



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**Ruolo della genetica nello studio del
mesotelioma pleurico**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa

Chiara Turchi

Tesi di Laurea di:

Giada Traini

Correlatore: Chiar.mo Prof

Mauro Pesaresi

Anno Accademico 2018-2019

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Dati sul Mesotelioma Pleurico Maligno	1
1.2 Anatomia e istologia.....	2
1.3 Epidemiologia	3
1.4 Eziologia	6
1.4.1 Asbesto	7
1.4.2 Altre cause	11
1.5 Patogenesi.....	12
2. POLIMORFISMI DEL DNA	19
2.1 Storia del sequenziamento e primi studi sul DNA	19
2.2 Polimorfismi a singolo nucleotide.....	20
2.3 Studi e applicazioni degli SNPs.....	21
3. GENETICA E MESOTELIOMA.....	23
3.1 Biologia Molecolare del Mesotelioma Maligno.....	23
3.2 Rischio e suscettibilità nel Mesotelioma	24
4. SCOPO DELLA TESI.....	32
5. TECNICHE D'ANALISI.....	34
5.1 Estrazione del DNA in fase solida.....	34
5.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	35
5.3 Hot Start PCR.....	37
5.4 TapeStation System	38
5.5 Elettroforesi Capillare	39
5.6 Sequenziamento di Sanger.....	41

6. MATERIALI E METODI.....	43
6.1 Selezione dei campioni	43
6.2 Scelta dei polimorfismi	44
6.3 Disegno dei primers	48
6.4 Estrazione del DNA	50
6.5 Quantificazione del DNA estratto.....	53
6.6 Amplificazione degli SNPs in singolo	54
6.7 Quantificazione dei prodotti dell'amplificazione	56
6.8 Purificazione del DNA amplificato.....	57
6.9 Reazione di sequenza	58
6.10 Rimozione dei ddNTPs non incorporati	60
6.11 Elettroforesi capillare	60
6.12 Analisi delle sequenze	61
7. RISULTATI.....	63
7.1 Risultati della quantizzazione.....	63
7.2 Controllo dei prodotti di amplificazione	64
7.3 Analisi degli SNPs.....	70
8. DISCUSSIONE	73
BIBLIOGRAFIA	76

1. INTRODUZIONE

1.1 Dati sul Mesotelioma Pleurico Maligno

Il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) è una neoplasia che origina dalle cellule mesoteliali della pleura. Questa neoplasia non è unicamente confinata al distretto pleurico ma riguarda tutti quei distretti anatomici che sono costituiti da mesotelio quali pericardio, peritoneo e tunica vaginale del testicolo (1).

Tra tutte le tipologie di mesoteliomi maligni quello della pleura è quello con la percentuale di incidenza più alta, attorno al 70 – 90% (2) e che quindi ha anche una notevole importanza a livello clinico.

Tra le cause principali c'è l'esposizione all'asbesto, che comprende una categoria di minerali presenti in natura e caratterizzati dalla presenza di fibre di silicato. Ed è proprio la presenza di queste fibre estremamente resistenti che lo rendono un materiale così altamente nocivo per l'uomo, tanto da essere stato dichiarato cancerogeno dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca del Cancro (3). L'esposizione all'asbesto non è l'unica causa ma rimane comunque un fattore di rischio preponderante nell'ottica di questa patologia. Infatti, l'80% delle diagnosi di mesotelioma pleurico maligno vedono nell'anamnesi del paziente una pregressa esposizione all'asbesto, soprattutto in ambito lavorativo (4).

A favore di questa teoria, a partire dagli anni '70 le diagnosi di mesotelioma pleurico maligno sono iniziate ad aumentare in maniera importante, questo perché gli effetti della passata esposizione all'asbesto hanno iniziato a essere clinicamente rilevanti. Infatti, in media il lasso di tempo tra l'esposizione all'amianto e la diagnosi della neoplasia è di circa 40 anni

(5), questo ci porta a pensare che in numero di diagnosi sia destinato ad aumentare raggiungendo il picco attorno al 2020, tenendo in considerazione la combinazione del periodo di massima espansione nell'utilizzo dell'amianto in ambito industriale e il tempo di latenza di questa neoplasia.

