteriori prove per determinare se la variante è causale o meno per una particolare malattia.

-Probabile benigno: questa categoria è per le varianti che non sono causali di una malattia.

-Benigno: questa categoria è per le varianti che non sono causali di una malattia. Le varianti benigne sono di solito osservate in precedenza in frequenze più elevate e l'analisi in silico prevede un effetto benigno sulla proteina codificata.

2.2.2 Interpretazione delle varianti di sequenza

Al fine di fornire una classificazione più dettagliata della variante in questione analizzata in un singolo gene, pool genico, esoma, genoma o trascrittoma, è importante considerare le differenze tra definire una variante come patogena (vale a dire causativa) per una malattia, e una variante che si può prevedere essere dannosa per la proteina, la quale non è necessariamente implicata in una malattia (Richards et al., 2015). Ogni classe di variante patogena o probabile patogena è suddivisa in molto forte (PVS1), forte (PS1-4), moderato (PM1-6) o di supporto (PP1-5) e ogni classe di variante benigna o probabile benigna è suddivisa in autonoma (BA1), forte (BS1-4) o di supporto (BP1-6). Di seguito quelli più significativi:

-Patogeno Molto forte

PVS1: variante nulla (nonsense, frameshift, siti di giunzione canonici ± 1 o 2, codone di inizio, delezione di singoli esoni o di molti esoni) in un gene in cui la perdita di funzione è un meccanismo noto di malattia

-Patogeno Forte

PS1: stesso cambiamento amminoacidico di una variante patogena precedentemente stabilita indipendentemente dal cambiamento nucleotidico

PS2: mutazione de novo (confermata sia la maternità che la paternità) in un paziente con la malattia e senza storia familiare

PS3: studi funzionali ben consolidati in vitro o in vivo a sostegno di un effetto dannoso sul gene o sul prodotto genico

PS4: la prevalenza della variante negli individui affetti è significativamente aumentata rispetto alla prevalenza nei controlli

-Patogeno Moderato

PM1: localizzato in un hot spot mutazionale e/o in un dominio funzionale critico e ben consolidato (ad esempio, sito attivo di un enzima) senza variazione benigna

PM2: assente dai controlli (o a frequenza estremamente bassa se recessiva) nel sequenziamento dell'esoma

Patogeno di supporto

PP1: cosegregazione con malattia in più membri della famiglia affetti in un gene definitivamente noto per causare la malattia

PP2: variante missenso in un gene che ha un basso tasso di variazione missenso benigna e in cui le varianti missenso sono un meccanismo comune di malattia

PP3: più linee di evidenza computazionale supportano un effetto deleterio sul gene o sul prodotto genico (conservazione, impatto evolutivo, splicing, ecc.)

Benigno Forte

BS1: la frequenza allelica è maggiore del previsto per il disturbo

BS2: osservata in un individuo adulto sano per un disturbo recessivo (omozigote), dominante (eterozigote) o legato all'X (emizigote), con penetranza completa attesa in tenera età

BS3: studi funzionali ben consolidati in vitro o in vivo non mostrano alcun effetto dannoso sulla funzione proteica o sullo splicing

BS4: mancanza di segregazione nei membri affetti di una famiglia

Benigno di supporto

BP1: variante missenso in un gene per il quale sono note principalmente varianti troncanti per causare malattie

BP2: osservata in trans con una variante patogena per un gene/disturbo dominante completamente penetrante o osservata in cis con una variante patogena in qualsiasi modello di ereditarietà

BP3: cancellazioni/inserimenti in-frame in una regione ripetitiva senza una funzione nota

BP4: più linee di evidenza computazionale non suggeriscono alcun impatto sul gene o sul prodotto genico (conservazione, evoluzione, impatto di giunzione, ecc.) (Richards et al., 2015)

2.2.2.1 Principali tools bioinformatici

Per l'interpretazione di una variante possono essere interrogati diversi tools computazionali, i quali grazie ad un elevato livello di sensibilità e specificità, permettono di predire il reale significato clinico di una mutazione in una buona percentuale di casi. Tuttavia, il risultato di un'analisi in silico va sempre considerato per quello che effettivamente è, ovvero, niente di più che una predizione. In definitiva, quindi, non ci si può basare esclusivamente sull'analisi in silico per dire se una mutazione sia patogena o meno. Invero, non sono rari

i casi in cui una mutazione predetta come variante benigna dai software risulta poi essere chiaramente patogena sulla base di studi familiari e/o funzionali.

Tra i diversi software ricordiamo:

-SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): il software è in grado di predire se una sostituzione di un amminoacido influisce sulla funzione della proteina e quindi se potrà alterare il fenotipo. Il software considera la posizione in cui si è verificato il cambiamento e il tipo di cambiamento amminoacidico. Viene quindi allineata la sequenza proteica con proteine correlate, inserite nel database. A questo punto, SIFT calcola la probabilità che il cambio di amminoacido non comporti variazioni sulla funzionalità della proteina sulla base dell'allineamento e indica un valore numerico. Se questo è inferiore al cut-off di 0,05, la sostituzione prevista sarà deleteria (Pauline et al., 2003);

-Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping 2): questo strumento riesce a predire l'impatto delle sostituzioni amminoacidiche sulla stabilità e sulla funzione delle proteine umane, facendo uso di considerazioni strutturali ed evolutive comparative. Le predizioni quindi si basano sulla sequenza proteica, su informazioni filogenetiche e strutturali. Il programma controlla l'insieme delle proteine omologhe per verificare se la stessa mutazione è stata osservata anche in altre proteine della stessa famiglia. Il punteggio di Polyphen-2 varia da 0,0 (benigno) a 1,0 (patogeno). I punteggi che vanno da 0,0 a 0,15 vanno

considerati come benigni, quelli da 0,15 a 0,85 come probabilmente patogeni e infine quelli da 0,85 a 1,0 come patogeni con più sicurezza (Bredagenetics.com).

-*VarSome*: è sia un potente strumento di annotazione e motore di ricerca per varianti genomiche umane, sia una piattaforma che consente la condivisione di conoscenze su varianti specifiche. Gli utenti possono cercare per nome del gene, simbolo della trascrizione, posizione genomica o ID variante. Il database di VarSome è costituito da oltre 33 miliardi di punti dati che descrivono oltre 500 milioni di varianti (Kopanov C et al., 2019)

Se la query è un gene o una trascrizione, i risultati mostreranno il nome ufficiale del gene, collegamenti a database esterni, una breve descrizione della funzione del prodotto genico, nonché eventuali condizioni mediche ad esso associate. Se la variante rientra in un gene, il browser visualizzerà la sua struttura esonica e regioni di interesse (come domini funzionali proteici, siti di legame, ecc.). (*Figura 8*).

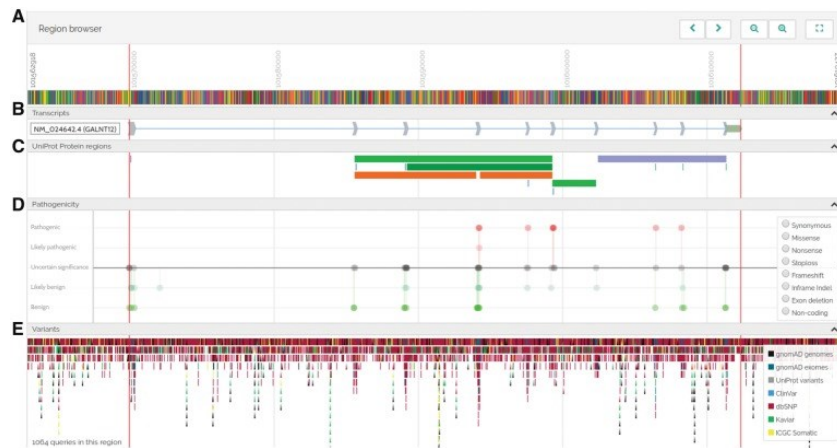


Fig.8 Esempio di visualizzazione Browser del genoma VarSome (Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019 Jun 1;35(11):1978-1980. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897. PMID: 30376034; PMCID: PMC6546127).

La patogenicità delle varianti viene segnalata utilizzando un classificatore di varianti automatico che valuta la variante presentata secondo le linee guida ACMG classificandola come "patogena", "probabilmente patogena", "probabilmente benigna", "benigna" o 'significato incerto'. Le informazioni clinicamente rilevanti (condizioni associate, modalità di ereditarietà, pubblicazioni, ecc.) sono recuperate dal CGD e le varianti sono anche collegate a qualsiasi fenotipo associato nell'ontologia del fenotipo umano.

- *InterVar*: è un software di bioinformatica per l'interpretazione clinica di varianti genetiche secondo le linee guida ACMG/AMP 2015, consentendo una più facile interpretazione del significato clinico delle varianti considerate (Li Q et al., 2017).

InterVar può prendere un file pre-annotato o un file VCF come input, e generare un'interpretazione automatizzata su 18 criteri (Figura 9).

L'output consiste nella classificazione delle varianti in 'Benigne', 'Probabilmente benigne', 'Significato incerto', 'Probabilmente patogeni' e 'Patogeni'.

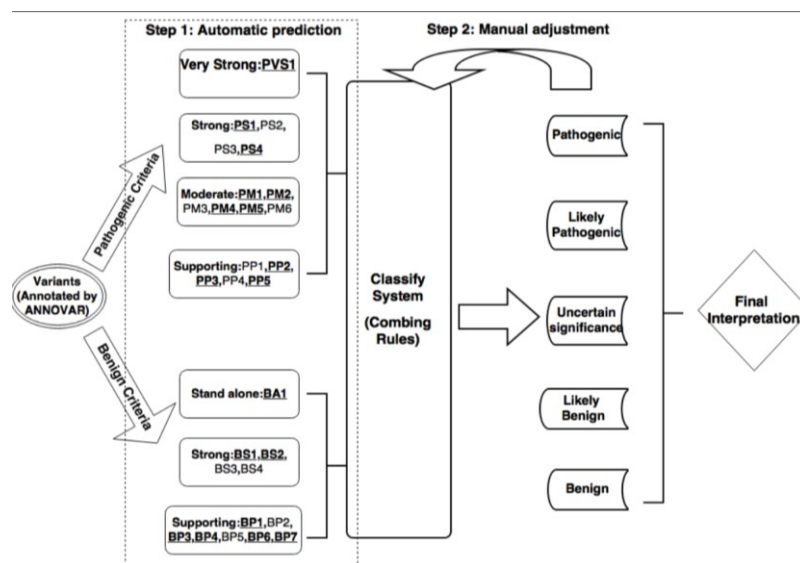


Fig. 9 Diagramma di flusso che rappresenta la procedura di InterVar (Li Q, Wang K. *InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. Am J Hum Genet. 2017 Feb 2;100(2):267-280. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.01.004. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28132688; PMCID: PMC5294755*)

Sulla base di questi tools, la conoscenza dei difetti genetici può essere la base per lo studio di possibili approcci terapeutici per difetti responsabili delle diverse condizioni.

Capitolo 3

SCOPO DELLA TESI

Per SUDEP si intende un “decesso improvviso ed inaspettato in soggetti con epilessia, non causato da cause accidentali o da stato di male, e con un esame autoptico e tossicologico che non ne spiegano la causa”.

Nelle morti dei soggetti affetti da epilessia, molto spesso giovani e con patologia non controllata dai farmaci, le indagini non permettono di identificare un danno anatomico e, di concerto, di spiegare la causa del decesso.

Nei casi di morti bianche, in soggetti affetti da epilessia, i fattori genetici di suscettibilità alla SUDEP restano in gran parte sconosciuti, anche se la biologia molecolare ha permesso di indagare difetti genetici a carico di canali ionici, che provocano alterazioni in grado di scatenare aritmie maligne. Dati sperimentali hanno segnalato presenza di mutazioni responsabili di una percentuale ancora non definita di decessi, legate a forme patologiche anche nei casi Sudep.

Lo scopo sarà appunto di identificare tramite tecniche di Next Generation Sequencing le mutazioni che possono rendere un individuo suscettibile alla sudep.

Per questo studio abbiamo deciso di analizzare, in campioni selezionati come Sudep, 6 geni noti in letteratura; qualora risultasse la presenza di una mutazione

genetica, si effettueranno analisi in silico per cercare di capire se la stessa possa essere annoverata tra quelle benigne o patogeniche.

Questo argomento è di estremo interesse, poiché oltre a meglio definire la causa del decesso, ha una valenza di prevenzione e di stratificazione di rischio per i familiari dei soggetti deceduti, nonché la messa in opera di valide terapie.

Capitolo 4

TECNICHE DI ANALISI

4. Sequenziamento del DNA

La determinazione della sequenza nucleotidica del DNA, o dell'intero genoma, consente di conoscere l'ordine esatto dei suoi costituenti, ovvero i nucleotidi (adenina, citosina, guanina e timina). Il gene è la sequenza dei nucleotidi ed è l'unità fondamentale dell'ereditarietà biologica, capace di replicarsi, mutare, trasferirsi da una generazione all'altra, esprimersi, adattarsi all'ambiente e partecipare al processo evolutivo. Il sequenziamento rappresenta un primo passo per comprendere la funzione di un gene e, in associazione con altre indagini di biologia molecolare, aiuta i ricercatori ad individuare mutazioni e a caratterizzarle (Russell et al., 2019).

Alla fine degli anni '70 la scoperta di metodi per la determinazione della sequenza di DNA ha rivoluzionato il campo della genetica molecolare e spianato la strada alle moderne biotecnologie con applicazioni che vanno dalle scienze forensi alla biologia evolutiva. In medicina, il sequenziamento è usato per identificare e diagnosticare malattie ereditarie e per sviluppare nuovi trattamenti. I primi metodi, ideati da Maxam-Gilbert e Sanger nel 1977, erano concettualmente simili, in quanto prevedevano di creare popolazioni di

frammenti nucleotidici di diversa lunghezza marcati radioattivamente, separati in base al peso tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide e la sequenza veniva poi visualizzata su lastra auto-radiografica. Dal punto di vista applicativo, risultavano differenti in quanto, il metodo Maxam-Gilbert funzionava tagliando il DNA di partenza in punti precisi e si basava su modificazioni chimiche del DNA. Quest'ultimo venne accantonato a causa della complessità della tecnica e dell'uso estensivo di sostanze tossiche (wikipedia.com).

4.1 Sequenziamento Sanger

Ideato da Frederick Sanger nel 1977, definito “metodo della terminazione della catena” o “metodo dei dideoossiribonucleotidi”, sfrutta la capacità di un enzima, la DNA Polimerasi, di copiare la sequenza e sintetizzare un filamento complementare. Il principio della tecnica si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati, i dideossinucleotidi (ddNTP) i quali, rispetto ai nucleotidi usati dalle cellule per la sintesi del DNA, sono privi del gruppo 3'-OH dello zucchero (Russel et al., 2019) (Fig.10).

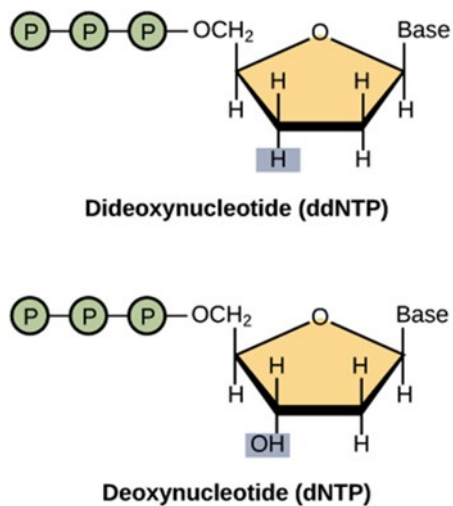


Fig. 10: Assenza del gruppo 3'OH nel ddNTP (Peter j. Russel. Genetica, un approccio molecolare. Pearson, quinta edizione, 2019).

Questa loro caratteristica impedisce l'allungamento della catena del DNA, poiché nel momento in cui il ddNTP viene aggiunto, non potrà avvenire la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. Quindi, una volta incorporati i ddNTP interrompono la sintesi del filamento da parte della DNA polimerasi. Il DNA, inizialmente, viene denaturato a singola elica con trattamento al calore e successivamente un primer (oligonucleotide a singolo filamento) si appaierà in orientamento 5'-3', assicurando che il DNA di nuova sintesi sia una copia complementare alla sequenza di DNA di interesse. Prima dell'avvento di sequenziatori automatici, il campione di DNA da sequenziare veniva suddiviso in quattro reazioni separate ognuna delle quali conteneva DNA Polimerasi, tutti e 4 dNTP precursori (d ATP, dCTP, dGTP, dTTP) e per ognuna di queste miscele veniva aggiunto un solo tipo ddNTP,

marcato (radioattivamente o per fluorescenza) in piccole quantità per permettere l'allungamento sufficiente della catena. L'incorporazione di un dideossinucleotide lungo il filamento di DNA in estensione, ne causava la terminazione prima del raggiungimento della fine della sequenza di DNA stampo. Questo darà origine ad una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa che venivano poi fatti correre su gel di poliacrilamide che permetteva la separazione con risoluzione di un nucleotide. Ognuna delle 4 reazioni correva su pozzetti vicini, dopodiché le bande sono visualizzate su lastra auto radiografica o sotto luce UV, e la sequenza viene letta direttamente sulla lastra o sul gel, a seconda del tipo di marcatura dei nucleotidi dideossi (wikipedia.com) (Fig 11).

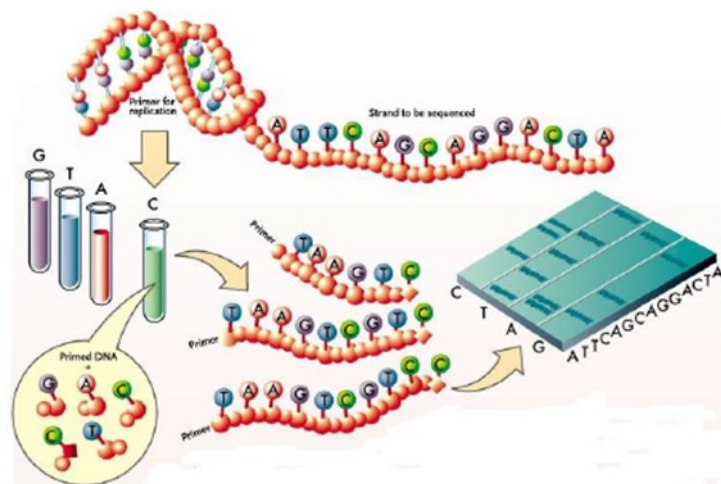
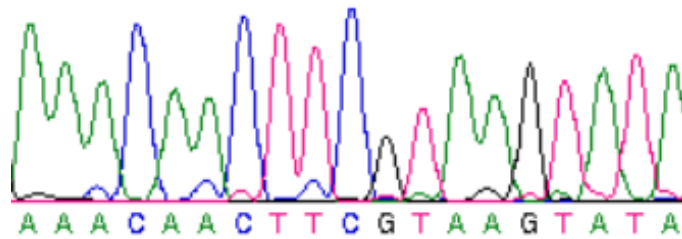


Fig.11 Incorporazione ddNTP in 4 reazioni separate mediante Sequenziamento Sanger (<https://microbenotes.com/dna-sequencing-maxam-gilbert-and-sanger-dideoxy-method/>)

Attualmente è possibile effettuare, anziché quattro reazioni distinte per ogni nucleotide modificato, una sola reazione utilizzando i 4 ddNTPs marcati fluorescentemente in modo diverso tra loro rendendo possibile, in base al colore, l'identificazione dell'ultimo nucleotide aggiunto a quel frammento. La metodica è stata affinata anche per facilitare la reazione utilizzando elettroforesi su gel di poliacrilamide posto all'interno di un capillare molto piccolo e un raggio laser identificherà i frammenti quando escono dal capillare. Un computer associato al laser è in grado di determinare l'intera sequenza, grazie alla lettura del primo frammento colorato che esce dal capillare fino all'ultimo (*Fig. 12*). Negli ultimi anni, con l'avvento di nuove tecnologie che hanno permesso di effettuare un elevato numero di sequenziamenti, in parallelo, abbattendo i tempi di analisi e costi, hanno segnato una svolta nella possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni. Queste prendono il nome di Next Generation Sequencing (NGS), anche nota come Massive Parallel Sequencing (MPS) (Russell et al., 2019).



*Fig.12 Elettroferogramma di un sequenziatore automatizzato che mostra parte di una sequenza di DNA: adenina (verde), timina (rosso), citosina (blu), guanina (nero).
(https://it.wikipedia.org/wiki/Sequenza_di_DNA)*

4.2 Next Generation Sequencing: NGS

Nei primi anni 2000, si ha lo sviluppo di molteplici tecnologie dotate di alta processività raggruppate sotto la denominazione di NGS. Le tecniche di seconda generazione, così chiamate perché sviluppate successivamente al Sanger, presentavano notevoli vantaggi, uno dei quali era la possibilità di effettuare un elevato numero di sequenziamenti contemporaneamente tramite l'utilizzo di polimerasi ad altissima efficienza, nonostante avesse come unico limite la lunghezza di frammenti (reads) prodotti, circa 200-400 pb rispetto ai 1000 del sequenziatore capillare (*Fig. 13*). Il principio comune delle tecniche NGS consiste nella preparazione di una libreria di DNA che solitamente si ottiene per frammentazione del DNA di interesse; ai frammenti così ottenuti vengono aggiunti degli “adaptors”, ovvero delle

sequenze specifiche di poche basi, necessarie ad ancorare e immobilizzare i frammenti sul supporto dove avverrà la successiva amplificazione e il sequenziamento. La fase successiva è l'amplificazione necessaria per aumentare il numero di copie di ogni singolo frammento di DNA (generazione di cluster), la PCR può avvenire o in emulsione o in soluzione; le copie clonali di ogni frammento prendono il nome di clusters. Terminata la fase di amplificazione, segue il sequenziamento vero e proprio e l'immagazzinamento e l'analisi dei dati (wikipedia.com).