1.2 Anatomia e istologia

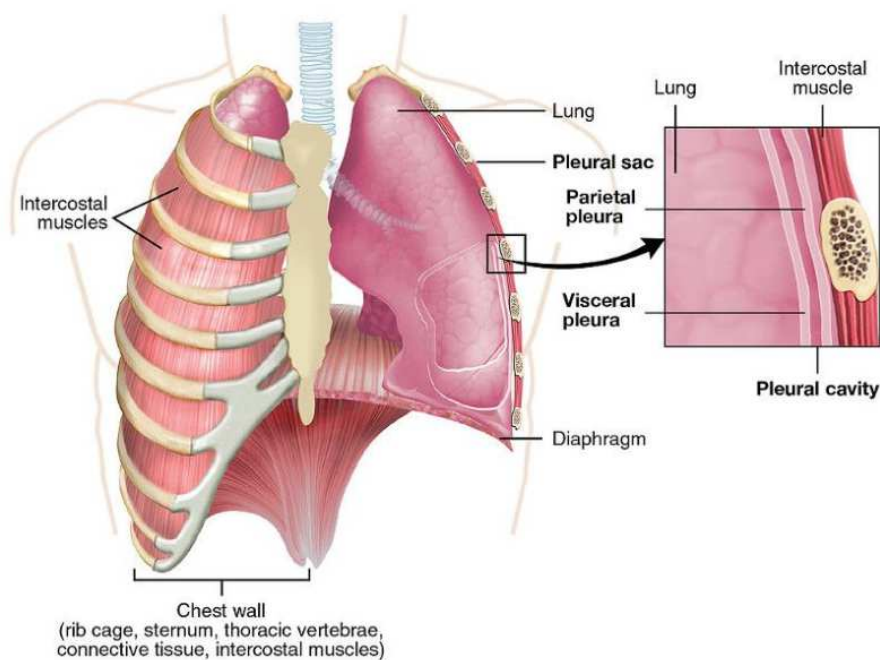


Figura 1: Localizzazione anatomica dei polmoni e relative pleure, viscerale e parietale.

Le pleure (Figura 1) sono membrane sierose che rivestono completamente il polmone e servono a facilitare il loro scorrimento contro la parete della cavità toracica che li racchiude. Morfologicamente le pleure sono costituite da un foglietto parietale e uno viscerale che insieme formano la cavità pleurica che in condizioni fisiologiche è uno spazio virtuale ma che in condizioni patologiche si fa reale. Il foglietto viscerale sottilissimo e perfettamente trasparente aderisce al polmone in modo così intimo che è impossibile separarlo con la dissezione (6).

Esistono 3 forme di mesotelioma maligno, differenziate in base alla morfologia istologica: epitelioideo, sarcomatoide e bifasico. L'epitelioideo presenta una struttura tubulopapillare composto da cellule piccole e uniformi, il sarcomatoide è più difficile da diagnosticare per la presenza di aree fibrose, che possono essere confuse con altre patologie, e le cellule presentano un più alto grado di atipia. Il terzo tipo consiste in una combinazione delle caratteristiche dei due precedenti (7).

1.3 Epidemiologia

Nel novembre 2017 si è tenuta a Casale Monferrato la III Conferenza governativa sull'amianto e le patologie correlate dal titolo "*Dalla legge n. 257 del 1992 ad oggi. Situazione attuale, prospettive future*". L'evento, promosso su iniziativa della Presidenza del Consiglio dei Ministri ha inteso verificare lo stato di attuazione delle norme, discutere delle recenti acquisizioni scientifiche sull'argomento e porre le fondamenta per il superamento delle criticità ancora relative al censimento e alla bonifica dei siti inquinati, alla tutela e alla cura dei soggetti colpiti da patologia asbesto-correlata e alla sorveglianza sanitaria degli ex esposti.

Tutti i dati riportati appartengono al sesto rapporto del Registro Nazionale dei Mesoteliomi ReNaM (8).

L'Italia è attualmente uno dei paesi al mondo maggiormente colpiti dall'epidemia di malattie amianto-correlate. Tale condizione è la conseguenza di utilizzi dell'amianto che sono quantificabili come 3.748.550 tonnellate di amianto grezzo prodotto nazionalmente dal 1945 al 1992 e 1.900.885 tonnellate di amianto grezzo importato durante lo stesso periodo.

Il sistema di sorveglianza epidemiologica dei casi di Mesotelioma Maligno (MM) è costituito nel nostro paese dal Registro nazionale dei mesoteliomi (ReNaM) istituito presso l’Inail, Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale (Dimeila). Oggi la rete di rilevazione e controllo è molto più vasta ed efficiente e prevede la sorveglianza e la registrazione di tutti i casi di mesotelioma maligno della pleura, del peritoneo, del pericardio e della tunica vaginale del testicolo.

Grazie a questa sorveglianza sono state riportate informazioni relative a 27.356 casi di mesotelioma maligno, raccolti nella Tabella 1, con diagnosi fino al 31/12/2015 e di questi casi il 90% risulta essere a carico della pleura.

Pleura							
COR di segnalazione	Anno di incidenza					Totale	%
	2012	2013	2014	2015			
Piemonte	208	244	229	218	899	15,0	
Valle d’Aosta	5	4	3	4	16	0,3	
Lombardia	389	446	408	320	1.563	26,1	
Veneto	100	114	104	102	420	7,0	
Friuli-Venezia Giulia	56	51	44	45	196	3,3	
Liguria	134	147	127	124	532	8,9	
Emilia-Romagna	147	148	123	143	561	9,4	
Toscana	80	90	64	69	303	5,1	
Umbria	17	25	15	16	73	1,2	
Marche	25	39	25	27	116	1,9	
Lazio	87	71	78	67	303	5,1	
Abruzzo	14	13	12	9	48	0,8	
Molise	2	3	1	2	8	0,1	
Campania	91	96	92	81	360	6,0	
Puglia	43	56	23	41	163	2,7	
Basilicata	6	3	-	-	9	0,2	
Calabria	6	5	9	4	24	0,4	
Sicilia	75	98	71	52	296	4,9	
Sardegna	15	15	15	7	52	0,9	
P.A. Bolzano	7	7	3	8	25	0,4	
P.A. Trento	3	5	4	3	15	0,3	
Totale	1.510	1.680	1.450	1.342	5.982	100,0	

Tabella 1: numero di casi di Mesotelioma Maligno della pleura segnalati al ReNaM, COR di segnalazione e anno di incidenza (2012 – 2015)

Fino a 45 anni la malattia è rarissima (solo 2% del totale dei casi registrati) e l'età media alla diagnosi è di 70 anni.

Riguardo l'incidenza per uomini e donne (Figura 2), il rapporto di genere (casi di genere maschile per ogni caso di genere femminile) risulta essere pari a 2,5. Il 72% dei casi archiviati è di sesso maschile, mentre per le donne la percentuale scende arrivando al 27,4%.

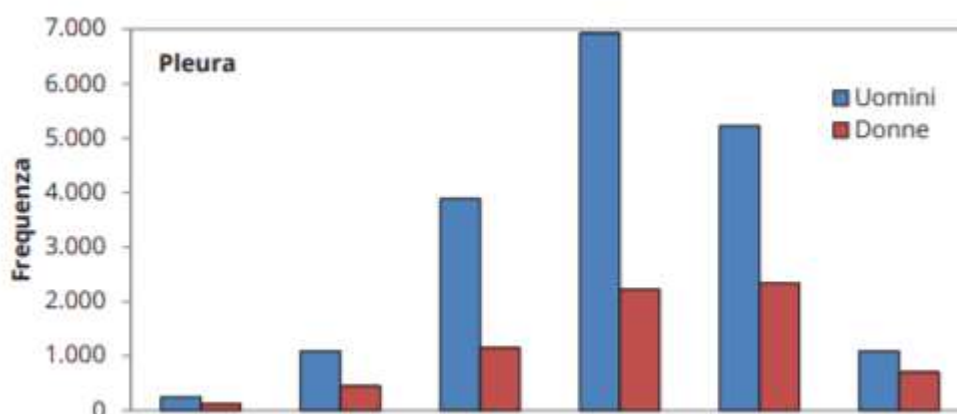


Figura 2: Casi di mesotelioma segnalati al ReNaM per genere e sede anatomica di insorgenza (Italia, 1993 – 2015)

I settori riguardanti l'esposizione sono distribuiti in maniera diversa tra uomini e donne, infatti i primi hanno una forte tendenza all'esposizione professionale, mentre le donne hanno più frequentemente un'esposizione di tipo non professionale (Figura 3). Per quanto riguarda il genere maschile le modalità di esposizione sono state approfondite solo per il 72,2% dei casi e fra questi il 70% presenta un'esposizione di tipo professionale, il 4,9% familiare, il 4,4% ambientale, l'1,5% per svago o hobby mentre per il restante 20% l'esposizione è improbabile o ignota.

I settori di attività industriale maggiormente coinvolti sono:

- Edilizia 15,5 %

- Industria metalmeccanica 8,6 %
- Industria metallurgica 4,0 %
- Fabbricazione di prodotti in metallo 5,7 %
- Cantieri navali 6,1 %
- Industria del cemento-amianto 3,1 %
- Altro

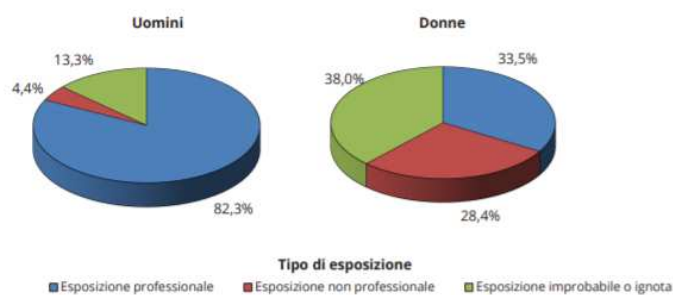


Figura 3. Percentuale del numero di casi di MM con esposizione definita per tipo di esposizione e genere (Italia, 1993 – 2015)

1.4Eziologia

I meccanismi di sviluppo della malattia non sono ancora del tutto chiari. Ci sono studi che utilizzano linee cellulari per approfondire l'argomento e cercare di ottenere informazioni al riguardo

La patogenesi di questa neoplasia è assai discussa poiché sono diverse le cause di insorgenza di questo tumore. La maggior parte dei mesoteliomi pleurici maligni è legato all'esposizione all'asbesto ma sono stati identificati anche altri casi, in letteratura dove il mesotelioma non era asbesto-indotto. Abbiamo la presenza di altri agenti eziologici tra cui minerali fibrosi diversi dall'asbesto (quali erionite), radiazioni, infiammazione cronica e Simian Virus 40.