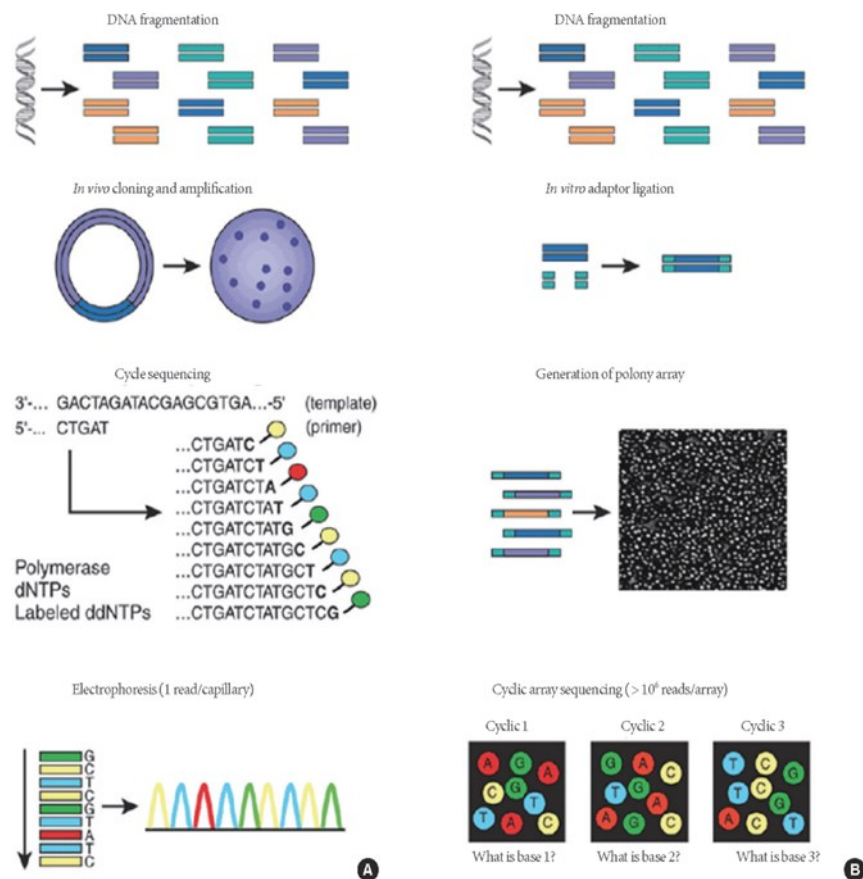


Fig.13 Schema del Sequenziamento Sanger (A) e Schema Next Generation Sequencing (<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/metagenomica-cose-e-campi-applicativi/>)

La differenza sta nei processi biochimici che vi sono alla base (454 Genome Sequencer FLX di Roche, Genome Analyzer di Illumina, Solid di ThermoFisher Scientific). In questo studio si è utilizzato l'Ion Torrent.

4.2.1 Tecnologia Ion Torrent- piattaforma Ion PGM™ System

La tecnologia Ion torrent utilizza i semiconduttori come metodo per il sequenziamento genomico. Il metodo si basa sulla rilevazione di ioni idrogeno che vengono rilasciati durante la sintesi del DNA. Le fasi del sequenziamento di questa piattaforma sono simili alle altre, la prima fase consiste nella preparazione della libreria di DNA con frammentazione del DNA e l'attacco di appositi adapter all'estremità 5', successivamente i frammenti vengono immobilizzati su microsfele (IonSphere™) e amplificati con PCR in emulsione. Dopo l'amplificazione le microsfele, sulle quali sono legati i frammenti di DNA, vengono depositate nei pozzetti dell'Ion Chip. La tecnologia del Ion Torrent impiega questo particolare tipo di chip che è composto da 3 strati, il primo strato è costituito da una serie di micropozzetti dove sono depositate le sfere contenenti i frammenti di DNA, un secondo strato costituito da semiconduttori che permettono la

trasmissione del segnale all'ultimo strato costituito da una piastra con diversi rilevatori di pH, uno per ogni micropozzetto.(Fig.14)

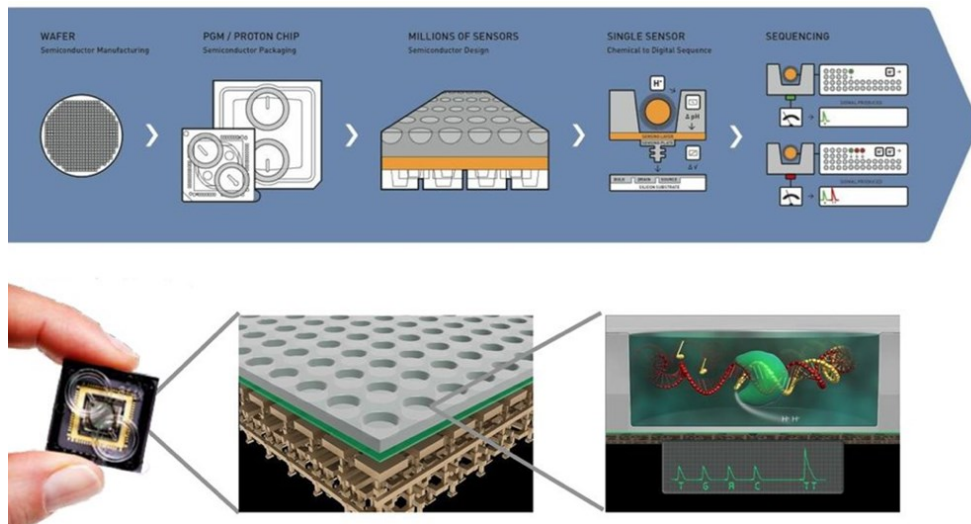


Fig.14 Composizione dello Ion Chip (<https://slideplayer.com/slide/15426569/>)

Il sequenziamento consiste nel trattare le sfere, contenute all'interno del pozzetto, con una soluzione contenente un singolo dNTP e la DNA Polimerasi. La reazione di legame, che avviene tra i frammenti e la soluzione di dNTP, comporta la liberazione di uno ione H^+ che porta ad un'alterazione del pH che viene registrata dal terzo strato dell'Ion Chip (Fig. 15).

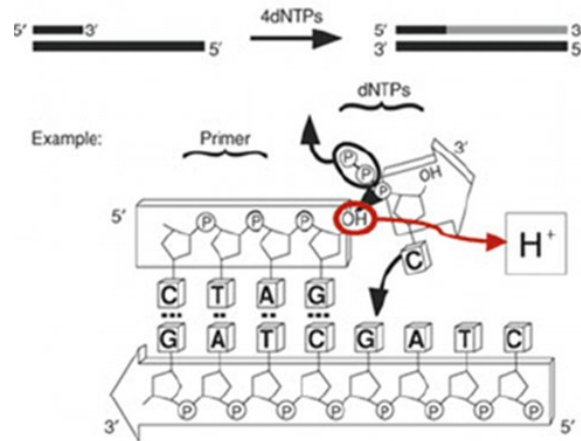


Fig. 15 Formazione legame fosfodiesterico tra dNTP e filamento del DNA (rilascio di protone). (<https://corefacilities.iss.it/dw/doku.php?id=aree:ngs:start>)

Mediante queste registrazioni viene elaborata la sequenza. È importante sottolineare che se vengono incorporati due nucleotidi, vi sarà una variazione di pH “doppia”. I vantaggi principali dell'Ion Torrent è innanzitutto l'assenza di sistemi di rilevazione basati su fluorescenza ciò permette di migliorare la precisione soprattutto quando vi sono basi ripetute. Inoltre, con la piattaforma Ion PGM si riesce a lavorare con una quantità di DNA di partenza irrisorie (circa 10ng), si riesce a sequenziare “reads” che vanno dai 35 ai 400bp, in circa 16 ore è possibile analizzare 8 campioni in parallelo, rendendo questo sistema estremamente idoneo per l'utilizzo anche in urgenza (ThermoFisher.com).

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

Grazie all'utilizzo delle tecnologie e degli approcci metodologici-concettuali tipici della biologia molecolare, contraddistinti da un insieme di test sviluppati ed eseguiti nel campo della medicina di laboratorio, siamo in grado di determinare DNA, RNA, proteine o metaboliti per rilevare genotipi, mutazioni o variazioni biochimiche che consentono di identificare specifici stati di salute o patologie. I test consentono di fare diagnosi, monitoraggio, ricerca e sostanzialmente seguono un iter specifico. (preso da intro alla biologia molecolare).

5. Campionamento

Per lo studio sono stati selezionati, nell'ambito dei casi di autopsie giudiziarie, 8 soggetti deceduti in seguito ad attacco epilettico o con una storia di epilessia. Dopo aver revisionato ogni caso, per verificare se rientravano nei criteri di Sudep definita (Definite SUDEP), come classificato da Coll et al. nel 2019, degli 8 soggetti presi in esame solo 3 soddisfano questo requisito. I dati di età, sesso e storia clinica dei soggetti sono riportati nella *Tab.4*.

<i>Campioni</i>	<i>Sesso</i>	<i>Età</i>	Storia clinica del paziente
Campione 1	F	40	Affetta da sindrome di DRAVET
Campione 2	M	17	Epilessia focale criptogenetica in terapia con levetiracetem, con persistenti crisi tonico-cloniche generalizzate ed episodi di iperpernea notturni
Campione 3	M	32	Affetto da epilessia, in trattamento con depamag (acido valproico). Negli ultimi anni aveva avuto episodi di crisi epilettiche notturne

Tab.4 Informazioni relative ai campioni in esame.

Gli estratti da sangue periferico, prelevati in seguito ad analisi autoptica, sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'estrazione. Le fasi di estrazione e quantizzazione del DNA sono comuni per tutti e tre i campioni, tuttavia, diversi sono stati gli approcci di sequenziamenti utilizzati per i tre campioni selezionati: per il campione 1 si è proceduto con il sequenziamento Sanger mentre i campioni 2 e 3 sono stati sequenziati tramite il sequenziamento in NGS (Next Generation Sequencing).

5.1 Estrazione del DNA con QIAamp® DNA Micro kit

L'estrazione del DNA genomico è il primo passo nelle applicazioni della biologia molecolare. Il QIAamp® DNA Micro kit della QIAGEN® (QIAamp® DNA Micro Handbook, Third Edition, December 2014, QIAGEN®) è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice per l'isolamento e la purificazione del DNA genomico da campioni biologici presenti in piccole quantità (*Fig. 16*). La procedura è progettata per garantire che non vi sia alcuna contaminazione incrociata da campione a campione e consente una manipolazione sicura. Prevede 4 fasi:

- Lisi cellulare, con la quale si ha il rilascio dell'acido nucleico, in condizioni denaturanti ad elevate temperature;
- Passaggio del lisato attraverso la colonnina e legame del DNA genomico alla membrana di QIAamp Mini Spin Column,
- Lavaggio della membrana
- Eluizione: il DNA viene eluito dalla membrana con l'utilizzo di un piccolo volume di buffer o acqua distillata

Il campione di DNA, così estratto, è immediatamente pronto per l'uso in reazioni di amplificazione o per la conservazione a -20°C. Il DNA purificato sarà privo di proteine, nucleasi e altre impurità.

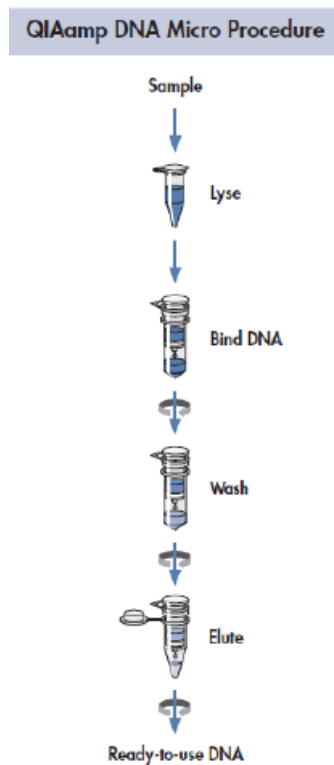


Fig. 16 Protocollo d'estrazione del DNA con QIAamp® DNA micro (QIAamp® DNA Micro Handbook, Third Edition, December 2014, QIAGEN®;)

La procedura prevede l'isolamento del DNA da 1-100 μL di sangue intero trattato con EDTA, citrato o anticoagulanti a base di eparina. Le fasi sono riportate qui di seguito:

- Pipettare 1-100 μL di sangue in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml;
- Aggiungere 100 μL di Buffer ATL;
- Aggiungere 10 μL di Proteinasi K;
- Aggiungere 100 μL di Buffer AL;

- Vortexare per 15 secondi;
- Incubazione a 56°C per 10 minuti in agitazione su Eppendorf Thermomixer;
- Breve centrifugazione;
- Aggiungere 50 µL di etanolo (96-100%);
- Vortexare per 15 secondi;
- Incubazione a temperatura ambiente per 3 minuti;
- Breve centrifugazione;
- Preparare una QIAamp MinElute coloumn per ogni campione (ogni colonnina è già dotata di una collection tube per la raccolta del liquido in eccesso);
- Trasferire l'intero lisato (dopo la breve centrifugazione) all'interno della colonnina, senza toccare la membrana della colonnina;
- Centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto;
- Trasferire la colonnina all'interno di una nuova collection tube e gettare quella che contiene il liquido di scarto.
- Aggiungere 500 µL di Buffer AW1, senza toccare la membrana della colonnina;
- Centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto;

- Trasferire la colonnina all'interno di una nuova collection tube e gettare quella che contiene il liquido di scarto.
- Aggiungere 500 μ L di Buffer AW2, senza toccare la membrana della colonnina;
- Centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto;
- Trasferire la colonnina all'interno di una nuova collection tube e gettare quella che contiene il liquido di scarto.
- Centrifugazione a 14000 rpm per 3 minuti, per asciugare la membrana;
- Trasferire la colonnina in una provetta da 1,5 mL (in cui viene eluito il DNA);
- Aggiungere 50 μ L di Buffer AE, al centro della membrana della colonnina;
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto;
- Centrifugare a 14000 rpm per 1 min;
- Gettare la colonnina, il DNA eluito si trova nella provetta da 1,5 mL.

5.2 Quantificazione con Qubit™

Successivamente i 3 campioni sono stati quantizzati mediante l'utilizzo del fluorimetro Qubit ® (ThermoFisher Scientific), che utilizza coloranti

fluorescenti per determinare la concentrazione di acidi nucleici o proteine in un campione. D'altra parte, il sistema Qubit viene fornito con coloranti fluorescenti che si legano specificamente agli analiti di interesse come DNA a doppio filamento (dsDNA). Nello studio è stato utilizzato il dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™) sviluppato e distribuito da Thermo Fisher Scientific. Questo kit è specifico e selettivo per DNA a doppia elica ed è indicato per campioni concentrati tra 10 pg/μl e 100 ng/μl. Il protocollo di "Qubit dsDNA HS Assay Kits" presuppone di predisporre degli standards per la calibrazione del Fluorimetro Qubit™ (*Figura 17*), ma nel laboratorio genetico di Ancona lo strumento ha già gli standard salvati e memorizzati per la calibrazione. Ad una concentrazione specifica di colorante, l'intensità del segnale di fluorescenza della miscela, campione di DNA e il reagente del kit, è direttamente proporzionale alla concentrazione di DNA nella soluzione. Il fluorimetro Qubit raccoglie questo segnale di fluorescenza e lo converte in una misurazione della concentrazione di DNA facendo riferimento alla curva di calibrazione in memoria.

Il protocollo di "Qubit dsDNA HS Assay Kits" (come da manuale fornito da Thermo Fisher Scientific), escludendo la creazione della curva di calibrazione, prevede l'analisi del campione come segue:

- Aggiungere 198 μL di working solution Qubit™ dsDNA a ciascuna provetta
- Aggiungere 2 μL di ciascun campione da analizzare all'interno di una provetta
- Mescolare vigorosamente ogni campione vortexando per 3-5 secondi.
- Lasciare incubare tutte le provette a temperatura ambiente per 2 minuti
- Inserire la provetta all'interno del Qubit™, chiedere il coperchio e procedere con la lettura dei campioni



Fig. 17: Fluorimetro Thermo Fisher Qubit™ 2.0 (www.krisp.org.za)

5.3 Sequenziamento Sanger

Esclusivamente per il campione 1, dopo le procedure di estrazione del DNA da campioni di sangue e quantizzazione descritte in precedenza, è stato eseguito il Sequenziamento Sanger. Per questo campione è stata ricercata la mutazione *NM_001165963.4(SCN1A):c.2956C>T (p.Leu986Phe)*, come conferma di una mutazione precedentemente riscontrata nei parenti della deceduta a seguito di analisi NGS condotte in un altro laboratorio di genetica.

Questo tipo di sequenziamento è volto alla conferma della presenza di una mutazione già nota e identificata, in precedenza, in soggetti appartenenti all'interno dello stesso nucleo familiare. In linea generale, a differenza delle tecniche di nuova generazione, prevede:

1. Preparazione del campione: il DNA viene amplificato utilizzando la PCR e purificato per rimuovere i prodotti non desiderati;
2. Reazione di terminazione: il DNA amplificato viene denaturato e poi legato a quattro diverse sonde fluorescenti, ognuna delle quali si lega ad una sola base specifica. Si incuba il campione per la reazione di terminazione;
3. Lettura del segnale: il Dna prodotto viene caricato su matrice di gel di silice e si fa passare un laser che genera segnale fluorescente

4. Analisi dei dati: i dati ottenuti vengono elaborati utilizzando software apposito che genera la sequenza.

Per la reazione di amplificazione è necessario l'uso di una coppia di primer. Essendo una variante già nota in letteratura, la coppia dei primer utilizzati per il sequenziamento Sanger è stata tratta da Claes et al. 2001 (*Tab. 5*)

Exon	5' Primer (Forward)	3' Primer (Reverse)
16	TGCTGTGGTGTTCCTTCTC	TGTATTCATACCTCCCACACC

Tab.5 Coppia di primer

Reazione di amplificazione

È stata allestita una reaction mix (*Tab.6*) che contiene tutti i componenti richiesti per la reazione di amplificazione (PCR) utilizzando il kit QIAGEN® Multiplex PCR kit. Dal momento che le amplificazioni dei frammenti singoli servivano a verificare la lunghezza degli ampliconi, sono stati utilizzati 3 µl di DNA.

Reaction mix	Volume
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5ul
Primer forward (0,2uM)	1 ul
Primer reverse (0,2uM)	1 ul
DNA	3ul

Volume totale	10ul
---------------	------

Tab.6 Volumi e reagenti utilizzati per la PCR

Le condizioni di amplificazione non sono state modificate dal protocollo standard (*Tabella.7*).

PCR				
95°C per 15 min (attivazione HotStart TAq DNA Polymerase)	30 Cicli			60°C per 30 min
	Denaturazione	Annealing	Allungamento	
	94°C per 30 sec	60°C per 90 sec	72°C per 1 min	

Tab.7 Condizioni per il processo di amplificazione.

Quantificazione dei prodotti di amplificazione

Tutti gli amplificati sono sottoposti ad un quality check per verificare che le sequenze target siano state realmente amplificate, che la loro lunghezza sia riferibile a quella attesa e che la reazione di PCR sia avvenuta correttamente.

Per questa verifica è stata utilizzata la Agilent 2200 TapeStation System (©Agilent Technologies) (Agilent 2200 TapeStation System, User Manual,

Agilent Technologies, Rev. C), piattaforma automatizzata, che prevede una elettroforesi su gel d'agarosio. Il gel è contenuto in piccoli capillari all'interno di un High Sensitivity D1000 ScreenTape.

La procedura standard prevede di:

1. Lasciare equilibrare i reagenti a temperatura ambiente per 30 min;
2. Agitare su vortex prima dell'uso
3. allestire una provetta da 0,2 ml per ogni campione e una per il ladder. Il ladder è una miscela di DNA con peso molecolare noto, che viene inserito nelle corse elettroforetiche per permettere all'operatore di determinare le dimensioni dei frammenti processati.
4. In ogni provetta vengono aggiunti 4 μ l di D1000 HS Buffer e 2 μ l di campione, o di ladder.
5. Dopo aver caricato la ScreenTape ed i campioni nello strumento, si avvia la corsa (*Fig.18*).

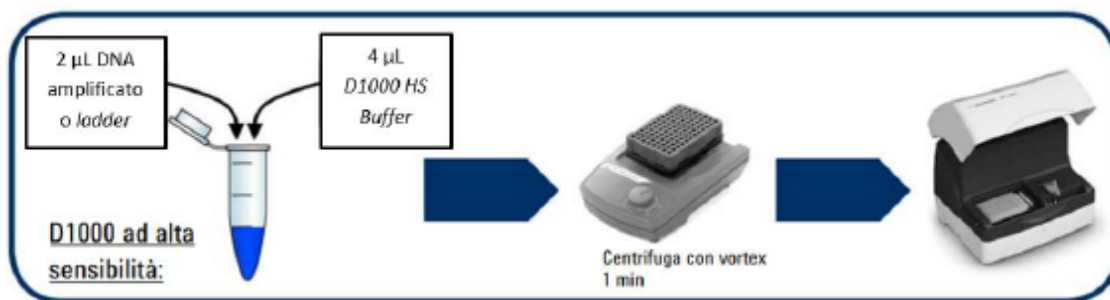


Fig. 18 Allestimento elettroforesi capillare con Agilent 2200 TapeStation. (Agilent 2200 TapeStation System, User Manual, Agilent Technologies, Rev. C, immagine modificata)

Purificazione dei prodotti di amplificazione

I frammenti amplificati vengono purificati mediante EXO-CIP PCR cleanup (Applied Biosystem), per rimuovere i primers e dNTPs residui. Il kit sfrutta l'azione di due enzimi idrolitici: l'Exonuclease 1 (enzima Exo) che degrada il DNA a singolo filamento come i prodotti di DNA aspecifici e i primer in eccesso. CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) è un enzima che defosforila i dNTPs residui non incorporati nella reazione di amplificazione. Il protocollo di purificazione è il seguente (Tab. 8):

Exo mix		CIP mix	
Buffer EXO	1,2 ul	Buffer CIP	1,25 ul
Exo I	0,3 ul	CIP	1,25ul
H2O	11 ul	H2O	10 ul

Volume totale	12,5 ul	Volume totale	12,5 ul
---------------	---------	---------------	---------

Tab. 8 Reazione di purificazione mediante i due enzimi Exo e CIP.

La purificazione è ottenuta incubando a 37°C x 1h il prodotto di amplificazione con 4ul di EXO-CIP, una mix contenente gli enzimi descritti nella *tabella* precedente. Successivamente le provette sono state incubate a 80°C per 20 minuti per procedere all'inattivazione degli enzimi prima di procedere al sequenziamento.

Reazione di sequenza

Le reazioni di sequenza sono state condotte sia in direzione 5'-3', sia nella direzione opposta, utilizzando il primer forward e il reverse, gli stessi impiegati anche per le reazioni di PCR, con una concentrazione di 0,2 µM. Il sequenziamento è stato eseguito con il BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Buffer kit (ThermoFisher), un kit di sequenziamento progettato per applicazioni che richiedono un'individuazione ottimale delle basi adiacenti al primer. Utilizza una tecnologia di terminazione di sequenza in cui i frammenti di DNA vengono terminati con basi specifiche, che vengono quindi sequenziate utilizzando una tecnologia di amplificazione.

In un volume finale di 10 μ l, 1 μ l di DNA amplificato è stato aggiunto a 2 μ l di BigDye® Sequencing Buffer, 1 μ l di 5x BigDye® Terminator Sequencing Buffer e 1 μ l del primer Forward o Reverse. La soluzione è stata portata al volume finale di 10 μ l con l'aggiunta di 5 μ l di acqua deionizzata (*Tabella 9*).

Reaction mx	Volume
BigDye Sequencing buffer	2 ul
5x BuigDYe terminator sequencing buffer	1ul
Priemr forward o reverse	1ul
DNA	1ul
H20	5 ul
Volume finale	10 ul

Tab. 9 Componenti aggiunte.

Sono stati effettuati 25 cicli di denaturazione a 96°C per 1 minuto e 96°C per 10 secondi, Annealing a 50°C per 5 secondi ed Estensione a 60°C per 4 minuti (*Tabella 10*).