1.4.1 Asbesto

La parola amianto deriva dalla lingua greca, che significa "inestinguibile". Il termine amianto si riferisce a un gruppo di fibre di silicato minerale idratato presenti in natura che includono due tipologie principali: serpentina, rappresentata da crisotilo (amianto bianco) e anfibolo, che comprende crocidolite (amianto blu), amosite (amianto marrone), antofillite, actinolite e tremolite (Tabella 2, Figura 4).

Nome	Nome comune	Formula chimica
Crisotilo	Amianto bianco	$Mg_3Si_2O_5(OH)_4$
Amosite	Amianto marrone	$(Mg,Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$
Crocidolite	Amianto blu	$Na_2Fe_2+3Fe_3+2Si_8O_{22}(OH)_2$
Tremolite	-	$Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$
Actinolite	-	$Ca_2(Mg,Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$
Antofillite	-	$(Mg,Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$

Tabella 2: Minerali classificati dalla normativa italiana come amianti



Figura 4: Minerali riconosciuti nella categoria “amianto”

L'amianto è stato utilizzato in passato per le sue proprietà isolanti e le fibre e le polveri di amianto sono state ormai apertamente dichiarate come cancerogene dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul cancro (IARC) di Lione. Nel 1992 infatti l'Italia è diventato il primo paese europeo ad introdurre il bando completo dell'amianto con il decreto legislativo 257 del 1992 con cui è stata vietata la produzione e l'installazione di materiali contenenti amianto. La potenziale pericolosità dell'amianto dipende dall'eventualità che siano rilasciate fibre aerodisperse nell'ambiente che possono essere inalate dai lavoratori e non solo (3).

L'associazione tra esposizione all'anfibolo di amianto e lo sviluppo di MM è ben accettata. In particolar modo la crocidolite è generalmente considerata il tipo più oncogenico di amianto. Le fibre lunghe e sottili sono ritenute più pericolose, poiché hanno una maggiore biopersistenza nella pleura. Infatti queste fibre sono in grado di penetrare nel polmone e causare danni ripetuti e infiammazione locale.

Il crisotilo è il tipo più comune e rappresenta circa il 90% della produzione mondiale di amianto. Se il crisotilo sia causa MM è ancora controverso. Alcuni scienziati hanno suggerito che il crisotilo ha un ruolo importante nella patogenesi della MM, poiché le sue fibre inducono danni al DNA e anomalie cromosomiche nelle cellule mesoteliali umane e di ratto coltivate *in vitro*. Nello specifico Hodgson e Darnton hanno suggerito che il rischio di esposizione di MM ha un rapporto di 1: 100: 500 rispettivamente per crisotilo, amosite e crocidolite (9). Invece, Suzuki et al. ha proposto che il crisotilo fornisca il principale contributo allo sviluppo del MM in base alla loro analisi dei tessuti polmonari e mesoteliali prelevata da 168 casi di MM, in cui hanno scoperto che il crisotilo era il tipo di amianto più comune (10). Altri autori hanno affermato, al contrario, che il crisotilo non causa MM e che è l'anfibolo che contamina il crisotilo a causare il MM (11). Infatti alcuni studi mostrano che

L'amianto crisotilo è considerevolmente meno biopersistente dell'amfibolo una volta inalato nei polmoni e che le fibre crisotilo non causano una risposta infiammatoria pronunciata rispetto all'amfibolo tremolite (12). Haining et al. (articolo) hanno condotto una review approfondita della letteratura riportata sull'argomento e hanno scoperto che i dati erano così radicalmente contraddittori che non era possibile concludere se il crisotilo causasse o meno MM (13).

I meccanismi di cancerogenicità dell'amianto non sono stati completamente compresi. Durante il lungo periodo di latenza di MM, possono verificarsi molti eventi patogeni che possono contribuire allo sviluppo del MM. Rispetto ad altri tipi di cellule testati, le cellule mesoteliali umane sono molto sensibili alla citotossicità dell'amianto. Ad esempio, quando esposti all'amosite, le cellule mesoteliali erano 10 e 100 volte più sensibili agli effetti citotossici dell'amianto rispetto alle normali cellule epiteliali o fibroblastiche bronchiali umane. Le fibre di amianto inducono tossicità in modo dose-dipendente. Nella coltura tissutale, dosi uguali o superiori a 5 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ di fibre di crocidolite inducono la morte cellulare al 100% in meno di una settimana (14). Questa osservazione solleva il problema di come l'amianto può causare MM se muoiono le cellule mesoteliali umane esposte all'amianto. Recenti lavori hanno affrontato questo paradosso e hanno dimostrato un ruolo critico per il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) e NF- κ B nella risposta mediatrice delle cellule mesoteliali umane all'amianto (15). Studi in vivo hanno rivelato che, in seguito all'esposizione all'amianto, si verifica una reazione infiammatoria con una grande componente di fagociti mononucleari (16). Dopo la differenziazione in macrofagi, queste cellule fagocitano l'amianto e, in risposta, rilasciano TNF- α . Allo stesso tempo, l'amianto induce le cellule mesoteliali umane ad esprimere il recettore TNF- α TNF-R1 e stimola anche la secrezione di TNF- α (con effetti sia paracrini che autocrini). Il TNF- α si lega al suo

recettore e attiva la via NF- κ B, che aumenta la percentuale di cellule mesoteliali umane che sopravvivono all'esposizione all'amianto (14). Le cellule mesoteliali umane esposte all'amianto possono accumulare danni al DNA. L'amianto provoca rotture del filamento di DNA mediate dai radicali liberi catalizzati dal ferro. Inoltre, causando il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di azoto reattivo (RNS), le fibre di amianto possono indurre indirettamente genotossicità tra cui, nello specifico, sostituzioni di base, delezioni, riarrangiamenti, inserzioni, scambi di cromatidi fratelli e aberrazioni cromosomiche che possono portare a un ampio spettro di mutazioni nelle cellule di mammifero (Figura 5) (17, 18). L'attivazione della via NF- κ B stimolata dal TNF- α consente alle cellule mesoteliali con danno al DNA indotto dall'amianto di dividersi piuttosto che morire, e se si accumula un danno genetico specifico sufficiente da sviluppare infine in un MM (14).

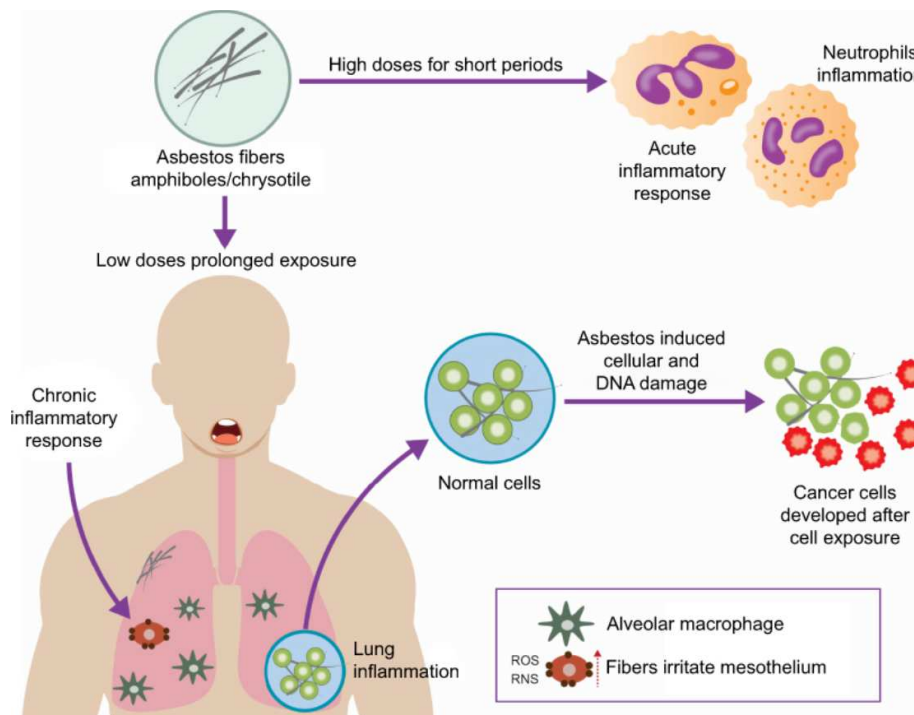


Figura 5: Meccanismo d'azione patogenetico delle fibre d'asbesto a seguito di inalazione.

1.4.2 Altre cause

L'erionite è una forma fibrosa della zeolite e ha caratteristiche fisiche simili agli anfiboli amosite o crocidalite (19). L'erionite è potassio alluminio silicato con una quantità variabile di calcio e sodio con una grande diffusione in regioni vulcaniche.

Ci sono diversi depositi nel mondo, uno dei più grandi è situato Negli Stati Uniti occidentali e in Messico (20, 21) ma anche in Italia è stato individuato nell'Italia nord-orientale (22). Nella letteratura sono stati riportati 2 casi: Kliment et al. (23) parla di un uomo di 47 anni di origine messicana e emigrato negli Stati Uniti d'America a cui è stato diagnosticato un mesotelioma pleurico maligno e l'analisi delle fibre a livello polmonare ha mostrato la presenza di grandi quantità di erionite. Anche lo studio di Oczypok et al. (24) ha riportato un altro caso molto simile, sempre di un paziente messicano e emigrato negli Stati Uniti a cui è stato diagnosticato un mesotelioma pleurico maligno.