25 cicli			
Denaturazione		Annealing	Estensione
96°C per 1 min	96°C per 10 sec	50°C per 5 sec	60°C per 4 min

Tab. 10 Condizioni di amplificazione per la reazione di sequenza.

Rimozione dei ddNTPS non incorporati

Prima di sottoporre i prodotti del sequenziamento ad elettroforesi capillare, si è proceduto alla purificazione in piastra, rimuovendo i ddNTPs non incorporati. Per questo scopo è stata utilizzato il BigDye® XTerminator Purification Kit che prevede la preparazione di una premix di 55 µl per ogni campione composta da SAM Solution e XTerminator Solution (*Tabella 11*).

Componenti premix	Volume
Sam solution	45 ul
Xterminator	10 ul
Volume finale	55 ul

Tab.11 BigDye®XTerminator Purification Kit

Il kit di purificazione BigDye® XTerminator™ sequestra le impurità della reazione di sequenziamento, inclusi ioni salini, terminatori colorati e ddNTP non incorporati, facendoli precipitare sul fondo della provetta, lasciando in soluzione il DNA amplificato e purificato (*Fig. 19*). Questo processo avviene grazie al vortex di 30 minuti e alla successiva centrifugazione per 2 minuti a 3500 rpm.

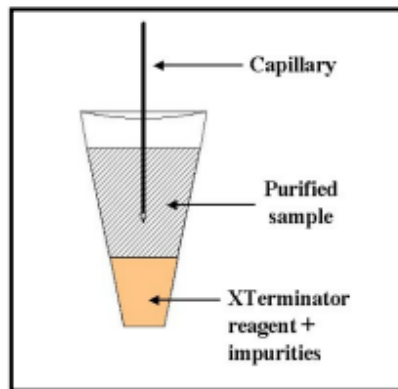


Fig. 19 Aggiunta diretta di BigDye® XT terminator al campione purificato.
(<https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-dna-sequencing/sanger-sequencing-reaction-purification.html>)

Elettroforesi capillare

L'elettroforesi capillare è stata necessaria per visualizzare i prodotti del sequenziamento di Sanger. In questo caso, i campioni contenenti i prodotti di sequenziamento purificati sono caricati su piastra e successivamente sullo strumento Applied Biosystem ® 3130 Genetic Analyzer con i seguenti parametri (<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4477796.pdf>):

- Numero di capillari:4
- Polimero: POP4
- Tempo di iniezione: 1,5
- Voltaggio di iniezione: 2,0 Kv
- Voltaggio di corsa: 15,0 Kv

- Temperatura di corsa: 60°C
- Tempo di corsa: 1000 secondi
- Analysis method: BDX_BDT11_v.1.1

Analisi delle sequenze

L'analisi delle corse elettroforetiche è stata effettuata tramite il software SeqScape® 3 (Applied Biosystems®). Il software permette di confrontare le sequenze consenso con una o più sequenze di riferimento, identificando eventuali differenze.

Dopo aver aggiunto una sequenza di riferimento, SeqScape® 3 software esegue diverse tipologie di analisi:

- identificazione varianti nucleotidiche, SNP. Il software identifica le posizioni che differiscono dalla sequenza di riferimento e classifica tali varianti come note o sconosciute;
- analisi mutazioni e identificazioni degli eterozigoti;
- identificazione di alleli che corrispondono maggiormente alla sequenza consenso.

5.4 Next Generation Sequencing

5.4.1 Preparazione delle librerie con kit Ion AMpliseq™2.0

Come mostrato in Fig.20 la preparazione di una libreria Next Generation Sequencing consiste in 4 fasi principali: amplificazione delle regioni target di interesse, per lo studio che si sta conducendo, ligazione dei barcode, purificazione e quantizzazione delle librerie ottenute.

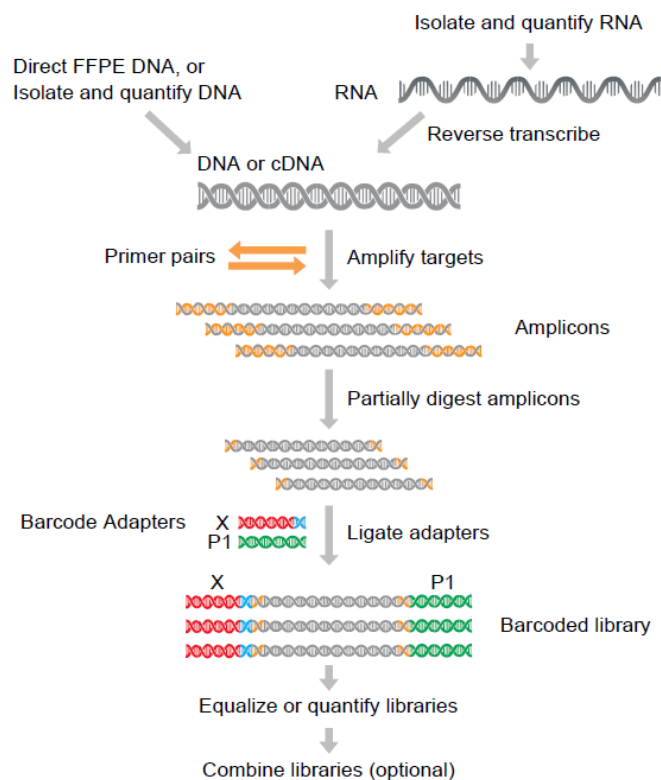


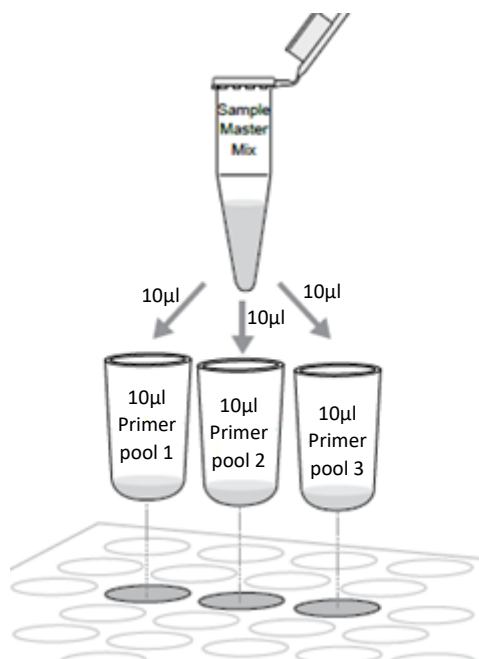
Fig.20 Flusso di lavoro Ion Ampliseq da DNA genomico o RNA (thermofisher.com)

Amplificazione della regione target

L'amplificazione del DNA nei campioni 2 e 3 è stata eseguita utilizzando il kit Ion Ampliseq™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific) unitamente al pannello Ion Ampliseq™ Inheretid Disease Panel (ThermoFisher Scientific). Questo pannello impiega oltre 10'000 coppie di primers suddivisi in 3 tube di primer pool per amplificare gli esoni di 325 geni. Questi geni sono associati ad oltre 700 malattie ereditarie secondo il database NCBI ClinVar.

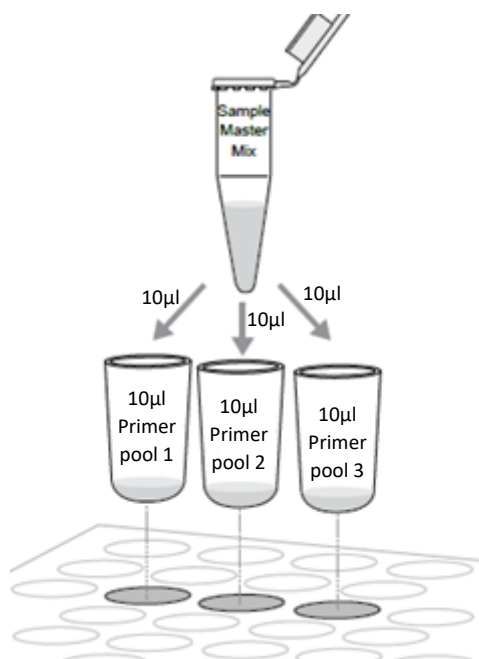
La strategia di preparazione delle librerie Next Generation Sequencing è consistita nel procedere all'allestimento di tre amplificazioni separate per ogni singolo campione, essendo un pannello di 3 pool di primers; tuttavia, a differenza di quanto indicato nel manuale si è ritenuto più opportuno portare avanti separatamente i tre campioni e riunirli solo al termine della preparazione della libreria al fine di massimizzare la resa di quest'ultime.

Ogni reazione di amplificazione prevedeva una concentrazione di DNA pari a 15ng/μL ed un volume finale di 20 μL, facendo attenzione a tenere in ghiaccio 5X Ion Ampliseq™ Hifi Mix. I reagenti e i volumi utilizzati, per singolo pool e campione, sono riportati nella *Tabelle 12 e 13* seguenti:



CAMPIONE 2	VOLUME
5X Ion AMpliSeq™Hifi mix	4 µL
Primer pool (1 o 2 o 3)	10 µL
Nuclease-free water	5 µL
DNA	1 µL
VOLUME FINALE	20 µL

Tab.12 Mix di PCR per l'amplificazione della regione target relativa al Campione 2.



CAMPIONE 3	VOLUME
5X Ion AMpliSeq™Hifi mix	4 µL
Primer pool (1 o 2 o 3)	10 µL
Nuclease-free water	3 µL
DNA	3 µL
VOLUME FINALE	20 µL

Tab. 13 Mix di PCR per l'amplificazione della regione target relativa al Campione 3.

Si procede all'amplificazione dei target seguendo le condizioni riportate in *Tab.14* e impostate su termociclatore *Veriti™96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem™)*:

Fasi	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione enzima	99°C	2 minuti	
Denaturazione	99°C	15 secondi	Per 13 cicli
Appaiamento ed estensione	60°C	16 minuti	
	10°C	∞	

Tab. 14 Condizioni di amplificazione.

Gli ampliconi possono essere conservati a 10°C overnight nel termociclatore, oppure, per tempi più lunghi, si possono conservare a -20°C.

Digestione parziale degli ampliconi

A questo punto si procede con una parziale digestione degli ampliconi aggiungendo 2 µL di FuPa Reagent direttamente nelle provette che contengono gli amplificati. Si procede poi a vortex e centrifuga e inserendo le provette sul termociclatore *Veriti™96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem™)* con le seguenti condizioni (*Tab.15*):

Temperatura	Tempo
50°C	20 minuti
55°C	20 minuti
60°C	20 minuti
10°C	Max 1h

Tab.15 condizioni di reazione di digestione

Ligazione dei barcode

Uno dei principali vantaggi del sequenziamento Massive Parallel Sequencing consiste nel poter sottoporre ad analisi più campioni simultaneamente, per fare questo è necessario legare ad ogni campione un barcode specifico. I barcode, prima dell'utilizzo devono essere sottoposti ad una diluizione mediante la preparazione di una mix di *Ion P1 adapter* e *Barcode X Ion Xpress™* come mostrato in *Tab.16*

Componente	Quantità
Ion P1 Adapter	1 µL
Ion Xpress™ barcode X	1 µL
Nuclease-free water	2 µL

TOTALE	4 μ L
--------	-----------

Tab.16 Diluizione dei barcode. La X rappresenta il codice del barcode scelto.

I barcode, così diluiti, possono essere stoccati a -20°C fino a 10 giorni.

Però, per questi campioni nello specifico non è stato necessario diluire i barcode poiché sono state condotte due diverse corse NGS, ognuna delle quali conteneva un singolo campione. Di conseguenza, è stata preparata la reazione di ligazione sostituendo al barcode il reagente Ion AmpliSeq™Adapters. In questo passaggio è necessario tenere la DNA ligasi in una porta provette ghiacciato. La preparazione della reazione di ligazione avviene come in *Tab.17*, facendo attenzione a seguire l'ordine dei reagenti.

Componente	Quantità
Switch solution	4 μ L
Ion AmpliSeq™Adapters	2 μ L
DNA ligase	2 μ L
TOTALE	~30 μ L

Tab.17 Mix di PCR per la ligazione dei barcode

Il caricamento delle provette su Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem™) segue le seguenti condizioni (Tab.18).

Temperatura	Tempo
22 °C	30 minuti
68°C	5 minuti
72°C	5 minuti
10°C	Max 24h

Tab.18 Condizioni della reazione di ligazione.

Purificazione delle librerie

Successivamente si procede alla purificazione delle librerie utilizzando l'Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Beckman Coulter™), per permettere l'eliminazione di tutte le componenti in eccesso usate nei passaggi precedenti.

Gli steps da seguire sono i seguenti:

1. Aggiungere 45 µl di Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Beckman Coulter™) per ciascuna libreria precedentemente trasferita in provette da 1,5 mL e pipettare su e giù 5 volte per mescolare accuratamente la sospensione di resina con gli ampliconi;
2. Incubare la miscela per 5 minuti a temperatura ambiente;
Intanto preparare etanolo al 70% per i lavaggi successivi con: 230 µL di etanolo e 100 µL di acqua nucleasi-free per ogni campione.

3. posizionare le provette contenenti campione e resina su rack magnetico (magnete DynaMAG™-96 Side) e incubare a temperatura ambiente per 2 minuti (o finché la soluzione non risulta limpida);
4. Rimuovere il surnatante evitando di toccare il pellet costituito dalla resina e dagli ampliconi ad essa legati;
5. Aggiungere 150 µL di etanolo al 70% appena preparato, poi ruotare le provette su rack magnetico (controllando che il precipitato migri correttamente) e rimuovere il surnatante, evitando di toccare il pellet;
6. Ripetere il passaggio 5 (aggiunta di etanolo, ruotare le provette su rack e rimuovere il surnatante, evitando di toccare il pellet);
7. Fare una centrifuga veloce, facendo attenzione a posizionare il pellet sulla parte esterna del rotore della centrifuga;
8. Riposizionare le provette sul rack magnetico;
9. Eliminare l'etanolo in eccesso che si è depositato sul fondo della provetta
10. Lasciare asciugare la resina, con il tappo della provetta aperto, incubando a temperatura ambiente per 2 minuti (o finché l'etanolo non è completamente evaporato);

Da notare che, le librerie Ion AmpliSeq™, preparate con il kit Ion AmpliSeq™ 2.0 kit, devono essere riamplicate al fine di ottenere un prodotto sufficiente per il successivo templating. Quindi il passaggio seguente sarà di amplificare la libreria utilizzando i reagenti Platinum™ PCR Super Mix HiFi e Library Amplification Primer Mix e successivamente purificare il prodotto ottenuto.

Amplificazione aggiuntiva delle librerie con Platinum™

1. Aggiungere 50 µL di *Platinum™ PCR SuperMix HiFi* e 2 µL di *Library Amplification Primer Mix*
2. Vortexare e centrifugare brevemente;
3. Incubare le provette a temperatura ambiente per 5 minuti;
4. Riposizionare le provette per almeno 2 minuti sul rack magnetico, poi trasferire con attenzione ~ 50 µL di surnatante da ciascun pozzetto a un nuovo pozzetto o provetta nuova, già codificata con il nome del campione, senza disturbare il pellet.
5. Fare vortex e centrifuga delle provette e poi caricare su *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* con le seguenti condizioni (*Tab.19*)

Stage	Temperatura	Tempo
	98°C	2 minuti
5 cicli	98°C	15 secondi
	64°C	1 minuto
	10°C	

Tab.19 condizioni della reazione di amplificazione. Al termine i campion possono essere conservati a -20°C.

Purificazione delle librerie riamplicate con Platinum™

A questo punto si procede con un doppio step di purificazione con la resina *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Backman Coulter™)*:

1. Il primo step prevede un rapporto biglie/volume di campione di 0,5X: così, il DNA ad alto peso molecolare rimane adeso alla resina, mentre gli ampliconi e i primer rimangono nel surnatante che viene recuperato;
2. Il secondo step prevede un rapporto biglie/ volume del campione originale di 1,2 X: Gli ampliconi sono legati alla resina e i primer rimangono in soluzione. Recuperare il pellet con le biglie ed eluire gli ampliconi dalle biglie.

Primo step di purificazione:

1. Centrifugare brevemente le provette per recuperare tutto il contenuto;
2. trasferire il campione costituito da circa ~50 μ L in una provetta da 1,5 mL e aggiungere 25 μ L di *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent*, pipettare su e giù 5 volte per mescolare accuratamente la sospensione di resina con gli ampliconi;
3. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
4. Trasferire le provette su rack magnetico (DYnaMag™-96 Side Magnet(Invitrogen™));
5. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti, finchè la soluzione non diventi limpida;
6. Trasferire il surnatante in un'altra provetta da 1,5 mL; il surnatante contiene gli ampliconi desiderati.

Secondo step di purificazione:

1. Aggiungere 60 μ L di *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* (1,2 X volume originale del campione) e pipettare su e giù 5 volte per mescolare accuratamente la sospensione di resina con gli ampliconi;
2. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Intanto preparare etanolo al 70% per i lavaggi successivi con: 230 μ L di etanolo e 100 μ L di acqua nucleasi-free per ogni campione;

3. Trasferire le provette su rack magnetico ed incubare a temperatura ambiente per 3 minuti. Rimuovere il surnatante evitando di toccare il pellet;
4. Aggiungere 150 μL di etanolo al 70% appena preparato e ruotare le provette sul rack magnetico per 5-6 volte (controllare che il precipitato migri correttamente). Rimuovere il surnatante (etanolo), evitando di toccare il pellet;
5. Ripetere step 4 per un secondo lavaggio;
6. Fare una centrifuga veloce, facendo attenzione a posizionare il pellet sulla parte esterna del rotore della centrifuga;
7. Riposizionare le provette sul rack magnetico;
8. Eliminare l'etanolo in eccesso che si è depositato sul fondo della provetta. Lasciare asciugare la resina, con il tappo della provetta aperto, incubando a temperatura ambiente per 2 minuti (o finché l'etanolo non è completamente evaporato);
9. Rimuovere le provette dal rack magnetico, poi aggiungere 50 μL di TE
10. Vortex e centrifuga
11. Incubare le provette a temperatura ambiente per 2 minuti

12. Riposizionare le provette su rack magnetico per almeno 2 minuti, poi prelevare surnatante e trasferirlo su provette nuove.

La libreria finale è pronta per essere quantizzata.

Quantificazione con Agilent 2200 Tape Station System

In questa fase verrà utilizzato lo strumento *TapeStation 2200* (Agilent Technologies) che permette, attraverso l'elettroforesi automatizzata, di separare acidi nucleici e proteine su gel d'agarosio e ottenere la visualizzazione degli ampliconi e avere informazioni riguardo la quantità di DNA presente. È costituito principalmente da tre elementi: il dispositivo *Screen Tape*, lo strumento *TapeStation*, un pacchetto *software Agilent*. Il gel è contenuto in micro-capillari all'interno dello *ScreenTape* dotato di anodo e catodo, per cui si ottiene una separazione di frammenti di DNA, precedentemente amplificati, in modo molto rapido. La procedura standard prevede l'allestimento di una provetta da 0,2 ml per ogni campione e una per il ladder. Il ladder è una miscela di DNA con peso molecolare noto, che viene inserito nelle corse elettroforetiche per permettere all'operatore di determinare le dimensioni dei frammenti processati.

Basta inserire le provette con i campioni e il dispositivo ScreenTape nello strumento Tape station 2200 (Fig.21) e il sistema provvede a separare i campioni.

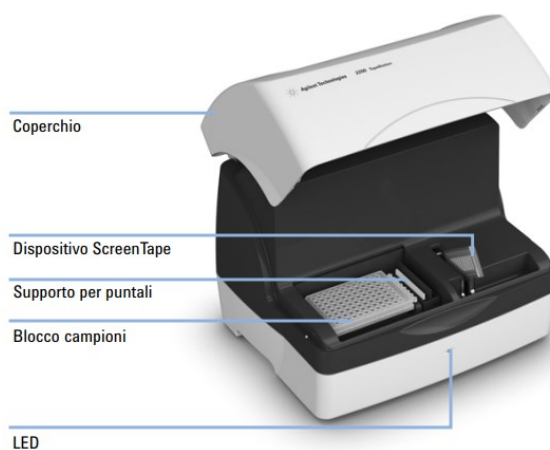


Fig.21 Strumento Tape Station 2200 (Agilent Technology, Rev.c).

La quantificazione delle librerie finali viene fatta mediante l'High Sensivity D1000 Reagents (©Agilent Technologies). Si procede all'allestimento di provette da 0,2 ml per ogni campione unitamente a quella per il ladder.

In ogni provetta vengono aggiunti 4 μ l di *D1000 HS* (alta sensibilità) *Buffer* e 2 μ l di *campione*, o di *High Sensivity D1000 ladder*.

Successivamente i campioni vengono posti in agitazione mediante lo strumento IKA™ Agitatore vortex MS 3 (ThermoFisher Scientific) e successivamente caricare i campioni nello strumento con apposita Screen Tape (D1000).

Avviare la corsa dopo aver inserito il nome dei campioni nell'apposita griglia (Fig.22).

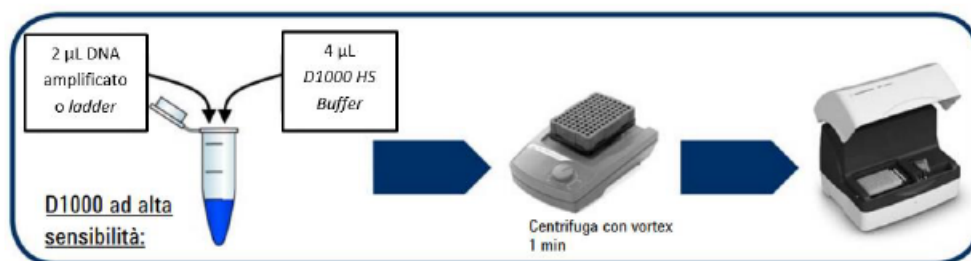


Fig.22 Schematizzazione dei processi di caricamento sullo strumento (Tape Station Agilent Technologies, Inc. 2011-2014, 2015 2964-94003 Rev.C).

Il risultato finale è dato da un'immagine del gel d'agarosio ad alta risoluzione, da un elettroferogramma e da una tabella in cui viene riportata la taglia dell'amplicone analizzato e una stima della sua concentrazione come riportato nel paragrafo 6.2 nel capitolo Risultati.

5.4.2 Templating

Prima della messa in funzione del PGM TM, è necessario effettuare la preparazione del campione con il sistema Ion OneTouch2TM (ThermoFisher Scientific). Il sistema è dotato di due strumenti: Ion One TouchTM *Emulsion PCR* (sistema di amplificazione) e Ion OneTouchTMES (sistema di arricchimento) mostrati in Fig.23

In pratica, si effettua una fase preliminare di *Emulsion PCR* delle librerie tramite l'*Ion OneTouch 2™ Instrument* (ThermoFisher Scientific) e successivamente si procede con la fase di arricchimento/purificazione del campione amplificato con l'*Ion OneTouch™ ES*.