Tra gli altri materiali fibrosi troviamo la fluoro-edenite che ha una similitudine morfologica e nella composizione con l'actinolite e la tremolite. L'uso commerciale è stato massivo fino a quando, a seguito di studi su animali, è stato dimostrato che la fluoro-edenite induce danno al DNA e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che vanno a ridurre la vitalità cellulare (25). A seguito di queste evidenze scientifiche l'agenzia internazionale di ricerca per il cancro (Airc) ha classificato la fluoro-edenite come cancerogeno per l'uomo (26).

Tra gli altri minerali studiati troviamo la balangeroite (27, 28, 29), silicato ferrico fibroso ricco di magnesio, nanotubi di carbonio (30) su cui sono stati eseguiti studi su cavie, sensibilizzate per il cancro, che hanno dimostrato lo sviluppo di mesotelioma e altre fibre di natura vetrosa che hanno lo stesso potenziale (31, 32).

Anche le radiazioni hanno una correlazione con lo sviluppo di mesotelioma. Considerando che le radiazioni sono pancancerogene sono stati riportati dei casi di mesotelioma a seguito di somministrazione intravenosa di torotrasto che consiste in una sospensione di particelle radioattive che possono depositarsi negli organi e siccome sono associati ad una lunga decadanza possono portare a una prolungata emissione di raggi α (33, 34, 35).

C'è da considerare anche il possibile ruolo del virus Simian 40 (SV40) come agente eziologico per il mesotelioma. In studi in vitro questo virus ha dimostrato di avere effetti oncogeni (36). Tuttavia, la rilevazione di SV40 in rapporto allo sviluppo di mesotelioma mostra risultati estremamente variabili, addirittura molti casi non sono in grado di confermare la presenza di questo virus in relazione ai loro casi di mesotelioma (37, 38) perciò questa ipotesi non risulta molto convincente.

Uno dei fattori eziologici più rilevanti riguarda il BAP-1 (BRCA-associated protein-1) che ha destato molto interesse nel mesotelioma. Il BAP-1 è un enzima idrolasi deubiquitinante nucleare che regola le proteine coinvolte nel ciclo cellulare, nella riparazione di danni al DNA e la differenziazione cellulare.

Le mutazioni germinali di BAP-1 implicate nello sviluppo del mesotelioma sono mutazioni autosomiche dominanti ereditarie che conferiscono un'alta suscettibilità e un alto rischio di sviluppare mesotelioma. Questo porta alla definizione di una vera e propria sindrome ereditaria che predispone allo sviluppo di neoplasie, non solo di origine mesoteliale, ma anche nel caso di melanoma uveale e cutaneo, e altre (39).

1.5 Patogenesi

Sebbene lo sviluppo del mesotelioma sia collegato alle fibre di amianto come crocidolite, amosite e tremolite, l'esatto meccanismo di sviluppo del mesotelioma non è ancora del tutto

chiaro. La pleura è il bersaglio dell'attività cancerogena dell'amianto probabilmente perché questo è in grado di traslocare dal polmone allo spazio pleurico e quindi concentrarsi nella pleura parietale nei siti di drenaggio linfatico (40).

Per ottenere informazioni sui geni rilevanti per la patologia, sono state studiate le aberrazioni cromosomiche delle cellule coinvolte. Studi citogenetici hanno rivelato cambiamenti cariotipici estremamente complessi che coinvolgono tutti i cromosomi più frequentemente con perdite cromosomiche che con aumenti cromosomici (41). Sono state riscontrate una serie di anomalie ricorrenti, tra cui la cancellazione di regioni come 9p21 e 22q12. Il cambiamento cromosomico più importante riguarda il cromosoma 22. In questa regione viene codificato il soppressore tumorale merlin, codificato dal gene neurofibromatosi di tipo 2 (NF2), che si trova precisamente sul cromosoma 22q12, e proprio in corrispondenza di questo gene sono state riscontrate mutazioni nel 40% dei mesoteliomi (42, 43, 44). L'espressione di NF2 inibisce l'invasività delle cellule del mesotelioma (45). Inoltre, nei tumori indotti dall'amianto viene perso l'allele NF2 rimanente, indicando che il gene NF2 ha un ruolo chiave come "filtro" nel mesotelioma indotto dall'amianto (46). Lo studio approfondito di questo modello ha portato alla scoperta che la perdita dell'allele rimanente era accompagnata anche dalla perdita di INK4a / ARF (47). Il locus INK4a / ARF si trova nella regione 9p21 e codifica per due distinte proteine: p16 e ARF. p16 inibisce la chinasi-4/6 ciclina-dipendente, controllando così la fosforilazione del retinoblastoma, quindi l'arresto del ciclo cellulare in G1. L'ARF promuove la degradazione dell'MDM2 prevenendo quindi la degradazione della p53 mediata dallo stesso MDM2.