*Fig. 23 Ion One Touch 2™ (destra) e Ion OneTouch™ ES (sinistra).
(ThermoFisher.com)*

L'*Ion One Touch 2™* (ThermoFisher Scinetific) è in grado di creare un'emulsione di acqua e olio che favorisce la formazione di micelle in cui possono essere facilmente incorporati una biglia (*bead*) e un singolo amplicone. Nella micella avviene l'amplificazione della molecola di DNA incorporata (Fig.24). Dopo l'amplificazione clonale, ciascuna particella sferica (ISP) contiene tante copie dello stesso frammento di DNA, che da un lato è legato alla ISP, dall'altro invece è biotinilato.

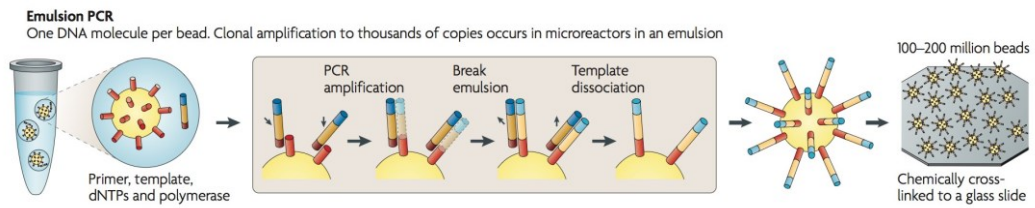


Fig.24 Emulsion PCR.

(https://people.montefiore.uliege.be/kbessonov/archived_data/GBIO009-1course2012/student_presentations/HW2%20-%20presentation_Detlev.pdf)

L'arricchimento con il sistema *Ion OneTouch™ ES*, sfrutta l'affinità tra biotina e streptavidina. In particolare, viene poi utilizzato un secondo tipo di biglie, a cui è adesa la streptavidina, in grado di selezionare solo le *beads* positive (monoclonali o policlonali). In questo modo, tutte le ISPs vuote, che non contengono alcun frammento di DNA, vengono eliminate (*Fig.25*).

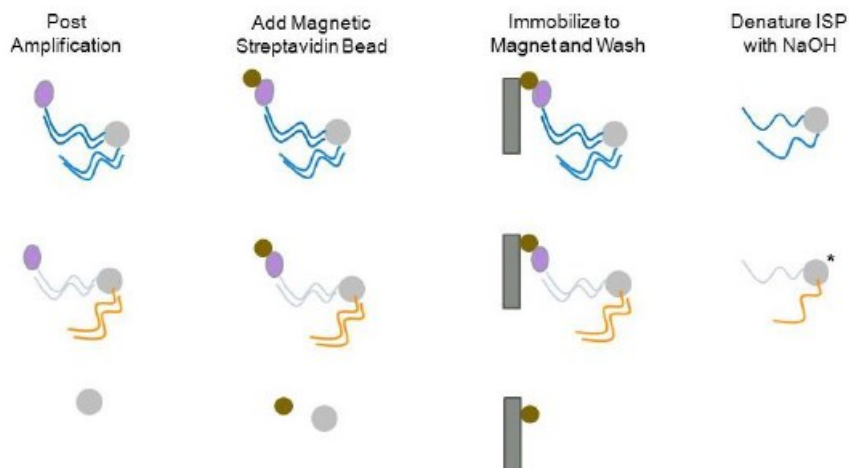


Fig. 25 Illustrazione grafica delle tre possibili situazioni. Beads monoclonale, beads policlonale, beads che non ha legato nessun frammento di DNA.
(<https://slideplayer.com/slide/5867658/>)

Il campione finale è composto da ISPs a cui sono adesi i frammenti di DNA. Questo viene poi caricato su un chip (Ion Chip) per la fase di sequenziamento con PGM™.

Emulsion PCR- Ion OneTouch 2™

È un metodo comunemente impiegato per l'amplificazione del template in più piattaforme di sequenziamento basato su *Ion Torrent™ Next Generation Sequencing*.

Di seguito, descriviamo i metodi di preparazione e arricchimento delle beads positive basato modello Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ (ISP) sul sistema Ion Personal Genome Machine(®) (PGM™, Thermo Fisher Scientific).

Prima di iniziare ad allestire *Emulsion PCR con Ion OneTouch 2™* (ThermoFisher Scientific), è necessario portare tutte le librerie alla stessa concentrazione. In base alla concentrazione molare ottenuta a seguito della quantizzazione con TapeStation 2200 System (©Agilent Technologies), si

allestiranno diluizioni specifiche. La concentrazione a cui portare le librerie è 100 pM.

A questo punto si crea un pool equimolare delle librerie mettendo 5 µL di libreria di ogni campione da analizzare (100pM) nella stessa provetta. Al termine, diluire la libreria come indicato nel manuale, ovvero aggiungere 2 µL di pool di libreria con 23 µL di acqua Nuclease-free.

Dopo aver preparato l'Ion OneTouch 2™ per iniziare la corsa (Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 kit), si procede con:

1. Preparazione del campione come in *Tabella 20*:

Ordine	Reagente	Volume
1	Nuclease-free Water	25 µL
2	Ion PGM™ Hi-Q™ View enzyme Mix	50 µL
3	Diluted library	25µL
4	Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs	100 µL
	TOTALE	~1000µL

Tab. 20 Ordine dei reagenti per la preparazione del campione per l'emulsione PCR

2. Vortex e centrifuga breve;

3. Pipettare la soluzione appena preparata (~1000µL) nella sample port dell'Ion OneTouch™ Reaction Filter;
4. Pipettare 850 µL di olio Ion OneTouch™ Reaction Oil nella sample port dell'Ion OneTouch™ Reaction Filter;
5. Cambiare puntale;
6. Pipettare 850 µL di olio Ion OneTouch™ Reaction Oil nella sample port dell'Ion OneTouch™ Reaction Filter;
7. Invertire l'Ion OneTouch™ Reaction Filter e inserirlo nell'apposito alloggiamento;
8. Avviare la corsa.

Una volta terminata l'*Emulsion PCR* è necessario recuperare il campione. In particolare, il risultato finale dell'*emulsion PCR* è costituito da biglie a cui sono adese tante copie dello stesso amplicone, le cosiddette ISP (Ion Sphere). Ogni biglia possiede un solo tipo di amplicone sulla sua superficie. Tutti gli ampliconi sono da una parte adesi alla biglia e dall'altra legati a una molecola di biotina, fondamentale per lo step successiva di arricchimento.

Una volta terminata l'amplificazione clonale è necessario rimuovere subito le Ion OneTouch™ Recovery Tubes dalla centrifuga dello strumento e gettare l'Ion OneTouch™ Recovery Router:

1. Eliminare il tutto il sovrnatante tranne 100 μ L da ogni Ion OneTouch™ Recovery Tubes;
2. Aggiungere 500 μ L di Ion OneTouch™ Wash Solution ad ogni Ion OneTouch™ Recovery Tubes e pipettare per mettere le ISPs in sospensione;
3. Recuperare le ISPs risospese e metterle in un'unica provetta;
4. Centrifuga a 15.500 rcf per 2,5 minuti;
5. Rimuovere tutto il sovrnatante tranne 100 μ L.

Arricchimento/Purificazione delle librerie- Ion OneTouch™ ES

Il campione ottenuto *dall'emulsion PCR* viene ora preparato per il caricamento su Ion OneTouch™ ES. Questo strumento lavora su una strip a 8 pozzetti (*Fig.26*) in cui è necessario mettere le soluzioni che servono per l'arricchimento.

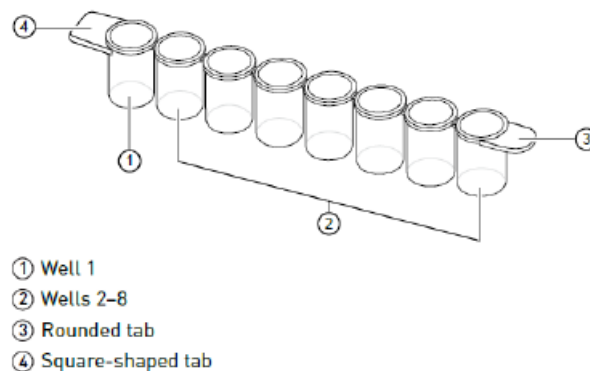


Fig.26 Strip a 8 pozzetti da caricare su Ion OneTouch™ ES (Ion PGM™Hi-Q™View OT2 Kit, User Guide, Ion Torrent, Thermofisher Scientific, Rev. C.0.)

Si procede come di seguito:

1. Preparare la *Melt Off Solution* come descritto in Tab. 21:

Ordine	Reagente	Volume
1	Tween™Solution	280 µL
2	NaOH 1M	40 µL
	TOTALE	320 µL

Tab. 21 Preparazione della Melt Off Solution

2. Vortex per almeno 30 secondi della resina Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads (Invitrogen™), per risospendere le biglie;
3. Centrifuga per 2 secondi della resina Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads;
4. Trasferire 13 µL di Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads in una provetta da 1,5 mL;
5. Posizionare la provetta su rack magnetico per 2 minuti;
6. Eliminare il surnatante, senza toccare il pellet;

7. Aggiungere 130 μL di MyOne™ Beads Wash Solution;
8. Rimuover la provetta dal rack magnetico;
9. Vortex per 30 secondi;
10. Centrifuga per 2 secondi;
11. Riempire i pozzetti della strip da 8 pozzetti come in *Tab.22*:

Pozzetto	Reagente	Volume
1	Campione	~100 μL
2	Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads risospese in MyOne™ Beads Wash Solution	130 μL
3	Ion OneTouch™ Wash Solution	300 μL
4	Ion OneTouch™ Wash Solution	300 μL
5	Ion OneTouch™ Wash Solution	300 μL
6	Vuoto	----
7	Melt-Off Solution	300 μL
8	Vuoto	----

Tab.22 Ordine di inserimento dei reagenti nei pozzetti

12. Posizionare la strip da 8 pozzetti nell'apposito alloggiamento nell' *Ion OneTouch™ES*;
13. Preparare una provetta da 0,2 mL con 10 μL di *Neutralization Solution*;

14. Posizionare la provetta da 0,2 mL nell'alloggiamento a lato;
15. Posizionare il nuovo puntale;
16. Dare il via alla corsa di arricchimento/purificazione;
17. Terminata la corsa, chiudere la provetta da 0,2 mL e invertirla per 5 volte;
18. Gettare la strip da 8 pozzetti e il puntale.

Il campione finale è composto da ISPs a cui sono adesi i frammenti di DNA. Questo viene poi caricato su Ion Chip (*Thermo fisher Scientific*) per la fase di sequenziamento con *PGM*TM.

5.4.3 Sequenziamento con Ion PGMTM System (Ion Torrent)

Il sistema Ion PGMTM rende il sequenziamento di nuova generazione economico e di alta qualità. Presenta due aspetti essenziali che lo caratterizzano rispetto alle altre tecnologie:

- Utilizzo dei semiconduttori come elemento strutturale per il sequenziamento (Ion Chips);
- Impiego di un sistema di rilevamento non basato su reazioni luminescenti ma su variazioni di potenziale.

In particolare, *Ion PGM™ System* sfrutta la tecnologia Ion Torrent che si basa sull'impiego di un particolare chip (Ion Chip) con micropozzetti all'interno dei quali avviene ciclicamente il processo di incorporazione nucleotidica e conseguente rilascio di ioni H⁺. Il sistema è in grado di capire se un nucleotide è stato incorporato percependo le variazioni di pH indotte dal rilascio del protone. Per sequenziare tramite Ion PGM™ System, quindi, è necessario preparare il plan di lavoro on-line, sul sito della ThermoFisher®.

Il protocollo Ion PGM™ Hi-Q™ View sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) indica che prima di iniziare una corsa di sequenziamento bisogna effettuare dei lavaggi dello strumento. In particolare, si esegue un lavaggio con acqua 18 MΩ e uno con clorito. Questi lavaggi sono essenziali per stabilire un corretto valore di pH, necessario affinché il sequenziamento avvenga correttamente.

A questo punto è necessario preparare la piattaforma con l'inizializzazione. Si preparano le bottiglie per i lavaggi (3 Wash Bottle) e i quattro dNTP. Dopodiché si procede con il caricamento del campione *sull'Ion Chip*.

- Scongela il *Sequencing Primer* in ghiaccio;
- Vortex e centrifuga veloce di *Control Ion Sphere™ Particles*;

- Aggiungere 5 μL di *Control Ion Sphere™ Particles* direttamente nella provetta con il campione, uscita dalla *Ion OneTouch™ ES*;
- Centrifuga per 2 minuti a 15.500 rcf;
- Eliminare il surnatante lasciando $\sim 15 \mu\text{L}$ nella provetta;
- Aggiungere 12 μL di *Sequencing Primer*;
- Assicurarsi che il volume totale sia di $\sim 27 \mu\text{L}$ (eventualmente aggiungere *Annealing Buffer*);
- Caricare la provetta su termociclatore con le condizioni descritte in *Tab.23*

Temperatura	Tempo
95°C	2 minuti
37°C	2 secondi

Tab.23 Condizioni di reazione.

- Aggiungere 3 μL Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerase al campione (dopo esser stato su termociclatore);
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;

- Eliminare la maggior quantità possibile di liquido dal chip posizionando il chip a 45° e poggiando il puntale nella loading port;
- Centrifuga del chip;
- Riempire il chip con il campione (~30 µL) a una velocità di ~1 µL/sec (evitare l'introduzione di aria nel chip);
- Centrifuga del chip;
- Pipettare il campione dentro e fuori dal chip per favorire la dispersione delle ISPs su tutta la superficie del chip (pipettare lentamente per evitare la formazione di bolle);
- Centrifuga del chip;
- Caricare l'*Ion Chip* sull'*Ion PGM™ System*.

Preparare il plan online e selezionarlo al momento dell'inizio del sequenziamento.

Analisi Bioinformatica:

L'analisi bioinformatica consiste in algoritmi bioinformatici utili per l'interpretazione dei dati ottenuti dopo il sequenziamento di genomi. Richiede personale specializzato e queste analisi risultano essenziali per capire se la chiamata delle varianti ottenute con la NGS risultano avere o meno un impatto

a livello fenotipico. L'analisi consta di tre differenti fasi (D. Mazzey et al., 2015):

1. Fase di allineamento: Si procede con l'allineamento delle reads, piccoli frammenti ottenuti al termine del sequenziamento, e delle sequenze di riferimento del genoma umano di riferimento (hg19). È possibile sfruttare il confronto con il genoma di riferimento per ricavare le differenze lungo la sequenza, dal momento che sono queste a caratterizzare geneticamente un individuo e di conseguenza la loro identificazione è utile per rilevare l'impatto sul fenotipo;

2. Fase di chiamata delle varianti: le differenze tra sequenza ricostruita e di riferimento sono chiamate varianti genetiche e possono essere suddivise in tre categorie: varianti a singolo nucleotide (SVN o SNP), inserzioni o delezioni (INDEL) e varianti strutturali. Tra due individui c'è sempre un certo grado di omologia ed in questa fase si identificano tutte le varianti del paziente, per cui sarà essenziale proseguire con la terza fase per ridurre ulteriormente l'analisi.

3. Fase di Filtraggio e annotazione: tramite algoritmi sviluppati per l'ion torrent si ha una fase di filtraggio e chiamata delle varianti tramite il plugin variant caller. Queste varianti identificate saranno sottoposte poi ad un'analisi secondaria mediante il software Integrative Genomic Viewer

(software.broadinstitute.org) per confermare la presenza o meno di queste varianti.

Capitolo 6

RISULTATI

6.1 Risultati della Quantificazione degli Estratti

Nella tabella sottostante sono mostrati i risultati della quantizzazione di tutti e tre i campioni effettuati con la medesima tecnica di quantificazione, ovvero tramite il dsDNA HS Assay kit utilizzando il fluorimetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific). Conoscere la quantità di DNA presente in un campione biologico consente di ottimizzare la successiva fase di amplificazione.

In particolare, per il campione 1 è richiesta una concentrazione pari a 5ng/ μL per il sequenziamento Sanger, mentre per i campioni 2 e 3 è richiesta una concentrazione pari a circa 15ng/ μL per il sequenziamento in NGS.

I valori di quantificazione sono riportati nella *Tabella 24*:

CAMPIONI	VALORI	VALORI FINALI
CAMPIONE 1	1,6 ng/ μL	4,8 ng/ μL
CAMPIONE 2	14,7 ng/ μL	14,7 ng/ μL
CAMPIONE 3	5,2 ng/ μL	15,6 ng/ μL

Tab.24 Valori di quantificazione degli estratti.

Come descritto nei materiali e metodi, per il campione 1, per il quale è stata allestita una reaction mix con il kit Qiagen® Multiplex PCR, il volume di DNA che è stato utilizzato per procedere al sequenziamento era di 3 µL. Mentre, i volumi di DNA utilizzati sono 1 µL per il campione 2 e 3 µL per il campione 3 per raggiungere la concentrazione richiesta di 15ng/µL.

6.2 Risultati della quantificazione delle librerie

Esclusivamente per i campioni 2 e 3 si è proceduto alla quantificazione delle librerie mediante lo strumento Agilent 2200 Tape Station System® (Agilent Technologies) e l'utilizzo del kit High Sensitivity D1000 Reagents (Agilent Technologies), costituito da D1000 HS Buffer e D1000 HS ladder. Questa elettroforesi microfluidica consente non solo di quantizzare le librerie ma anche di stimare l'ampiezza degli ampliconi ottenuti, che nel caso di questo studio risultava compresa all'incirca tra 150-300 bp in base agli ampliconi prodotti dal Inherited disease panel.

Successivamente al caricamento dei campioni nello strumento con apposita D1000 HS ScreenTape® e avviata la corsa, il risultato finale è dato da un'immagine digitale del gel d'agarosio ad alta risoluzione (*Fig.27*)

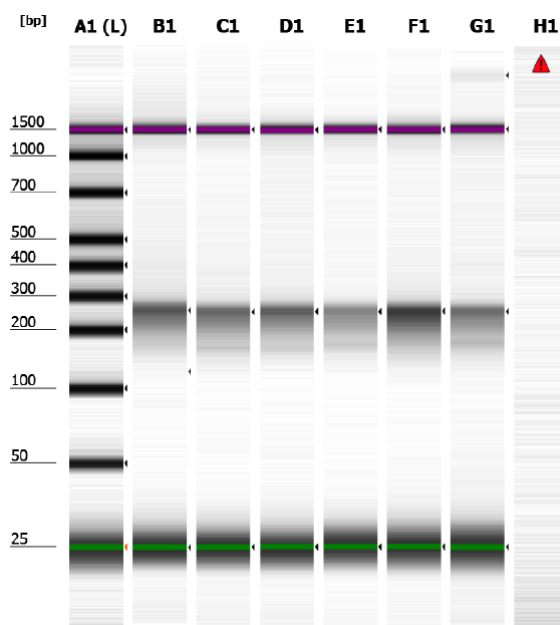


Fig. 27 Immagine del gel d'agarosio digitale ottenuta da Agilent 2200 TapeStation System®

Di seguito, le immagini degli elettroferogrammi (*fig.28, fig.29, fig.30*) e la *Tab. 25* che riportano i dati di quantificazione delle librerie per ciascuno dei tre pool amplificati per singolo campione.

CAMPIONE 2			
POOL	1	2	3
Size (bp)	258	253	254
Peak molarity (pmol/l)	2150	2050	2040

Tab.25 Valori di size e peak molarity relativi al campione 2 per ognuno dei tre pool di primer amplificati.

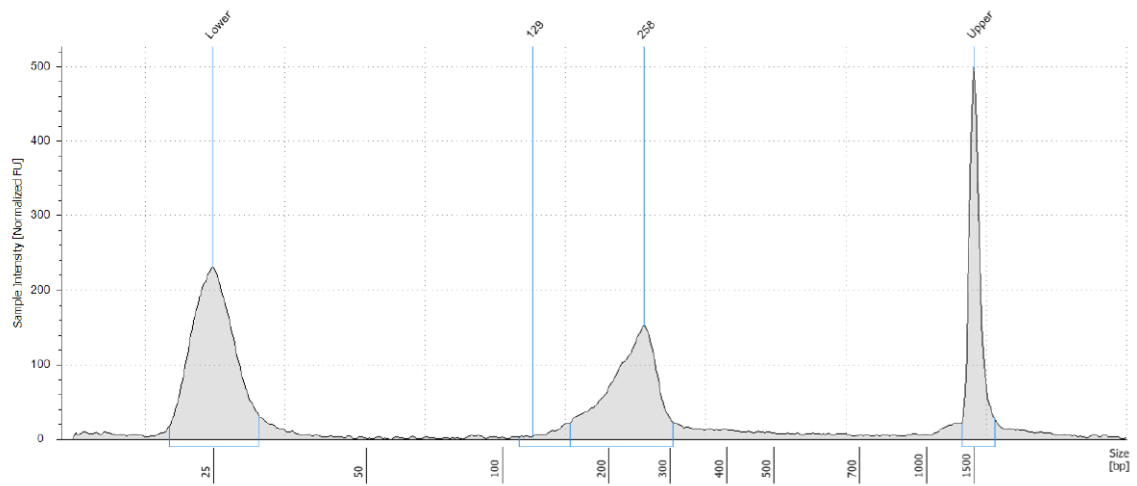


Fig.28 Grafico raffigurante gli ampliconi del pool 1 relativi al campione 2. Nel grafico sono riportati i picchi del lower e upper, marker per la corretta assegnazione del size.

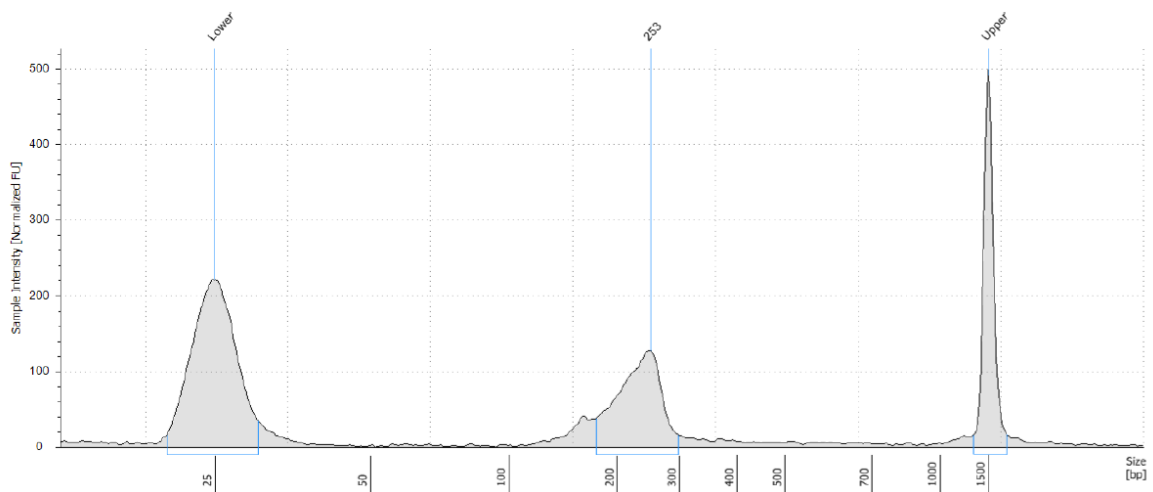


Fig.29 Grafico raffigurante gli ampliconi del pool 2 relativi al campione 2. Nel grafico sono riportati i picchi del lower e upper, marker per la corretta assegnazione del size.