I mesoteliomi mancano dell'espressione di entrambe le proteine p16 e ARF (48, 49) a causa della delezione genica (50, 51, 52) o della metilazione (53, 54, 55). In modelli animali sperimentali, l'inattivazione mirata di NF2 delle cellule mesoteliali che rivestono la cavità

toracica raramente provoca mesotelioma. Tuttavia, la concomitante perdita di INK4a / ARF accelera fortemente lo sviluppo del mesotelioma (56), indicando che l'inattivazione funzionale di NF2 porti allo sviluppo del tumore solo in uno quadro "permissivo" cioè quando è presente una carenza di INK4a / ARF.

Se questo modello animale è rappresentativo dei percorsi chiave per lo sviluppo del mesotelioma nell'uomo, ci si potrebbe porre la domanda perché le mutazioni di questo gene siano state trovate "solo" nel 40% del mesotelioma (42, 43, 44). Uno dei motivi potrebbe essere che NF2 potrebbe essere inattivato in modi diversi dalla cancellazione.

Infatti, il gene NF2 umano è costituito da 17 esoni e si estende su ~95 kb di DNA. Le trascrizioni NF2 sono sottoposte a splicing alternativo, generando più isoforme (57). Isoforma I, mancante dell'esone 16, e isoforma II, contenente tutti i 17 esoni, sono le due specie predominanti. Come risultato dello splicing alternativo, l'isoforma I codifica una proteina 595-aminoacido. Isoforma II differisce dall'isoforma I solo alla C terminale. L'inserimento dell'esone 16 nell'mRNA porta alla formazione di un nuovo codone di stop il cui risultato è una proteina 590-amminoacido che è identica all'isoforma I nei primi 579 aminoacidi. Sono state descritte anche altre varianti meno frequenti come delE2, dove l'esone mancante è il 2, delE3, con esone mancante 3 e delE2 / 3, con entrambi gli esoni mancanti sia 2 che 3 (57–61). Solo l'isoforma I funziona come soppressore del tumore e questa attività è fosforilazione dipendente (61, 62).

La fosforilazione di Ser518 da parte di PKA o PAK inattiva il merlin interrompendo l'autoassociazione intramolecolare. La miosina fosfatasi MYPT1-PP1 δ defosforila Ser518 e quindi attiva il merlin. PP1 δ si aggancia a merlin attraverso il legame della sua subunità bersaglio MYPT1. Una mutazione missenso (L339F) trovata nei tumori cerebrali distrugge il suo legame con MYPT1, indicando che l'interruzione della funzione NF2 avviene effettivamente anche evitando la defosforilazione (63). Ciò è ulteriormente supportato dall'osservazione che la proteina chinasi C-potenziato inibitore della fosfatasi di 17 kDa (CPI-17), un inibitore cellulare del MYPT1, induce la trasformazione neoplastica in vitro inattivando NF2 / merlin (64) (Figura 6).

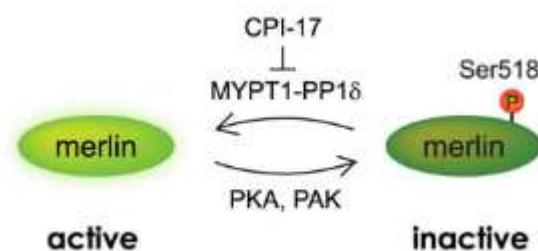


Figura 6. Schematizzazione del processo di attivazione/disattivazione di merlin

Non sono ancora disponibili dati sulle isoforme di NF2 espresse nel mesotelioma e sul loro stato di fosforilazione, ma i recenti risultati dell'inattivazione di NF2 / merlin nelle cellule tumorali della prostata DU145 da parte della fosforilazione mediata da PAK (65) indicano che questa possibilità potrebbe avere rilevanza clinica. La fosforilazione di residui diversi da Ser518 inibisce la funzione NF2 / merlin in modo diverso. Infatti, la fosforilazione guidata da Akt su Thr230 e Ser515 porta all'ubiquitinazione e quindi alla degradazione di NF2 / merlin (66). Ciò indica che nei tumori che esprimono un NF2 / merlin immutato, il pathway di PI3K attivo comporterebbe anche l'inattivazione funzionale di NF2. I campioni di mesotelioma maligno dimostrano alti livelli di espressione di Akt fosforilato (67) e questo

può essere collegato alla sovraespressione di fattori di crescita autocrina come il fattore di crescita degli epatociti e il suo recettore c-Met (67, 68). Il PI3K attivato genera un secondo messaggero lipidico, essenziale per la traslocazione di Akt sulla membrana plasmatica, dove viene fosforilato e attivato dalla chinasi fosfoinositide-dipendente 1. Akt fosforilato trasmette quindi segnali a valle, promuovendo la proliferazione cellulare e la sopravvivenza piuttosto che l'apoptosi. L'attività della via PI3K / Akt è regolata negativamente dal gene oncosoppressore PTEN e la sovraespressione di PTEN nelle cellule del mesotelioma ha indotto l'ipofosforilazione di Akt e apoptosi (69). Inoltre, è stata osservata una scarsa sopravvivenza dei pazienti con mesotelioma pleurico maligno privo di espressione di PTEN (70) (Figura 7).