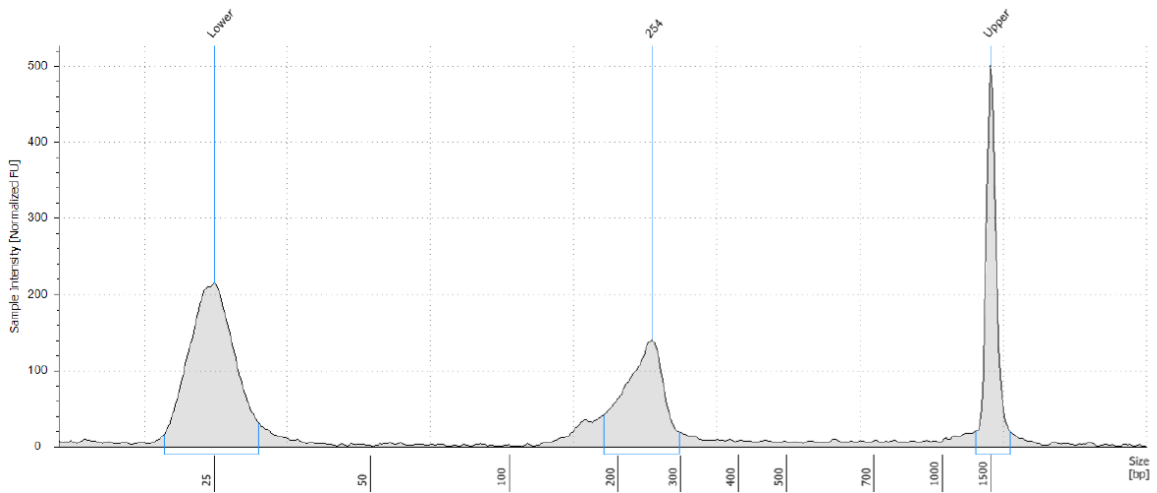


Fig. 30 Grafico raffigurante gli ampliconi del pool 3 relativi al campione 2. Nel grafico sono riportati i picchi del lower e upper, marker per la corretta assegnazione del size.

Relativamente al campione 3, di seguito è riportata la *tab. 26* con i dati di quantificazione delle librerie per ciascuno dei tre pool e le immagini degli elettroferogrammi (*fig.31, fig.32, fig.33*).

CAMPIONE 3			
POOL	1	2	3
Size (bp)	253	254	253
Peak molarity (pmol/l)	1650	2680	1930

Tab.26 Valori di size e peak molarity relativi al campione 3 per ognuno dei tre pool di primer amplificati.

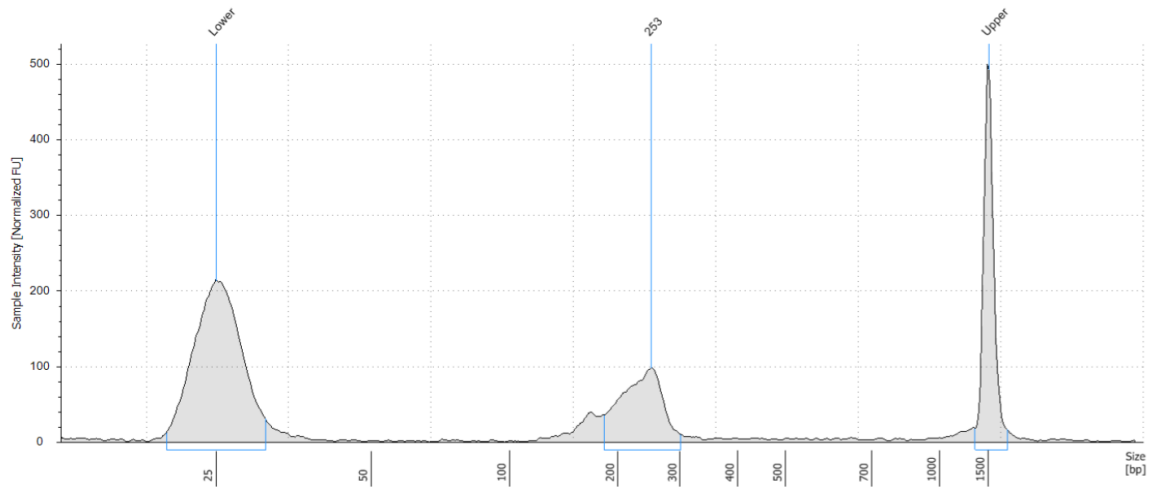


Fig.31 Grafico raffigurante gli ampliconi del pool 1 relativi al campione 3. Nel grafico sono riportati i picchi del lower e upper, marker per la corretta assegnazione del size.

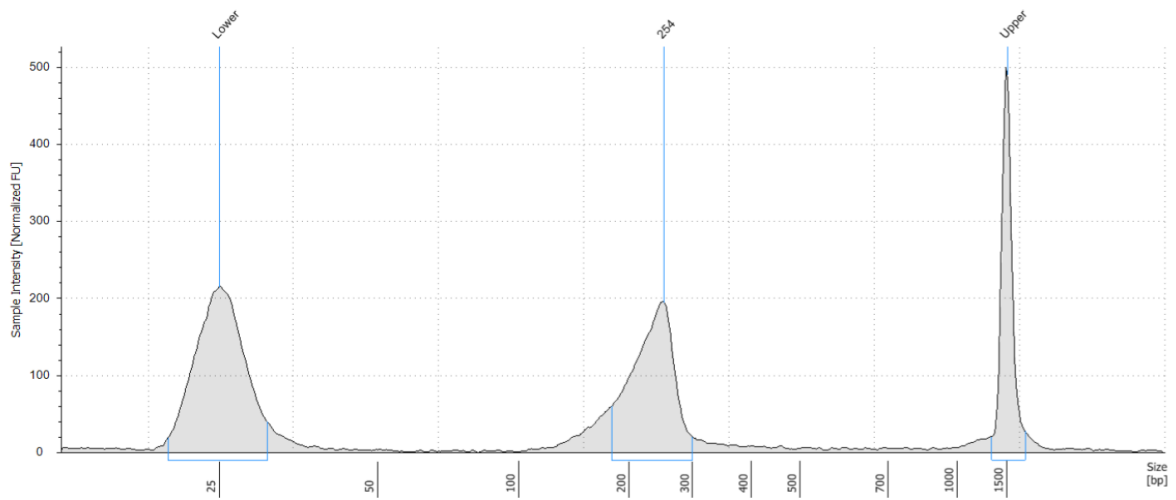


Fig.32 Grafico raffigurante gli ampliconi del pool 2 relativi al campione 3. Nel grafico sono riportati i picchi del lower e upper, marker per la corretta assegnazione del size.

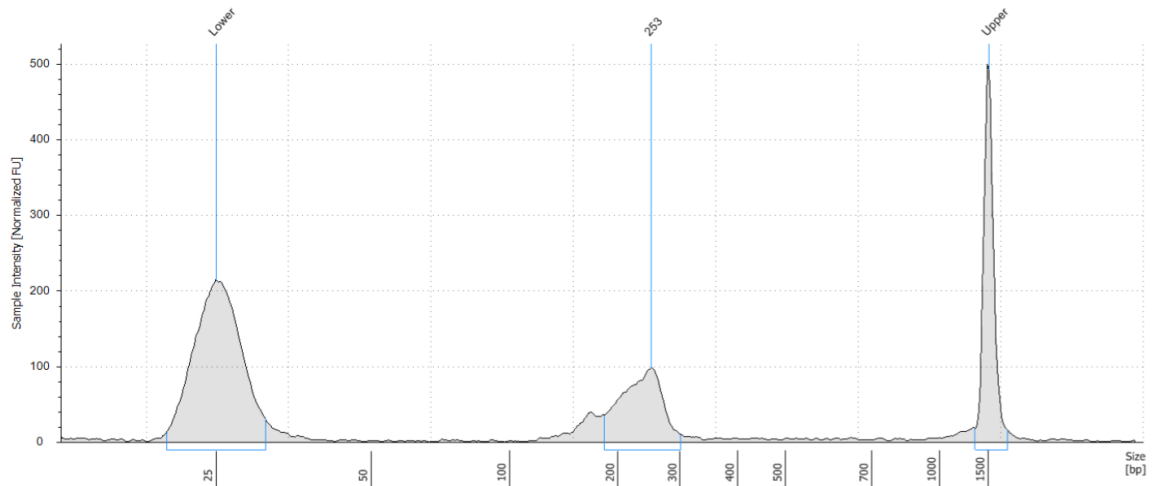


Fig. 33 Grafico raffigurante gli ampliconi del pool 3 relativi al campione 3. Nel grafico sono riportati i picchi del lower e upper, marker per la corretta assegnazione del size.

Le librerie così amplificate sono state diluite per raggiungere la concentrazione di 100pM, come descritto dal manuale per il sequenziamento mediante PGMTM alla fase del Templating, e solo in seguito si è proceduto con il caricamento su *Ion Chip 318v2*.

6.3 Risultati Sequenziamento Sanger

Attraverso il software SeqScape3, è stato possibile analizzare le sequenze genetiche ottenute dal sequenziamento Sanger e visualizzate negli elettroferogrammi riguardanti le sequenze forward e reverse ottenuti, in relazione con la sequenza di riferimento. Viene attribuita una condizione di omozigosi o eterozigosi a seconda del picco o dei picchi corrispondenti alla

posizione del polimorfismo. Nella *figura 34* è riportato il risultato del polimorfismo in esame, ovvero, rs121918625 identificato sul gene SCN1A.

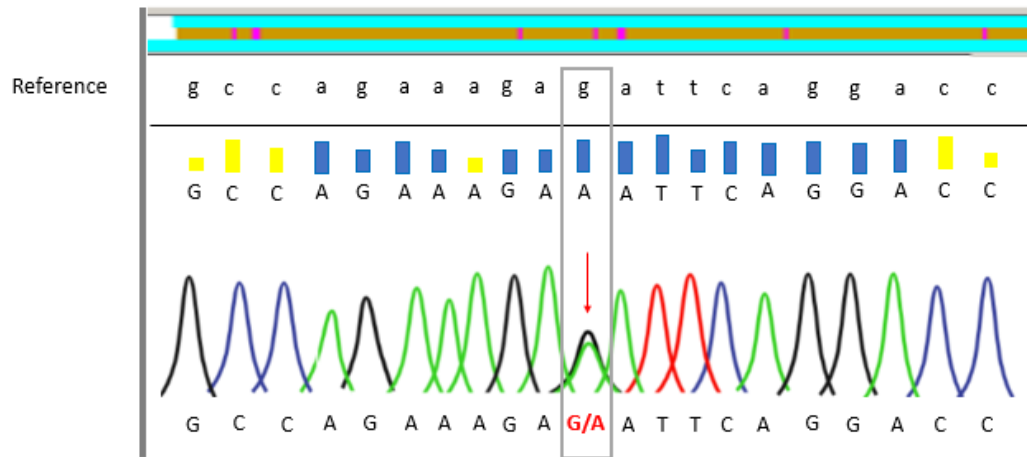


Fig.34 Rappresentazione dell'elettroferogramma per la posizione in esame.

Per il campione 1 è confermata la presenza della variante genetica nel gene SCN1A (2q24.3), che codifica per il canale ionico del sodio, le cui mutazioni sono associate alla Sindrome di Dravet. La variante è riportata su ClinVar, un database che informa sulla rilevanza di varianti genomiche per una data patologia e informa quali di esse sono associate ad un certo fenotipo riconducibile alla letteratura, con il codice: ***NM_001165963.4(SCN1A):c.2956C>T (p.Leu986Phe).***

Si tratta di una sostituzione missenso C>T in cui la Leucina è sostituita alla Fenilalanina in posizione 986 della corrispondente proteina codificante. La

variante osservata è presente sull'esone 19 ed è già nota in letteratura (Lossin C et al., 2003; Claes et al., 2001). Come descritto in letteratura e riportato su ClinVar (*figura 35*) la variante viene identificata come patogena.

Interpreted condition	Interpretation	Number of submissions	Review status	Last evaluated	Variation/condition record
Early infantile epileptic encephalopathy with suppression bursts	Pathogenic	1	criteria provided, single submitter	Aug 13, 2021	RCV000794577.3
Severe myoclonic epilepsy in infancy	Pathogenic	2	no assertion criteria provided	Jun 1, 2001	RCV000032605.23

Interpretation (Last evaluated)	Review status (Assertion criteria)	Condition (Inheritance)	Submitter	More information
Pathogenic (Aug 13, 2021)	criteria provided, single submitter (Invitae Variant Classification Sherlock (09022015)) Method: clinical testing	Early infantile epileptic encephalopathy with suppression bursts Affected status: unknown Allele origin: germline	Invitae Accession: SCV000933993.2 First in ClinVar: Aug 14, 2019 Last updated: May 16, 2022	
Pathogenic (Jun 01, 2001)	no assertion criteria provided Method: literature only	DRAVET SYNDROME Affected status: not provided Allele origin: germline	OMIM Accession: SCV000056359.5 First in ClinVar: Apr 04, 2013 Last updated: Oct 20, 2020	Publications: PubMed (1)
not provided (-)	no assertion provided Method: not provided	Severe myoclonic epilepsy in infancy Affected status: not provided Allele origin: not provided	UniProtKB/Swiss-Prot Accession: SCV000091014.1 First in ClinVar: Oct 31, 2013 Last updated: Oct 31, 2013	

Fig.35 Informazioni presenti sul database ClinVar per la variante p.Leu986Phe

Per confermare la patogenicità riscontrata, abbiamo utilizzato l'analisi in silico VarSome (*Fig.36*) e Intervar, seguendo quanto definito dalle linee guida di ACMG (riferimento); queste permettono una classificazione delle varianti in 'Benigne', 'Probabilmente benigne', 'Significato incerto', 'Probabilmente Patogeni' e 'Patogeni', insieme a prove dettagliate.

Dal tool Varsom la variante è classificata come patogena secondo i seguenti criteri definiti dall'ACMG:

chr2-166893031 - G - A (SCN1A.p.L986F)

Informazioni generali SNV SCN1A(NM_001165963.4):c.2956C>T (p.Leu986Phe)	PharmaGKB Nessun dato disponibile	Classificazione ACMG Patogeno 15 punti = 15 P - 0 B	Frequenze esomi : non trovato (cov. 37.7) genomi : non trovato (cov. 32.6)	Punteggi di patogenicità 12 6	Rete Beacon
Geni SCN1A (+ altri 2)	Trascrizioni NM_001165963.4 - missenso MANE Selezione	ClinVar patogeno ★☆☆☆ Presentazioni: 3	MitoMag Nessun dato disponibile	ClinGen Nessun dato disponibile	Visualizzatore di proteine
Contributi della comunità	Navigatore regionale	AMORE Nessun dato disponibile	OMIMB Nessun dato disponibile	GWAS Nessun dato disponibile	
Pubblcazioni Variante: 46 Gene: 998	Dati di espressione In alto: Cervello - Corteccia Tessuti: 15	Varianti UniProt Patogeno	Punteggi di conservazione fiop100: 4.058	Varianti strutturali	

Variante Spiegare

Cromosoma car2	Posizione 166893031	Sequenza REF G	Sequenza ALT UN	Tipo di variante SNV	Citobanda 2q24.3-2q24.3	HGVS SCN1A(NM_001165963.4):c.2956C>T (p.Leu986Phe)	ID RS rs121918625 ClinVar	Simboli genetici SCN1A SCN1A-AS1 LOC102724058
-------------------	------------------------	-------------------	--------------------	-------------------------	----------------------------	--	--------------------------------	--

UniProt variants Version: 20-Jan-2023

Clinical significances likely pathogenic pathogenic disease	Variant type Disease	Annotation ID VAR_014268	Protein Sodium channel protein type 1 subunit alpha P35498	Gene SCN1A	Transcripts ENST00000303395
---	-------------------------	-----------------------------	--	---------------	--------------------------------

Publications:
11359211, 14672992

chr2-166893031-G-A (SCN1A.p.L986F)

ACMG Classification View All

Automated criteria Show summary view Enable clinical evidence Show failed criteria

Rule	Explanation
PM1 Strong	Hot-spot of length 17 amino-acids has 18 missense/in-frame variants (15 pathogenic variants, 3 uncertain variants and no benign), which qualifies as strong pathogenic.
PP3 Strong	MetaRNN = 0.947 is greater than 0.939 => strong pathogenic.
PP5 Strong	Using strength Strong in view of the combined evidence from ClinVar and UniProt Variants. ClinVar classifies this variant as Pathogenic, 1 star (criteria provided, reviewed Jun '22, 3 submissions), citing 11359211. UniProt Variants classifies this variant as Pathogenic, citing 2 articles (14672992 and 11359211), associated with Dravet syndrome and Early infantile epileptic encephalopathy with suppression bursts.
PMS Moderate	Alternative variant chr2:166893030 A=>G (Leu986Pro) is classified Pathogenic by UniProt Variants (and confirmed using ACMG).
PM2 Supporting	Variant not found in gnomAD genomes, good gnomAD genomes coverage = 32.6. Variant not found in gnomAD exomes, good gnomAD exomes coverage = 37.7.

Fig.36 Analisi della patogenicità della variante mediante il tool Varsome.

- PM1: Situato in un hot-spot mutazionale di 17 aminoacidi, ha 18 varianti missenso/in-frame (15 varianti patogene, 3 varianti incerte e nessuna benigna), che si qualifica come forte patogeno.

- PP3: Prove computazionali supportano l'effetto deleterio di questo gene. MetaRNN = 0,947 è maggiore di 0,939 \Rightarrow forte patogenicità.
- PP5: Fonti attendibili segnalano di recente una variante patogena (ClinVar e UniProtI). UniProt Variants classifica questa variante come patogena, citando 2 articoli (14672992 e 11359211), associati alla sindrome di Dravet e all'encefalopatia epilettica infantile precoce con raffiche di soppressione.
- PM5: una variante alternativa chr2:166893030 A \Rightarrow G (Leu986Pro) è classificata patogena dalle varianti UniProt (e confermata mediante ACMG).
- PM2: Variante assente dai controlli in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project o Exome Aggregation Consortium.

Si è utilizzato anche InterVar, (*Fig.37*) un software bioinformatico per l'interpretazione clinica di varianti genetiche utilizzando SNIP ID rs121918625.

The screenshot displays the InterVar web interface for variant analysis. At the top, there is a navigation bar with 'Start w/InterVar', 'About', 'Services', 'Contact', and 'Related projects'. A warning message states: 'Users are advised to examine detailed evidence at [link] or disease to perform manual adjustments.' The main content area shows the database version (hg19_update) and the search criteria (dbSNP ID rs121918625). Below this, there are buttons for 'Show/hide columns', 'Restore columns', 'Copy to clipboard', and 'Download results'. The variant details table includes columns for Chromosome (Chr), Position, Reference (Ref), Alternate (Alt), Gene (refGene), and Interval. The variant is located on Chromosome 2 at position 166893031, with a G to A substitution in the SCN1A gene. A red box highlights the variant as 'Likely pathogenic (Details&Adjust)'. A detailed evidence panel is open, listing 28 criteria. Key evidence includes: PM1 (located in a mutational hot spot), PM2 (absent from controls), PP3 (computational evidence), and PP5 (reputable source reports). The variant is classified as 'Pathogenic' in ClinVar. The interface also shows a search bar, a table of transcripts (Ref, MAF in gnomAD_ALL(genome), Disease in OrphaNet), and a pagination control.

Fig. 37 Mostra la valutazione della variante, ottenuta con l'uso di InterVar secondo le linee guida: (PM1: localizzato in un dominio di trasporto ionico; BP1: variante missenso in un gene per il quale è noto che le varianti principalmente troncanti causano la malattia).

Per concludere, un'ulteriore conferma del grado di patogenicità di questa variante nel gene SCN1A è la frequenza allelica alternata nella popolazione, risultata inferiore allo 0,05, come riportato in gnomAD v2.1.1

6.4 Risultati del Sequenziamento e analisi del Coverage

Sono state eseguite due corse di sequenziamento su *Ion PGM™ System*, utilizzando *Ion 318™ Chip v2*.

Il report della corsa, riguardante il campione 2 è riportato nella *Fig38 seguente*.

Run Summary

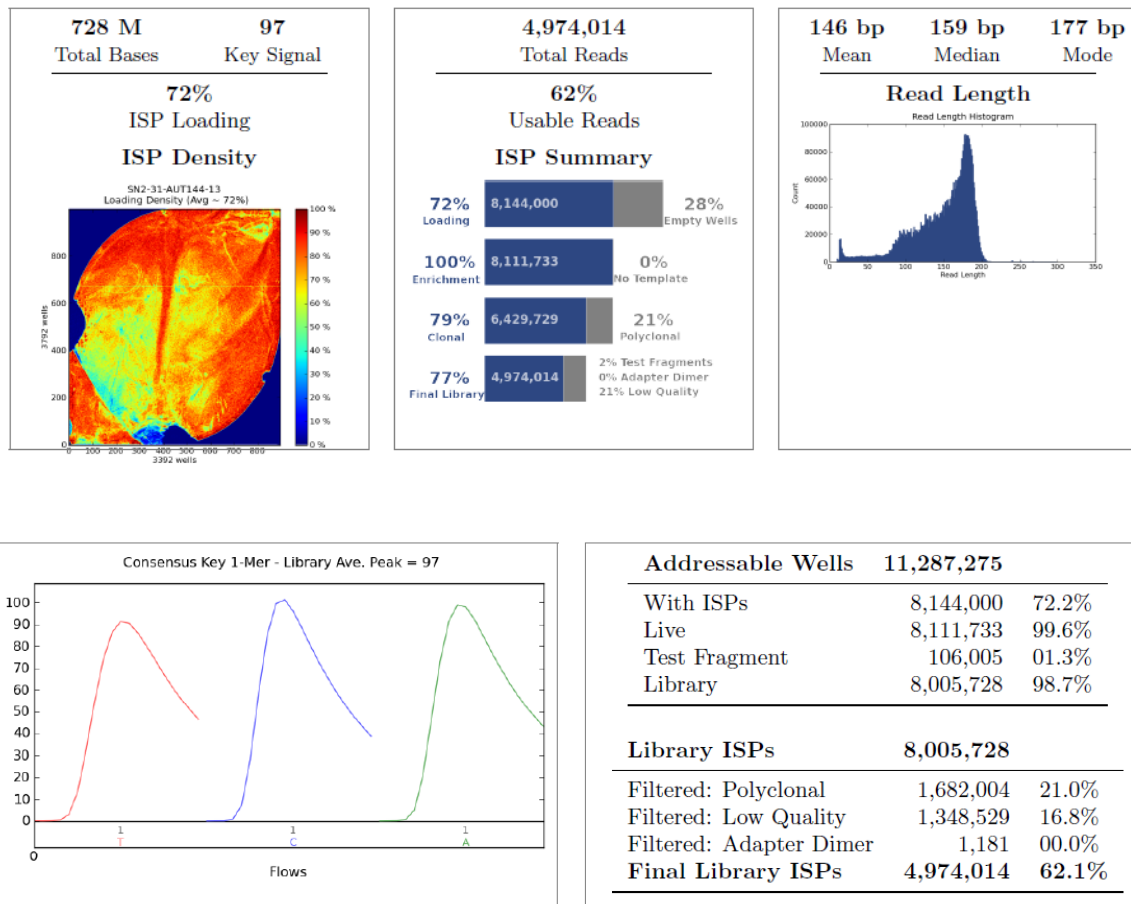


Fig.38 Run Summary della corsa di sequenziamento del campione 2

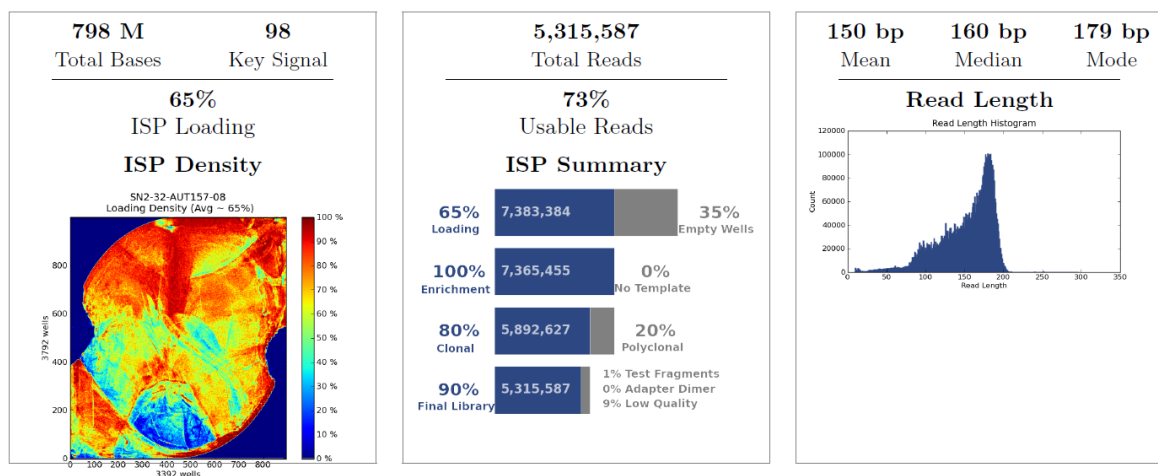
Dal *Run Summary* (Fig.38), nel primo riquadro è possibile vedere il totale di basi sequenziate (728 Mb), la percentuale di caricamento dell'*Ion Chip* espressa come densità di ISPs (72%) e la rappresentazione grafica del caricamento del chip, in cui le zone rosse rappresentano aree ad alta densità di ISPs.

Nel secondo riquadro sono riportati i valori relativi alle reads. Il totale di reads è 4.974.014, di queste solo il 62% è utilizzabile. Infatti, circa 8 milioni di reads

sono state caricate correttamente, ma alcune sono state scartate poiché risultavano essere policlonali (21%). Per *reads* policlonale si intende una *read* sequenziata in una ISP in cui non è presente un singolo tipo di amplicone, ma più ampliconi diversi. Delle reads rimaste (circa 5 milioni) è necessario eliminare tutte quelle a bassa qualità e i dimeri degli adattatori, utilizzati per creare la libreria. Nel terzo riquadro è riportato un istogramma che raffigura gli ampliconi con le relative lunghezze, per i quali sono riportati i valori della media, mediana e moda. Il valore della media ottenuto è 146 bp, mentre la moda è 177 bp: in linea con le aspettative. Successivamente, è riportato il grafico di incorporazione che mostra le letture medie del segnale per i flussi delle basi T, C e A nella libreria. Nella tabella a lato, sono invece riportati i dettagli di caricamento del chip e delle librerie adese alle ISPs.

Il report della corsa, riguardante il campione 3 è riportato in *Fig.39*

Run Summary



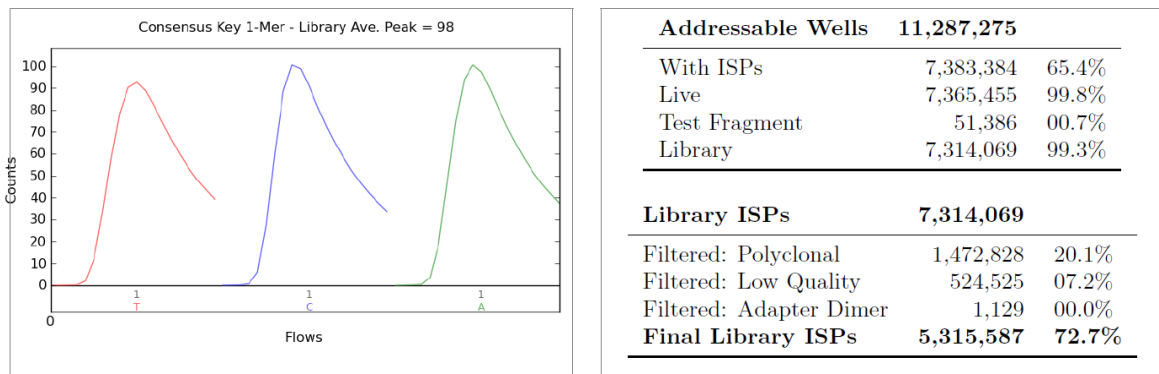


Fig.39 Run Summary della corsa di sequenziamento del campione 3

Allo stesso modo, dal *Run Summary* (Fig.39), nel primo riquadro è possibile vedere il totale di basi sequenziate (798 Mb), la percentuale di caricamento dell'*Ion Chip* espressa come densità di ISPs (73%) e la rappresentazione grafica del caricamento del chip, in cui le zone rosse rappresentano aree ad alta densità di ISPs. Nel secondo riquadro sono riportati i valori relativi alle reads. Il totale di reads è 5.315.587, di queste il 73% è utilizzabile. Infatti, circa 7 milioni di reads sono state caricate correttamente, ma alcune sono state scartate poiché risultavano essere policlonali (20%). Nel terzo riquadro è riportato un istogramma che raffigura gli ampliconi con le relative lunghezze, per i quali sono riportati i valori della media, mediana e moda. Il valore della media ottenuto è 150 bp, mentre la moda è 179 bp: in linea con le aspettative. Successivamente, è riportato il grafico di incorporazione che mostra le letture medie del segnale per i flussi delle basi T, C e A nella libreria. Nella tabella a

lato, sono invece riportati i dettagli di caricamento del chip e delle librerie adese alle ISPs.

Inoltre, sono riportati i valori di Alignment Quality (AQ) di entrambi i campioni ed elencati numero totali di basi, lunghezza media di absi e copertura media (*Tab.27, Tab.28*)

Alignment Quality			
	AQ17	AQ20	Perfect
Total Number of Bases [Mbp]	688 M	648 M	561 M
Mean Length [bp]	147	143	128
Longest Alignment [bp]	331	331	327
Mean Coverage Depth	0.2	0.2	0.2

Tab.27 Valori di AQ campione 2

Alignment Quality			
	AQ17	AQ20	Perfect
Total Number of Bases [Mbp]	768 M	730 M	639 M
Mean Length [bp]	148	143	129
Longest Alignment [bp]	338	338	321
Mean Coverage Depth	0.2	0.2	0.2

Tab. 28 Valori di AQ campione 3

Successivamente, per l'interpretazione dei risultati ottenuti con il sequenziamento delle librerie, saranno necessari algoritmi bioinformatici, che richiedono personale specializzato per via della loro complessità.

In seguito, sono riportati i risultati ottenuti tramite due *plugin* fondamentali per l'analisi bioinformatica, i quali consentono un'analisi dettagliata degli ampliconi e permettono l'identificazione nei due campioni, di nucleotidi diversi

rispetto al campione di riferimento. Questi plugin sono rispettivamente Coverage Analysis e VariantCaller.

- Coverage Analysis

Il coverage, indica il numero medio di reads che “coprono” una determinata regione target di riferimento e può essere espresso in termini di percentuale o di copertura media. Il coverage necessario alla riuscita dell’analisi è influenzato da numerosi fattori quali: lunghezza delle reads, dimensione del genoma di riferimento, applicazione specifica di interesse, livelli di espressione del gene e complessità delle regioni target. Nello specifico, sono riportati quattro valori: *mapped reads*, *percent reads on target*, *mean depth* e *uniformity*. Per *mapped reads* si intendono tutte quelle basi che mappano all’interno del genoma di riferimento (hg19). Il valore *on target* indica il numero di *reads* che, tra le *mapped reads*, ricadono all’interno del *target* scelto. Dopodiché viene indicato il *mean depth*, che rappresenta il *coverage* medio dei tre ampliconi ottenuti per ciascun campione. Infine, l’*uniformity* indica che il *target* è stato sequenziato in maniera uniforme.

Di seguito, sono riportati i valori di coverage (*Tab. 29*) con la rispettiva raffigurazione grafica (*Fig.40*) sia per il campione 2 (a) che per il campione 3

(b). Questi ultimi risultano lineari e questo significa che gli ampliconi sono stati amplificati uniformemente.

	Number of mapped reads	Percent reads on target	Average base coverage depth	Uniformity of base coverage
Campione 2	4912419	96,8%	448,8%	93,74%
Campione 3	5299153	98,34%	499,7%	92,08%

Tab 29: valori di coverage

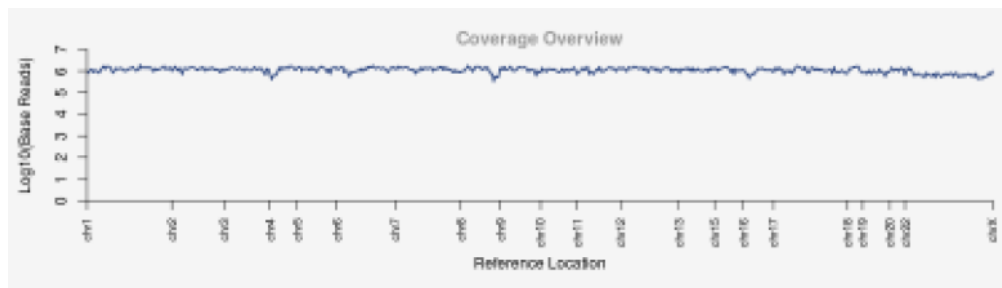


Fig.40(a) Valori e profili di coverage campione 2.

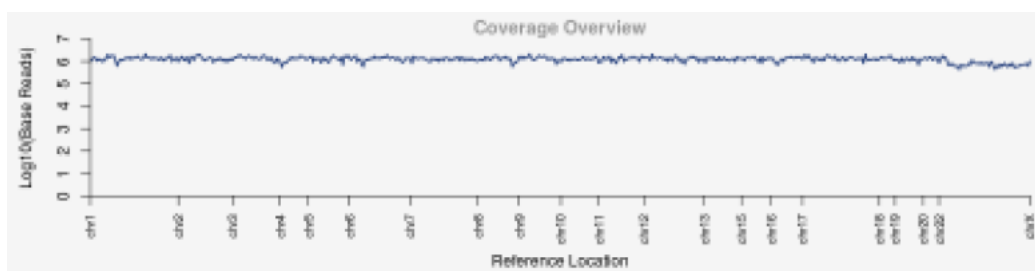


Fig.40(b) Valori e profili di coverage campione 3.

- VariantCaller

Il *Variant Caller* è un plugin per la chiamata delle varianti. Esso considera informazioni come la qualità dell'allineamento della read, valore di coverage per una base, rapporto dei vari nucleotidi rispetto al totale di basi allineate per una posizione e utilizza questi dati con dei modelli probabilistici per stimare le differenze tra sequenze ricostruite e di riferimento. Nel caso in cui alcuni nucleotidi differiscano da quelli presenti nel genoma di riferimento, per le stesse posizioni, il programma può decidere di riconoscere la presenza di tre categorie: varianti a singolo nucleotide (SNP), inserzioni o delezioni (INDEL) e varianti strutturali (Feuk L. et al., 2006).

I parametri utilizzati per il plugin Variant caller sono quelli riferibili alla configurazione di default: Genetic-PGM-Germ Line-Low Stringency unitamente al bed file contenenti posizioni cromosomiche di ogni singolo amplicone valutato nel Inherited disease panel.

6.4.1 Risultati del Sequenziamento NGS

Le corse di NGS sono state sottoposte ad una prima analisi fatta tramite il plugin Variant caller in cui le sequenze sono state allineate al genoma di riferimento (hg19). Successivamente si è proceduto ad un'analisi secondaria

tramite il software Integrative Genomic Viewer (IGV), con lettura delle reads a 30x, per confermare le varianti identificate dal torrent. Il software permette di mappare le sequenze ottenute dal sequenziamento con la sequenza di riferimento (nel nostro caso hg19) e fare la tipizzazione di ogni campione per ogni locus scelto. IGV necessita inoltre di un file BED, contenente i riferimenti delle regioni cromosomiche analizzate (target file) e la lista degli SNPs tipizzati con le relative localizzazioni cromosomiche (file vcf, formato di una variante chiamata memorizzata dal software); file BAM, formato binario di SAM (quest'ultima, immagazzina un numero elevato di allineamenti di sequenze di nucleotidi).

Per questo studio, i 5 geni presi in esame (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, SCN1B, RYR2) per l'analisi genomica di soggetti deceduti in seguito a SUDEP sono geni con pattern di espressione cardiaca, ampiamente descritti in letteratura essere legati alla SUDEP (Tu et al.,2011; Aurlien et al., 2009; Johnson et al., 2010).

- *CAMPIONE 2*

Per quanto riguarda il campione 2 i risultati della genotipizzazione sono riportati in *Tab.30*

Gene	Chrom	Position	Ref	Alt	SNP ID	Variant Type	ClinVar	Clinvar protein change	Allele frequency gnomAD v2.1.1 database
KCNQ1	chr11	2797237	G	A	rs1057128	Variante sinonima (SVN)	B	NM_000218.3(KCNQ1):c.1638G>A (p.Ser546_Gln547=)	0.2018
	chr11	2797320	A	G	rs163150	Variante intronica	B	NM_000218.3(KCNQ1):c.1685+36A>G	0.6682
	chr11	2869188	C	T	rs11601907	Variante intronica	B	NM_000218.3(KCNQ1):c.1986C>T (p.Tyr662_Glu663=)	0.1748
KCNH2	chr7	150648198	A	G	rs1137617	Variante sinonima (SVN)	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1956T>C (p.Tyr652_Ala653=)	0.6671
	chr7	150648789	T	C	rs1805121	Variante sinonima (SVN)	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1692A>G (p.Leu564_Ala565=)	0.4842
	chr7	150649531	G	A	rs1805120	Variante sinonima (SVN)	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1539C>T (p.Phe513_Gly514=)	0.2978
	chr7	150649603	G	A	rs740952	Variante sinonima (SVN)	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1467C>T (p.Ile489_Ala490=)	0.2988
	chr7	150652419	T	C	rs876088	Variante intronica	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1128+1960A>G	0.1326
	chr7	150654623	-	G	rs869268904	Variante intronica		not reported in ClinVar	not reported
SCN5A	chr3	38592406	A	G	rs1805126	Variante sinonima (SVN)	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.5454T>C (p.Asp1818=)	0.3934
	chr3	38598669	A	G	rs41312393	Variante intronica		not reported in ClinVar	0.09845
	chr3	38622467	T	C	rs7430407	Variante sinonima (SVN)	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.3183A>G (p.Glu1061=)	0.9127
	chr3	38645420	T	C	rs1805124	Variante missenso	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.1673A>G (p.His558Arg)	0.2231
	chr3	38647642	G	T	rs41312433	Variante intronica	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.1141-3C>A	
	chr3	38674712	T	C	rs6599230	Variante sinonima (SVN)	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.87A>G (p.Ala29=)	0.7691
SCN1B	chr19	35521779	G	T	rs72556351	Variante intronica	B	NM_001037.5(SCN1B):c.40+15G>T	0.1918
	chr19	35524824	T	C	rs55742440	Variante intronica	B	NM_001037.5(SCN1B):c.448+181T>C	0,3766
RYR2	chr1	237519165	G	T	rs10925382	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.274-100G>T	0.2001

Gene	Chrom	Position	Ref	Alt	SNP ID	Variante Type	ClinVar	Clinvar protein change	Allele frequency gnomAD v2.1.1 database
	chr1	237540615	A	C	rs10925391	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.464-8A>C	0,2966
	chr1	237551376	T	A	rs10754602	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.677-11T>A	0.5707
	chr1	237617757	C	T	rs3765097	Variante sinonima (SVN)	B	NM_001035.3(RYR2):c.1359C>T (p.Ser453=)	0.5758
	chr1	237670140	A	G	rs2618702	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.2718+26A>G	0.6729
	chr1	237711644	T	C	rs2618661	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.2907-87T>C	0.8539
	chr1	237711797	A	G	rs2253273	Variante sinonima (SVN)	B	NM_001035.3(RYR2):c.2973A>G (p.Ser991=)	0.9240
	chr1	237730124	A	G	rs2805390	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.3423+49A>G	0.9564
	chr1	237732395	G	A	rs2805396	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.3424-50G>A	0.6377
	chr1	237765470	A	T	rs791541	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.4683+59A>T	0.3673
	chr1	237788844	T	C	rs571092	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.6023-117T>C	0.7806
	chr1	237788862	T	C	rs571026	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.6023-99T>C	0.7802
	chr1	237801770	T	C	rs707189	Variante sinonima (SVN)	B	NM_001035.3(RYR2):c.6906T>C (p.Leu2302=)	0.9877
	chr1	237817784	A	G	rs669375	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.7965+70A>G	0.2654
	chr1	237824332	G	A	rs471647	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.8436+85G>A	0.9976
	chr1	237831103	C	A	rs477245	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.8515-80C>A	0,9591
	chr1	237841390	A	G	rs34967813	Variante missenso	B	NM_001035.3(RYR2):c.8873A>G (p.Gln2958Arg)	0,2139
	chr1	237863718	T	G	rs2797436	Variante sinonima (SVN)	B	NM_001035.3(RYR2):c.9318T>G (p.Ser3106=)	0,9904
	chr1	237881770	C	T	rs2797441	Variante sinonima (SVN)	B	NM_001035.3(RYR2):c.10503C>T (p.Thr3501=)	0,9874
	chr1	237890437	C	T	rs2685301	Variante sinonima (SVN)	B	NM_001035.3(RYR2):c.10776C>T (p.Ser3592=)	0,9875
	chr1	237893674	C	T	rs2797445	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.10935+18C>T	0,995
	chr1	237905571	T	C	rs3753630	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.11092-25T>C	0,0694
	chr1	237957146	G	A	rs790902	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13783-21G>A	0,705
	chr1	237957161	A	G	rs790901	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13783-6A>G	0,7316
	chr1	237957309	A	C	rs790900	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13913+12A>C	0,7263
	chr1	237965094	G	T	rs2794820	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.14091-62G>T	0,4227
	chr1	237965131	G	A	rs9428384	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.14091-25G>A	0,4077
	chr1	237969638	A	G	rs790879	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.14298+55A>G	0,2246

Tab. 30 Risultati sequenziamento NGS per le varianti identificate nel campione2. Nella tabella sono riportati per ogni gene, la posizione di ogni variante riscontrata, allele di riferimento e quello alternato, rsID, il tipo di variazione, l'interpretazione data dal database ClinVar con relativa codifica ed in ultimo la frequenza dell'allele alternato ricavato dal database GnomAD V2.1.1. In grassetto evidenziate le varianti missenso presenti nel campione in esame. B: benigna; LB: probabile benigna

Per determinare rs di ciascuna variante riscontrata nei due campioni, è stato utilizzato il tool Variation Viewer (NCBI resources). Successivamente sono state ricercate sul database Clinvar. In ultimo è stato utilizzato il database GnomAD v2 1.1 per rilevare la frequenza allelica alternata in genotipi della popolazione. Per il campione 2, tutti i geni sono stati analizzati rigorosamente, e la maggior parte di questi presentano sostituzioni a singola base debitamente confermati con i vari tools come varianti benigne/probabilmente benigne. Alcuni presentano mutazioni puntiformi, tipologia sinonima, ovvero sostituzioni che verificandosi a livello della terza base di una tripletta, non determinano variazione di sequenza amminoacidica della proteina interessata.

Un esempio, è data dalla mutazione sinonima presente nel gene RYR2, posizione 237617757, sul cromosoma 1: ***NM_001035.3(RYR2):c.1359C>T (p.Ser453=)***:

È stata confermata, tramite l'utilizzo di Clinvar e Intervar, una mutazione sinonima con cambiamento di base da C in T il che significa che non comporta

cambiamento di amminoacido e di conseguenza non cambia neppure la funzione, per cui andrà a codificare sempre per l'amminoacido Serina.

Mentre, molte delle mutazioni responsabili di un alterato processo di splicing si verificano nelle brevi sequenze di ESE (Exon Splicing Enhancer) e di alcuni esoni, fondamentali per un corretto splicing. Quando si verificano mutazioni in queste sequenze causano l'inclusione di introni nell'mRNA maturo, il quale se venisse codificato, porterebbe a proteine anomale (sites.google.com).

Infatti, nella *tabella 30* sono riportate molte varianti introniche, mutazioni silenti che possono comportare un cambiamento nella codifica di proteine ma, tuttavia, risultate benigne.

Nel campione due, sono state evidenziate due varianti missenso:

-la prima nel gene SCN5A, posizione 38645420, cromosoma 3 riportata nel database Clinvar (*Fig.41 a,b*): ***NM_000335.5(SCN5A):c.1673A>G (p.His558Arg), SNP ID: rs1805124;***

-la seconda presente nel gene RYR2, posizione 237841390, cromosoma 1, anche quest'ultima riportata su ClinVar (*Fig.42*): ***NM_001035.3(RYR2):c.8873A>G (p.Gln2958Arg), SNP ID:rs34967813.***

<input type="checkbox"/> NM_000335.5(SCN5A):c.1673A>G (p.H558R) GRCh37: Chr3:38645420 GRCh38: Chr3:38603929	SCN5A	H558R	Cardiac arrhythmia, Brugada syndrome 1, Atrial fibrillation, familial, 10, SUDDEN INFANT DEATH SYNDROME, Sick sinus syndrome 1, Long QT syndrome 3, Ventricular fibrillation, paroxysmal familial, type 1, Brugada syndrome 1, Dilated cardiomyopathy 1E, Progressive familial heart block, type 1A, not specified Cardiovascular phenotype, not provided, Progressive familial heart block, type 1A, Sick sinus syndrome 1, Long QT syndrome 3, Brugada syndrome, Ventricular fibrillation, paroxysmal familial, type 1, Congenital long QT syndrome, Dilated cardiomyopathy 1E, see more	Benign/Likely benign (Apr 28, 2022)	criteria provided, multiple submitters, no conflicts
--	-------	-------	--	-------------------------------------	--

a)

Conditions Gene(s)	Aggregate interpretations per condition					
	Interpreted condition	Interpretation	Number of submissions	Review status	Last evaluated	Variation/condition record
	not specified	Benign	9	criteria provided, multiple submitters, no conflicts	Mar 5, 2020	RCV000041604.19
	not provided	Benign	5	criteria provided, multiple submitters, no conflicts	Feb 8, 2022	RCV000058440.15
	Brugada syndrome 1	Benign/Likely benign	3	criteria provided, multiple submitters, no conflicts	May 28, 2019	RCV000987225.5
	Cardiovascular phenotype	Benign	1	criteria provided, single submitter	Mar 16, 2015	RCV000251327.3
	Long QT syndrome 3	Likely benign	1	criteria provided, single submitter	Apr 27, 2017	RCV000300603.4
	Sick sinus syndrome 1	Likely benign	1	criteria provided, single submitter	Apr 27, 2017	RCV000304709.4
	Brugada syndrome	Benign	1	criteria provided, single submitter	Dec 8, 2020	RCV000335618.5
	Congenital long QT syndrome	Likely benign	1	criteria provided, single submitter	Jun 14, 2016	RCV000339196.4
	Dilated cardiomyopathy	Likely benign	1	criteria provided,	Apr 27, 2017	RCV000361696.4

b)

Fig.41 a) e b) Analisi della variante mediante CLinVar del gene SCN5A.

Submitted interpretations and evidence

Interpretation (Last evaluated)	Review status (Assertion criteria)	Condition (Inheritance)	Submitter	More information
Benign (Jun 24, 2013)	criteria provided, single submitter (Ng et al. (Circ Cardiovasc Genet. 2013)) Method: research	not specified Affected status: unknown Allele origin: unknown	Biesecker Lab/Clinical Genomics Section, National Institutes of Health Study: ClinSeq Accession: SCV000050831.1 First in ClinVar: Jun 04, 2015 Last updated: Jun 04, 2015 Comments (2): The study set was not selected for affection status in relation to any cancer. Pathogenicity categories were based on literature curation. See PubMed ID:3961362 for ... (more) Medical sequencing	
Benign (-)	criteria provided, single submitter (ACMG Guidelines, 2015) Method: clinical testing	NOT SPECIFIED Affected status: unknown Allele origin: germline	PreventionGenetics, PreventionGenetics Accession: SCV000306079.1 First in ClinVar: Oct 02, 2016 Last updated: Oct 02, 2016	
Benign (Mar 12, 2013)	criteria provided, single submitter (EGL Classification Definitions 2015) Method: clinical testing	not specified Affected status: unknown Allele origin: germline	Eurofins NTD LLC (GA) Accession: SCV00011259.8 First in ClinVar: Jan 17, 2014 Last updated: Oct 02, 2016	Other databases http://www.egl-eurofins.com/emvc...
Benign (Mar 15, 2018)	criteria provided, single submitter (ACMG Guidelines, 2015) Method: clinical testing	Cardiomyopathy Affected status: unknown Allele origin: germline	Color Diagnostics, LLC DBA Color Health Accession: SCV000910525.1 First in ClinVar: May 20, 2019 Last updated: May 20, 2019	
Benign (Nov 30, 2021)	criteria provided, single submitter	not provided Affected status: unknown Allele origin: germline	ARUP Laboratories, Molecular Genetics and Genomics, ARUP Laboratories	

Fig. 42 Analisi della variante mediante CLinVar del gene RYR2.

Le varianti missenso si verificano quando viene sostituita una base azotata che comporta un cambiamento nella sequenza amminoacidica. Per questo motivo, per determinare la benignità o patogenicità di quest'ultime si è proceduto all'analisi computazionale in silico tramite i tools bioinformatici VarSome (Fig. 43 a,b) e InterVar (Fig.44), secondo le linee guida dell'ACMG.

L'analisi condotta su Varsome per la variante *NM_000335.5(SCN5A)*, in cui si identifica un cambiamento amminoacido da Istidina ad arginina nel codone 558, l'analisi in silico ha predetto un effetto benigno secondo i seguenti criteri:

chr3-38645420-T-C (SCNSA.p.H5588)
1 user classified this variant as Benign.

General Information SNV
SCNSA(NM_000335.5):c.1673A>G (p.His558Arg)

PharmGKB No data available

ACMG Classification Benign
-24 points • P: 248

Frequencies exomes: f = 0.22 (cov:82.3) genomes: f = 0.245 (cov:32.6)

Pathogenicity Scores 13

Beacon Network

Genes SCNSA

Transcripts NM_000335.5 - missense
MANE Select

ClinVar Likely Benign
★ ★ ★ ★
Submissions: 26

Mitochondria No data available

ClinGen No data available

Protein Viewer No data available

Community Contributions Classifications: 1
Comments: 0

Region Browser

LOVD No data available

OMM No data available

GWAS No data available

ACMG Classification - Educational use only version: 11.6.1

Benign -24 points = 0 P: 248

NM_000335.5, MANE Select, protein length 2016, gene SCN5A, missense variant

Sample Information Findings

Rule	Explanation
BA1 Stand Alone	GnomAD exomes allele frequency = 0.22 is greater than 0.05 threshold, good gnomAD exomes coverage = 82.3.
BP6 Very Strong	ClinVar classifies this variant as Benign, 2 stars (multiple consistent, reviewed Oct '22, 26 submissions), citing 11 articles (20129283, 19841300, 19083750, 18426444, 18362431 and 6 more). A VarSome user has classified this variant as Benign, citing 15851227.
BS3 Strong	UniProt Variants classifies this variant as Benign, backed by functional studies (requires user validation) mentioned in 3 articles (14500339, 12569159 and 11997281), and also citing 7 articles (21109022, 20129283, 18378609, 18368697, 15489334 and 2 more).
BP4 Strong	MetaRNN = 0.00258 is less than 0.00692 => very strong benign.

Fig. 43 a) e b) in alto e in basso: Viene descritta l'analisi della patogenicità effettuata mediante VarSome

- BA1: la frequenza allelica è >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project o Exome Aggregation Consortium. La frequenza allelica di GnomAD=0.22 ed è maggiore della soglia di 0,05, con buona copertura degli esomi di GnomAD=82.3;
- BP6: nei database ClinVar e VarSome è stata classificata variante benigna e sono stati citati diversi articoli al riguardo;
- BS3: studi funzionali in vitro o in vivo non mostrano alcun effetto dannoso sulla funzione proteica o sullo splicing, come confermato da UniProt Variants, supportata da numerosi studi;
- BP4: prove computazionali non suggeriscono alcun impatto sul gene o sul prodotto genico: MetaRNN=0,00258 inferiore a 0,000692.

Il risultato è stato confermato anche dal secondo tool di predizione utilizzato, Intervar, come è possibile vedere dalla *figura 44* riporta qui di seguito.

Chromosome	Position	Reference	Alternative	Gene	Classification
3	38645420	T	C	SCN5A	Benign

gnomAD	OrphaNet
NM_000335	
p.H558R	
NM_001099404	
p.H558R	
NM_001099405	334 186282
p.H558R	101016 768
NM_001160160	228140 154
p.H558R	130 871
NM_001160161	
p.H558R	
NM_198056	
p.H558R	

Fig. 44 Mostra la valutazione della variante con l'uso di InterVar secondo le linee guida ACMG e sono confermati i criteri descritti prima: *PM1*: localizzato in hot spot mutazionale, in questo caso canale sodio Na^+ voltaggio-dipendente; *BP1*: variante missenso in un gene per il quale è noto che le varianti principalmente troncanti causano la malattia; *BS1*: la frequenza allelica è maggiore del previsto per la malattia; *BS2*: osservata in un individuo adulto sano per una malattia recessiva (omozigote), dominante (eterozigote) con freq allelica: 0,2453

La classificazione come variante benigna è confermata anche dai lavori pubblicati da Bagnall et al.,2017; Coll et al., 2019; Barranco et al., 2020, rendendo questa variante nota in letteratura.

Allo stesso modo anche per la variante presente nel gene RYR2, in cui si evidenzia un cambiamento amminoacidico da glicina a argina nel codone 2958, le analisi in silico mediante i tool bioinformatici Varsome (Fig. 45 a e b) e InterVar (Fig.46) hanno identificato una variante con effetto benigno, secondo gli stessi criteri descritti in precedenza.

The screenshot displays the InterVar interface for the variant chr1-237841390-A-G (RYR2:p.Q2958R). The central 'ACMG Classification' panel shows a 'Benign' classification with a score of -20 points (0 P, 20 B). Other panels include General Information (SNV RYR2(NM_001035.3):c.8873A>G (p.Gln2958Arg)), Genes (RYR2), Transcripts (NM_001035.3 - missense, MANE Select), Frequencies (exomes: f = 0.214 (cov:38.5), genomes: f = 0.212 (cov:32.9)), Pathogenicity Scores (1, 9, 5), ClinVar (Likely Benign, Submissions: 16), LOVD (No data available), OMIM (No data available), GWAS (Smoking initiation (ever regular vs ne...), 8e-7), and Conservation Scores (phyloP100: 7.169). The bottom of the interface shows the final classification: 'Benign -20 points = 0 P - 20 B' and a search bar containing 'NM_001035.3, MANE Select, protein length 4968, gene RYR2, missense variant'.

a)

Automated criteria Show summary view Enable clinical evidence

Rule	Explanation
BA1 <input checked="" type="checkbox"/> Stand Alone	GnomAD exomes allele frequency = 0.214 is greater than 0.05 threshold, good gnomAD exomes coverage = 38.5.
BP6 <input checked="" type="checkbox"/> Very Strong	ClinVar classifies this variant as Benign, 2 stars (multiple consistent, reviewed Oct '22, 16 submissions). UniProt Variants classifies this variant as Benign, citing 11157710 .
BP4 <input checked="" type="checkbox"/> Strong	MetaRNN = 0.00159 is less than 0.00692 ⇒ very strong benign.

b)

Fig.45 a) e b): Viene descritta l'analisi della patogenicità effettuata mediante VarSome (BA1:frequenza allelica=0.214, maggiore della soglia di 0,05 con buona copertura degli esomi: 38,5; BP6:ClinVar e Uniprot variants confermano la variante come benigna; BP4: prove computazionali non rilevano alcun impatto sul gene o prodotto genico.

Warning: All listed results Users are advised to examine detailed evidence

Database version:hg19_update
You searched by chromosomal coordinates and Alleles
build:hg19_update Chr:1 Pos:237841390 Ref:A Alt:G

Show/hide columns Restore columns Copy to clipboard Download

Chr	Position	Ref	Alt	Gene (refGene)	Interval	Intervar
1	237841390	A	G	RYR2		Benign (Details)

Showing 1 to 1 of 1 entries
(Move mouse to popover or click the button of "Show/hide columns" for more options)

List of evidence in 28 criteria (., means absent)

PM1: Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation. ,., BA1: Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium. Allele Frequencies in gnomAD: 0.2111 ;in 1000 Genome: . ;in ESP: 0.2249 BS1: Allele frequency is greater than expected for disorder. Allele Frequencies in gnomAD: 0.2111 ;in 1000 Genome: . ;in ESP: 0.2249 BS2: Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age. Allele Frequencies in gnomAD: 0.2111 ;in 1000 Genome: . ;in ESP: 0.2249 BP6: Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation. Clinvar show: Benign/Likely_benign

Search:

Transcripts (Ref)	MAF in gnomAD_ALL(genome)	Disease in OrphaNet
NM_001035 p.Q2958R	0.2111 (show in 7 POPs)	3286 217656

Previous 1 Next

Fig. 46 Mostra la valutazione della variante con l'uso di InterVar secondo le linee guida ACMG e sono confermati i criteri descritti prima: PM1: localizzato in hot-spot mutazionale; BS1: frequenza allelica è maggiore del previsto: in gnomAD:0,211; BS2: osservata in individuo adulto sano per malattia recessiva (omozigote), dominante (eterozigote) con frequenza allelica in gnomAD:0,211

Si può vedere come più studi, utilizzando parametri di classificazione differenti, hanno classificato nella quasi totalità la variante come benigna anche se correlata alla causa di morte ed improvvisa epilettica.

- *CAMPIONE 3*

Allo stesso modo, anche per il campione 3 è stata condotta la stessa tipologia di analisi. Tutti i geni analizzati sono riportati in *Tab.31*.

Gene	Chrom	Position	Ref	Alt	SNP ID	Variant Type	ClinVar	Clinvar protein change	Allele frequency gnomAD v2.1.1 database
KCNH2	chr7	150644394	C	T	rs3815459	Variante intronica		not reported su Clinvar	0,3263
	chr7	150647969	C	T	rs2072413	Variante intronica	B	NM_000238.4(KCNH2):c.2145+40G>A	0.2398
	chr7	150647970	C	G	rs2072412	Variante intronica	B	NM_000238.4(KCNH2):c.2145+39G>C	0.2401
	chr7	150648198	A	G	rs1137617	Variante sinonima	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1956T>C (p.Tyr652_Ala653=)	0.6671
	chr7	150648789	T	C	rs1805121	Variante sinonima	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1692A>G (p.Leu564_Ala565=)	0.4842
	chr7	150649531	G	A	rs1805120	Variante sinonima	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1539C>T (p.Phe513_Gly514=)	0.2978
	chr7	150649603	G	A	rs740952	Variante sinonima	B	NM_000238.4(KCNH2):c.1467C>T (p.Ile489_Ala490=)	0.2988
	chr7	150654623	-	G	rs869268904	Variante intronica		not reported su Clinvar	not reported
SCN5A	chr3	38592406	A	G	rs1805126	Variante sinonima	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.5454T>C (p.Asp1818=)	0.3934
	chr3	38622467	T	C	rs7430407	Variante sinonima	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.3183A>G (p.Glu1061=)	0.9127
	chr3	38645420	T	C	rs1805124	Variante missenso	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.1673A>G (p.His558Arg)	0.2231
	chr3	38647642	G	T	rs41312433	Variante intronica	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.1141-3C>A	0.1720
	chr3	38674712	T	C	rs6599230	Variante sinonima	B/LB	NM_000335.5(SCN5A):c.87A>G (p.Ala29=)	0.7691
SCN1B	chr19	35524824	T	C	rs55742440	Variante intronica	B	NM_001037.5(SCN1B):c.448+181T>C	0,3766
RYR2	chr1	237551376	T	A	rs10754602	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.677-11T>A	0,5707
	chr1	237586384	T	C	rs16835237	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.849-8T>C	0.1415
	chr1	237617757	C	T	rs3765097	Variante sinonima	B	NM_001035.3(RYR2):c.1359C>T (p.Ser453=)	0.5758

chr1	237670140	A	G	rs2618702	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.2718+26A>G	0.6729
chr1	237711644	T	C	rs2618661	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.2907-87T>C	0.8539
chr1	237711797	A	G	rs2253273	Variante sinonima	B	NM_001035.3(RYR2):c.2973A>G (p.Ser991=)	0.9240
chr1	237730124	A	G	rs2805390	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.3423+49A>G	0.9564
chr1	237732395	G	A	rs2805396	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.3424-50G>A	0.6377
chr1	237765470	A	T	rs791541	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.4683+59A>T	0.3673
chr1	237788826	C	G	rs6659362	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.6023-135C>G	0.2458
chr1	237788844	T	C	rs571092	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.6023-117T>C	0.7806
chr1	237788862	T	C	rs571026	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.6023-99T>C	0.7802
chr1	237801770	T	C	rs707189	Variante sinonima	B	NM_001035.3(RYR2):c.6906T>C (p.Leu2302=)	0.9877
chr1	237824332	G	A	rs471647	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.8436+85G>A	0.9976
chr1	237831103	C	A	rs477245	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.8515-80C>A	0.9591
chr1	237841390	A	G	rs34967813	Variante missenso	B/LB	NM_001035.3(RYR2):c.8873A>G (p.Gln2958Arg)	0.2139
chr1	237863718	T	G	rs2797436	Variante sinonima	B/LB	NM_001035.3(RYR2):c.9318T>G (p.Ser3106=)	0.9904
chr1	237881770	C	T	rs2797441	Variante sinonima	B	NM_001035.3(RYR2):c.10503C>T (p.Thr3501=)	0.9874
chr1	237890437	C	T	rs2685301	Variante sinonima	B	NM_001035.3(RYR2):c.10776C>T (p.Ser3592=)	0.9875
chr1	237893674	C	T	rs2797445	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.10935+18C>T	0.9950
chr1	237905571	T	C	rs3753630	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.11092-25T>C	0,0694
chr1	237923053	C	T	rs2253831	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.11326-23C>T	0.7152
chr1	237946964	T	C	rs790889	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.11963-11T>C	0.3795
chr1	237951451	A	G	rs2256242	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13476+16A>G	0.5635
chr1	237957146	G	A	rs790902	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13783-21G>A	0.7050
chr1	237957161	A	G	rs790901	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13783-6A>G	0.7316
chr1	237957309	A	C	rs790900	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.13913+12A>C	0.7263
chr1	237965094	G	T	rs2794820	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.14091-62G>T	0.4227
chr1	237965131	G	A	rs9428384	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.14091-25G>A	0.4077
chr1	237969638	A	G	rs790879	Variante intronica	B	NM_001035.3(RYR2):c.14298+55A>G	0.2246

Tab.31 Risultati sequenziamento NGS per le varianti identificate nel campione 3. Nella tabella sono riportati per ogni gene, la posizione di ogni variante riscontrata, allele di riferimento e quello alternato, rsID, il tipo di variazione, l'interpretazione data dal database ClinVar con relativa codifica ed in ultimo la frequenza dell'allele alternato ricavato dal database GnomAD V2.1.1. In grassetto evidenziate le varianti missenso presenti nel campione in esame; B: benigna; LB: probabile benigna

Tutti i geni sono stati ampiamente analizzati e la maggior parte di questi presentano sostituzioni a singola base (SNV), debitamente confermati come benigni. Nel dettaglio sono presenti:

-13 mutazioni puntiformi, tipologia sinonima;

-29 variazioni introniche;

-2 mutazioni missenso.

Tra queste, suscitano nuovamente il nostro interesse le due mutazioni missenso, riconducibili ai geni SCN5a con mutazione *NM_000335.5(SCN5A):c.1673A>G (p.His558Arg)* con frequenza allelica pari a 0,2231 e RYR2 con mutazione *NM_001035.3(RYR2):c.8873A>G (p.Gln2958Arg)* con frequenza allelica pari a 0.2139.

Questi dati, in associazione con i criteri ACMG descritti precedentemente, confermano che le varianti riscontrate sono benigne dal momento che presentano frequenze alleliche nella popolazione maggiore dello 0,05%.

Da notare che tra la maggior parte delle varianti sono state riscontrate sia nel campione 2 che nel campione 3.

Capitolo 7

DISCUSSIONE

Era l'anno 1997 quando gli studiosi Annegers e Nashef iniziarono a definire la morte improvvisa e inaspettata nell'epilessia e nonostante i diversi progressi entusiasmanti, la nostra comprensione dei meccanismi sottostanti rimane ancora limitata (Ryvlin et al., 2013). Si ritiene che i casi di Sudep non siano riconosciuti ma sottostimati, in quanto la difficoltà principale è che il 90% dei casi non sono testimoniati e quindi le informazioni riguardanti gli eventi che hanno condotto alla morte non sono note. Sicuramente le uniche fonti di informazione sono la storia clinica del paziente e gli esiti della valutazione post-mortem. Sebbene questa poteva essere l'unica via da intraprendere, anche i dati della valutazione post-mortem sottostimano fortemente la sudep nell'epilessia, attribuendo circa l'1,5 % delle morti improvvise a complicanze convulsive (Chen et al., 2018; Atherton et al., 2017). Un'altra insidia potrebbe essere l'esistenza di condizioni di comorbidità e questo consegue che la morte potrebbe essere attribuita a tale condizione, piuttosto che a Sudep (Elmali et al., 2019). Sudep è considerato un'entità multifattoriale, ovvero concorrono più fattori di rischio e disfunzioni ad essi correlati. Nonostante un'ampia letteratura

patologica sulla Sudep riguardante studi polmonari e cardiaci, risulta davvero complicato poter fare diagnosi. Infatti, (Barranco et al., 2020), le patologie polmonari come congestione polmonare ed emorragia intra alveolare sono in associazione a crisi epilettiche. Queste anomalie sono state riscontrate nel 72% di tutti i casi di SUDEP segnalati con esame polmonare post mortem (Fábio A. Nascimento et al. 2017). Le crisi tonico cloniche generalizzate (GTCS) possono portare ad un arresto respiratorio transitorio ed apnea con conseguente accumulo di biossido di carbonio e desaturazione dell'ossigeno, dal 70 al 90 % in relazione alla durata della crisi. Allo stesso modo, anche le aritmie cardiache possono verificarsi nel contesto delle convulsioni e i cambiamenti fisiologici indotti possono promuovere diversi tipi di aritmie in individui suscettibili. La più comune è la tachicardia sinusale, ovvero quando si ha un innalzamento della frequenza cardiaca al disopra di 100 battiti al minuto ma, non sono escluse bradicardia (fino al punto di asistolia) e prolungamento dell'intervallo QT (Bagnall et al. 2017). Sulla base di quanto appena detto, spesso non vengono considerati come fattori confondenti, insieme ad abuso di droghe, scarso trattamento con farmaci AED e terapie sbagliate (Barranco et al., 2020).

Negli ultimi anni, però, il rapido avanzamento delle conoscenze medicoscientifiche, l'accesso a tecniche avanzate e lo sviluppo di tecniche di sequenziamento di nuova generazione del genoma, hanno permesso di ottenere buoni risultati in termini di diagnosi e gestione di patologie.

Vi sono prove considerevoli che fattori genetici svolgono un ruolo, in quanto sono associati a tassi più elevati di Sudep (Lossin et al., 2003; Barranco et al., 2020; Sahly et al., 2022). Questo ha permesso di identificare correlazioni tra varianti e manifestazioni cliniche associate al gene mutato.

Infatti, l'identificazione di mutazioni dei canali ionici in pazienti epilettici ha fornito nuove opportunità per indagare le basi molecolari di questa complessa ed eterogenea condizione neurologica (Meisler et al., 2001). Nella maggior parte degli studi effettuati da altri autori, si ritiene che specifici meccanismi autonomici come il ritmo cardiaco o il controllo del sistema nervoso autonomo sono influenzati dalla perdita o dall'acquisizione di una funzione della variante patogena. Più precisamente, l'interruzione dei geni dei canali ionici del sodio può portare a diverse disfunzioni associate a bradicardia o stato proaritmico a causa dell'interruzione del potenziale d'azione (Chahal et al., 2020).

Questa tesi riporta l'analisi genomica di soggetti deceduti in seguito a Sudep, i cui geni considerati sono a pattern di espressione cerebrale come SCN1A, gene responsabile di una mutazione ai canali sodio voltaggio dipendenti specifico per la subunità I alfa, e cardiaca tra cui KCNQ1, gene responsabile di una mutazione ai canali potassio voltaggio dipendenti sottofamiglia Q membro I, KCNH2, gene responsabile di una mutazione ai canali potassio voltaggio dipendenti sottofamiglia H membro II, SCN5A, responsabile di mutazione ai canali sodio voltaggio dipendenti specifico per la subunità V alfa, SCN1B, responsabile di mutazione ai canali sodio voltaggio dipendente specifico per la subunità beta 1, RYR2, gene del recettore della rianodina cardiaca di tipo II, proteina che si trova principalmente nel muscolo cardiaco responsabile di mutazioni nel canale del calcio. Questi sono stati scelti perché possibili contributori dell'alterata funzione dei canali ionici, suggerendo un loro possibile ruolo nell'aumento di rischio di aritmia cardiaca e morte improvvisa. I soggetti presi in esame rientrano nella categoria Sudep definito, secondo la classificaione di Nshet et al., 2012 e sono 3 pazienti con diversa storia clinica, età e sesso e per ciascuno di questi campioni si è proceduto all'analisi retrospettiva.

Per il Campione 1, donna di 40 anni, affetta da sindrome di Dravet, la variante identificata è una mutazione missenso C>T al codone 986 (Leu986Phe) che si trova all'interno del dominio DII della proteina SCN1A (Fig.47).

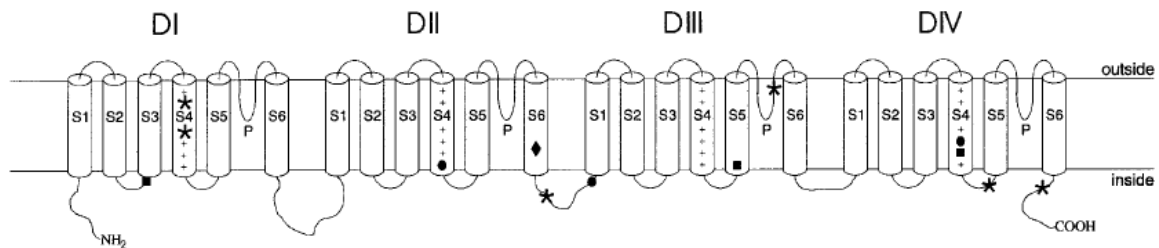


Fig. 47 Organizzazione SCN1A. 4 domini omologhi e per ogni dominio 6 segmenti transmembrana. La mutazione missenso si trova nel dominio II, segmento 6 (Claes. Et al.,2001)

Poiché il codone 986 è altamente conservato tra le subunità alfa dell'uomo, si può prevedere che mutazione possa avere un effetto deleterio su SCN1A riconducibile alla Sindrome di Dravet o SMEI (epilessia mioclonica severa nell'infanzia) un grave disturbo neurologico caratterizzato dall'insorgenza di convulsioni nel primo anno di vita. Gli individui affetti di solito presentano inizialmente convulsioni toniche, cloniche e tonico-cloniche e successivamente, i pazienti tendono a manifestare altri tipi di crisi, tra cui crisi di assenza, miocloniche e parziali.

Di conseguenza, al termine dell'analisi, dopo le opportune valutazioni mediante l'utilizzo di tools bioinformatici, è stata confermata come variante patogena con frequenza allelica nella popolazione molto bassa, inferiore dello 0,05 tale da considerarla come fattore contribuente.

Per il campione 2, maschio di 17 anni affetto da epilessia focale criptogenica in terapia con levetiracetem (farmaco AED), che riporta storia clinica dovuta a persistenza di crisi tonico-cloniche generalizzate ed episodi di iperpnea notturni, sono state rilevate un totale di 45 varianti, di cui 14 varianti sinonime (SVN), 29 varianti introniche, 2 missenso, tramite il sequenziamento di 5 geni: KCNQ1, di cui sono state rilevate 2 varianti introniche e una variante sinonima; KCNH2, rilevate 2 varianti introniche e 4 varianti sinonime SVN; SCN1B, rilevate 2 varianti introniche; SCN5A, 2 varianti introniche, 3 varianti sinonime e 1 missenso e RYR2, rilevate 21 varianti introniche, 6 varianti sinonime e 1 missenso.

Per il campione 3, maschio 32 anni affetto da epilessia da diversi anni in terapia con depamag (acidovalproico; farmaco AED) che nel corso degli ultimi anni aveva avuto episodi di crisi epilettiche notturne, sono state rilevate un totale di 44 varianti, di cui 14 varianti sinonime (SVN), 29 varianti introniche, 2 missenso, tramite il sequenziamento di 4 geni: KCNH2, di cui sono state rilevate 4 varianti introniche e 4 varianti sinonime (SNV); SCN1B, rilevata una

sola variante intronica; SCN5A, rilevate 1 variante intronica, 3 varianti sinonime e 1 missenso; RYR2, rilevate 23 varianti introniche, 6 varianti sinonime e 1 missenso.

Le varianti che hanno suscitato il nostro interesse, identificate nei campioni 2 e 3, sono le mutazioni missenso nei geni SCN5A E RYR2, dal momento che, quando si verificano all'interno della sequenza di DNA, sostituiscono una base azotata in seconda posizione; quindi, l'amminoacido codificato non sarà più lo stesso e questo comporta cambiamento di funzione.

SCN5A His558Arg

La variante è stata ritrovata nell'esone 12 in posizione 155 dal sito splicing più vicino, in cui l'Istidina è sostituita all'Arginina in posizione 588 della corrispondente proteina codificante. Essa è correlata a diverse disfunzioni quali, sindrome di Brugada, sindrome del QT lungo, sindrome da bradicardia sinusale familiare (autosomica recessiva), blocco cardiaco progressivo familiare tipo 1° (difetto di conduzione cardiaca), cardiomiopatia dilatativa e sindrome di morte improvvisa nel neonato. La singola variante combinata con convulsioni e terapia con AED, entrambi fattori di rischio, avrebbe potuto

predisporre questo paziente epilettico a crisi e aritmie cardiache che portano a morte improvvisa. Diversi sono stati gli studi riguardanti questa tipologia di variante, tra questi Chen et al., 2011 l'associa ad una delle più comuni aritmie cardiache, quali la fibrillazione atriale. D'altronde, in assenza evidenze anatomiche specifiche di morte a seguito dell'autopsia, è possibile supportare l'idea che la morte improvvisa in SUDEP possa essere dovuta ad alterazioni del canale ionico.

RYR2 Gln2958Arg

La variante interessa l'esone 61 in posizione -23 dal sito di splicing più vicino, questo vuol dire che il sito di splicing si trova a valle della variante, in cui la Glicina è sostituita all'Arginina in posizione 2958 della corrispondente proteina codificante. Essa è riconducibile a casi di SUDEP giovanile (Barranco et al., 2020), e altri casi studio hanno voluto approfondire circa questa variante da poco nota in letteratura. Nel 2001 Laitinen PJ et al., hanno associato questa mutazione alla tachicardia ventricolare polimorfa familiare, caratterizzata da eventi di tachicardie ventricolari bidirezionali e polimorfiche in risposta ad un intenso esercizio fisico, senza evidenza strutturale di malattia miocardica, con un esordio relativamente precoce e un tasso di mortalità di circa il 30% all'età di 30 anni, caratteristica che coinvolge il paziente 3.

Pertanto, le varianti descritte in precedenza possono aver alterato la funzione di ciascun rispettivo canale ionico causando frequenti episodi di crisi epilettiche riportati in ciascun caso SUDEP. Dopo un'attenta analisi, tutte le varianti riscontrate nei campioni 2 e 3, sono risultate benigne e tutte le frequenze alleliche riportate da gnomAD v2 1.1 sono molte alte, ovvero superano di 0,05 il valore limite al di sotto del quale potrebbe avere un significato opposto, ovvero patogeno. Non è stato possibile identificare una variante patogenetica che permettesse di determinare la causa della morte, probabilmente perché una mutazione patogenetica potrebbe essere presente in uno degli altri geni candidati che non sono stati presi in considerazione nella stesura di questo studio.

PROSPETTIVE FUTURE

Da una prospettiva generale i risultati di questo studio, in accordo con i testi letterari citati, non smentiscono una correlazione tra la SUDEP ed alcune varianti geniche. Anche se i risultati dimostrano che le ricerche condotte non ancora riescono ad identificare una mutazione discriminatoria, è importante perseguire lo studio genetico relativo alla SUDEP, al fine di migliorare la quantità e qualità dei dati disponibile per la ricerca. È altrettanto importante migliorare la nostra conoscenza dei meccanismi fisiopatologici al fine di ridurre l'incidenza ed elaborare strategie preventive.

BIBLIOGRAFIA

Lina Nashef¹, Elson L. So, Philippe Ryvlin, Torbjörn Tomson. *Unifying the definitions of sudden unexpected death in epilepsy*. 2012

T S Walczak 1, I E Leppik, M D'Amelio, J Rarick, E So, P Ahman, K Ruggles, G D Cascino, J F Annegers, W A Hauser. *Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study*. 2001

Robyn Whitney¹, Elizabeth J Donner. *Risk Factors for Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP) and Their Mitigation*. 2019

Monica Coll, Antonio Oliva, Simone Grassi, Ramon Brugada and Oscar Campuzano. *Update on the Genetic Basis of Sudden Unexpected Death in Epilepsy*. 2019

Rosemary J. Panelli. *SUDEP: A global perspective*. 2020

Zara F. *Genetics of the epilepsies and laboratory techniques* 2006

Roberto Militerni. *neuropsichiatria infantile IV edizione*. 2009

Robert S. Fisher, J. Helen Cross, Carol D'Souza, Jacqueline A. French, Sheryl R. Haut, Norimichi Higurashi, Edouard Hirsch, Floor E. Jansen, Lieven Lagae, Solomon L. Moshé, Jukka Peltola, Eliane Roulet Perez, Ingrid E. Scheffer, Andreas Schulze-Bonhage, Ernest Somerville, Michael Sperling, Elza Márcia Yacubian, Sameer M. Zuberi. *Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types*. 2017

Fazel, S.; Wolf, A.; Langstrom, N.; Newton, C.R.; Lichtenstein, P. *Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: A total population study*. 2013

Devinsky, O.; Hesdorfer, D.C.; Thurman, D.J.; Lhatoo, S.; Richerson, G. *Sudden unexpected death in epilepsy: Epidemiology, mechanisms, and prevention*. *Lancet Neurol*. 2016,

Dlouhy, B.J.; Gehlbach, B.K.; Richerson, G.B. *Sudden unexpected death in epilepsy: Basic mechanisms and clinical implications for prevention*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2016,

C. Harden, T. Tomson, D. Gloss, J. Buchhalter, J H. Cross, E. Donner, J. A French, A. Gil-Nage, D C Hesdorffer, W H Smithson, M. C Spitz , T. S Walczak J.W Sander, P. Ryvlin. *Practice guideline summary: Sudden unexpected death in epilepsy incidence rates and risk factors: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society*; 2017

Hesdorffer DC, Tomson T, Benn E, Sander JW, Nilsson L, Langan Y, Walczak TS, Beghi E, Brodie MJ, Hauser A; *ILAE Commission on Epidemiology; Subcommission on Mortality. Combined analysis of risk factors for SUDEP.* Epilepsia 2011

Tomson T, Surges R, Delamont R, Haywood S, Hesdorffer DC. *Who to target in sudden unexpected death in epilepsy prevention and how? Risk factors, biomarkers, and intervention study designs.* Epilepsia 2016

Manolis, T.A.; Manolis, A.A.; Melita, H.; Manolis, A.S. *Sudden unexpected death in epilepsy: The neurocardio-respiratory connection.* 2018

Leu, C.; Balestrini, S.; Maher, B.; Hernandez-Hernandez, L.; Gormley, P.; Hamalainen, E.; Heggeli, K. Schoeler, N.; Novy, J.; Willis, J.; et al. *Genome-wide Polygenic Burden of Rare Deleterious Variants in Sudden Unexpected Death in Epilepsy.* 2015

Thom, M.; Boldrini, M.; Bundock, E.; Sheppard, M.N.; Devinsky, O. Review: *The past, present and future challenges in epilepsy-related and sudden deaths and biobanking.* Neuropathol. 2018

Ayşe Deniz ELMALI , Nerses BEBEK , Betül BAYKAN. *Let's talk SUDEP.* 2019

Himani Bhasin, Suvasini Sharma , Rajesh Ramachandrannair. *Can We Prevent Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP)?* 2021

Nei M, Ho RT, Abou-Khalil BW, Drislane FW, Liporace J, Romeo A, Sperling MR. EEG and ECG in sudden unexplained death in epilepsy. Epilepsia 2004

Surges R, Taggart P, Sander JW, Walker MC. *Too long or too short? New insights into abnormal cardiac repolarization in people with chronic epilepsy and its potential role in sudden unexpected death.* Epilepsia 2010

Jennifer L Novak 1, Patrick R Miller 1, Daniela Markovic 2, Sheba K Meymandi 3, Christopher M DeGiorgio. *Risk Assessment for Sudden Death in Epilepsy: The SUDEP-7 Inventory.* 2015

Sperling MR, Barshow S, Nei M, Asadi-Pooya AA. *A reappraisal of mortality after epilepsy surgery.* Neurology 2016

Sperling MR, Feldman H, Kinman J, Liporace JD, O'Connor MJ. *Seizure control and mortality in epilepsy.* Ann Neurol 1999

DeGiorgio CM, Curtis A, Hertling D, Moseley BD. *Sudden unexpected death in epilepsy: Risk factors, biomarkers, and prevention.* Acta Neurol Scand 2018;

Salanova V, Markand O, Worth R. *Temporal lobe epilepsy surgery: outcome, complications, and late mortality rate in 215 patients.* Epilepsia. 2002;

Sperling MR, Harris A, Nei M, Liporace JD, O'Connor MJ. *Mortality after epilepsy surgery*. Epilepsia. 2005

Ryvlin P. *Avoid falling into the depths of the insular trap*. Epileptic Disord. 2006

Ryvlin P, Montavont A, Kahane P. *Sudden unexpected death in epilepsy: from mechanisms to prevention*. Curr Opin Neurol 2006

https://it.wikipedia.org/wiki/Stimolazione_del_nervo_vago

Giordano F, Zicca A, Barba C, Guerrini R, Genitori L. *Vagus nerve stimulation: Surgical technique of implantation and revision and related morbidity*. Epilepsia 2017;

Granbichler CA, Nashef L, Selway R, Polkey CE. *Mortality and SUDEP in epilepsy patients treated with vagus nerve stimulation*. Epilepsia 2015;

Annegers JF, Coan SP, Hauser WA, Leestma J. *Epilepsy, vagal nerve stimulation by the NCP system, all-cause mortality, and sudden, unexpected, unexplained death*. Epilepsia 2000

Annegers JF, Coan SP, Hauser WA, Leestma J, Duffell W, Tarver B. *Epilepsy, vagal nerve stimulation by the NCP system, mortality, and sudden, unexpected, unexplained death*. Epilepsia 1998

Bergey GK, Morrell MJ, Mizrahi EM, Goldman A, King-Stephens D, Nair D, et al. *Long-term treatment with responsive brain stimulation in adults with refractory partial seizures*. Neurology. 2015

Clark D, Riney K. *A population-based post mortem study of sudden unexpected death in epilepsy*. J Clin Neurosci. 2016

Rosario Barranco, Fiorella Caputo, Andrea Molinelli, Francesco Ventura. *Review on post-mortem diagnosis in suspected SUDEP: Currently still a difficult task for Forensic Pathologists*. 2020

Lear-Kaul KC, Coughlin L, Dobersen MJ. *Sudden unexpected death in epilepsy: a retrospective study*. Am J Forensic Med Pathol. 2005;

Shields LBE, Hunsaker DM, Hunsaker JCI, Parker JCJ. *Sudden unexpected death in epilepsy: neuropathologic findings*. Am J Forensic Med Pathol 2002

Coyle HP, Baker-Brian N, Brown SW. *Coroners' autopsy reporting of sudden unexplained death in epilepsy (SUDEP) in the UK*. Seizure. 1994

Esen Melez _I, Arslan MN, Melez DO, S,anli AN, Koç S. *Sudden unexpected death in epilepsy: a retrospective autopsy study of 112 epileptic patients*. Noro Psikiyatrs Ars. 2016

Barrow M, Roberts IS, Soilleux EJ. *Sudden death in epilepsy: standards of reporting and the value of toxicological analysis*. J Clin Pathol 2011

Antoniuk SA, Oliva LV, Bruck I, Malucelli M, Yabumoto S, Castellano JL. *Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients*. Arq Neuropsiquiatr 2001

Thom M, Griffin B, Sander JW, Scaravilli F. *Amygdala sclerosis in sudden and unexpected death in epilepsy*. Epilepsy Res. 1999

Jonathan N Johnson 1, David J Tester , Nancy E Basso , Michael J. Ackerman. *Cardiac Channel Molecular Autopsy for Sudden Unexpected Death in Epilepsy* 2010

Ahmed N. Sahly a,b, Michael Shevell a,c,d, Lynette G. Sadleir e, Kenneth A. Myers. *SUDEP risk and autonomic dysfunction in genetic epilepsies*. 2022

Wang, S.; Li, L.; Tao, R.; Gao, Y. *Ion channelopathies associated genetic variants as the culprit for sudden unexplained death*. Forensic Sci. Int. 2017

Aurelien D, Leren TP, Tauboll E, Gjerstad L. *New SCN5A mutation in a SUDEP victim with idiopathic epilepsy*. Seizure. 2009

Tu E, Bagnall RD, Duflou J, Semsarian C. *Post-mortem review and genetic analysis of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) cases*. Brain pathol (2011)

Johannesen KM, Gardella E, Scheffer I, Howell K, Smith DM, Helbig I, Møller RS, Rubboli G. *Early mortality in SCN8A-related epilepsies*. Epilepsy Res 2018

Friedman D, Kannan K, Faustin A, Shroff S, Thomas C, Heguy A, Serrano J, Snuderl M, Devinsky O. *Cardiac arrhythmia and neuroexcitability gene variants in resected brain tissue from patients with sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP)*. NPJ Genom Med 2018

Bagnall RD, Crompton DE, Cutmore C, Regan BM, Berkovic SF, Scheffer IF, et al. *Genetic analysis of PHOX2B in sudden unexpected death in epilepsy cases*. Neurology (2014)

https://it.wikipedia.org/wiki/Genetica_molecolare

David Sadava, David M. Hillis, H. Craig Heller. *La nuova biologia.blu. Genetica, DNA, evoluzione, biotech*. Ediz. PLUS. 2020

Peter J. Russell. *Genetica. Un approccio molecolare*. 2019

https://it.wikipedia.org/wiki/Sintesi_proteica

<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/mutazioni-del-dna-puntiformi-cromosomiche-genomiche/>

F. Amaldi, P. B. Graziano, P.P. Plevani. *Biologia Molecolare*. Distribuzione esclusiva Zanichelli. 2018

Brookes AJ. *The essence of SNPs*, *Gene*. 1999

Shastry BS. *SNPs: impact on gene function and phenotype*, *Methods Mol Biol*. 2009

<https://mutagens.it/che-cosa-sono-e-come-possono-essere-studiate-le-vus/>

S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster,. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: *A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*, 2015

Pauline C. Ng and Steven Henikoff. *SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function*. *Nucleic Acids Res*. 2003

<https://bredagenetics.com/polyphenpolyphen-2/?lang=it>

Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. *VarSome: the human genomic variant search engine*. *Bioinformatics*. 2019

Li Q, Wang K. *InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines*. *Am J Hum Genet*. 2017

Agilent 2200 TapeStation System, User Manual, *Agilent Technologies*, Rev. C;

<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4477796.pdf>

User Guide, Ion Torrent, ThermoFisher Scientific, Rev. C.0

Dale Muzzey, Eric A Evans, Caroline Lieber. *Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling*. *Curr Genet Med Rep* 2015; 3(4):158-16524

Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit, User Guide, *Ion Torrent, ThermoFisher Scientific*, Rev. C.0;

Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit, User Guide, *Ion Torrent, ThermoFisher Scientific*, Rev. C.0;

Feuk, L., Carson, A. R. & Scherer, S. W. *Structural variation in the human genome*. *Nat. Rev. Genet*. 7, 85–97 (2006).

<https://sites.google.com/site/mutazionigenetiche/mutazioni-geniche>

https://it.wikipedia.org/wiki/Sequenziamento_del_DNA

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PGM-Specification-Sheet.pdf>

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4480441>

<https://slideplayer.com/slide/5867658/>

<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>

Christoph Lossin, Thomas H. Rhodes, Reshma R. Desai, Carlos G. Vanoye, Dao Wang, Sanda Carniciu, Orrin Devinsky, and Alfred L. George Jr. *Epilepsy-Associated Dysfunction in the Voltage-Gated Neuronal Sodium Channel SCN1A*. 2003

Lieve Claes, Jurgen Del-Favero, Bertien Ceulemans, Lieven Lagae, Christine Van Broeckhoven, and Peter De Jonghe. *De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy*. 2001

<https://gnomad.broadinstitute.org/>

<https://varsome.com/>

<https://wintervar.wglab.org/>

Philippe Ryvlin 1, Lina Nashef, Samden D Lhatoo, Lisa M Bateman, Jonathan Bird, Andrew Bleasel, Paul Boon, Arielle Crespel, Barbara A Dworetzky, Hans Høgenhaven, Holger Lerche, Louis Maillard, Michael P Malter, Cecile Marchal, Jagarlapudi M K Murthy, Michael Nitsche, Ekaterina Pataraiia, Terje Rabben, Sylvain Rheims, Bernard Sadzot, Andreas Schulze-Bonhage, Masud Seyal, Elson L So, Mark Spitz, Anna Szucs, Meng Tan, James X Tao, Torbjörn Tomson. *Incidence and mechanisms of cardiorespiratory arrests in epilepsy monitoring units (MORTEMUS): a retrospective study*. 2013

Chen S, Joodi G, Devinsky O, Sadaf MI, Pursell IW, Simpson RJ Jr. *Underreporting of sudden unexpected death in epilepsy*. *Epileptic Disord* 2018

Atherton DS, Davis GG, Wright C, Devinsky O, Hesdorffer D. *A survey of medical examiner death certification of vignettes on death in epilepsy: Gaps in identifying SUDEP*. *Epilepsy Res* 2017

J Spanpanato 1, A Escayg, M H Meisler, A L Goldin. *Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2*, 2001

C. Anwar A. Chahal, corresponding author Mohammad N. Salloum, Fares Alahdab, Joseph A. Gottwald, PharmD, David J. Tester, Lucman A. Anwer, Elson L. So, Mohammad Hassan Murad, Erik K. St Louis, Michael J. Ackerman and Virend K. Somers. *Systematic Review of the Genetics of Sudden Unexpected Death in Epilepsy: Potential Overlap With Sudden Cardiac Death and Arrhythmia-Related Genes*. 2020

Päivi J. Laitinen, Kevin M. Brown, Kirsi Piippo, Heikki Swan, Joe M. Devaney, Bhoomi Brahmbhatt, Elizabeth A. Donarum, Michael Marino, Natascia Tiso, Matti Viitasalo, Lauri Toivonen, Dietrich A. Stephan and Kimmo Kontula *Mutations of the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2) Gene in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia.* 2001