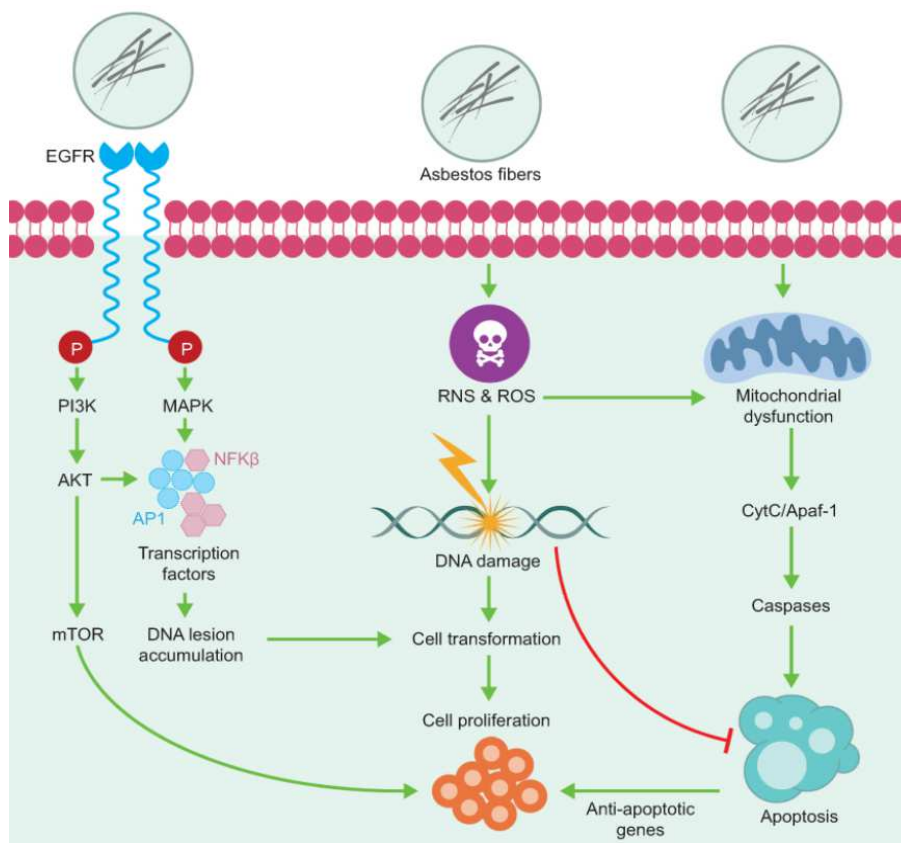


Figura 7. Patogenesi molecolare e biochimica a seguito dell'inalazione delle fibre d'asbesto

Se l'inattivazione di NF2 in uno quadro carente di INK4a / ARF innesca lo sviluppo del mesotelioma maligno, ci si potrebbe chiedere come e perché questi geni potrebbero agire in maniera ambivalente. Le risposte a queste domande possono essere dedotte dal fatto che NF2 / merlin è richiesto per l'assemblaggio, ma non dal mantenimento dei complessi giunzionali apico-laterali (71), il che significa che la perdita di NF2 sarà per lo più importante quando si verifica nelle cellule in divisione, per esempio durante la riparazione dei tessuti. Questo potrebbe essere uno dei motivi per cui è inattivato nel mesotelioma, che si pensa derivi da una lesione cronica del mesotelio originata dalle fibre di amianto (72). Le cellule che non possono formare complessi giunzionali apico-laterali non saranno in grado di formare un tessuto ben organizzato e saranno resistenti all'arresto della crescita dipendente dal contatto. La lesione cronica stimola la riparazione dei tessuti attivando le cellule staminali (73) e la carcinogenesi del mesotelioma potrebbe procedere mediante utilizzo di meccanismi omeostatici non fisiologici che regolano la riparazione dei tessuti e il rinnovo automatico delle cellule staminali. Questo concetto è supportato dall'osservazione che il pathway di segnalazione delle cellule staminali Wnt-dipendente è disregolato nel mesotelioma. In effetti, esiste un significativo silenziamento trascrizionale delle secreted frizzled-related protein (sFRP) nei tessuti primari e nelle linee cellulari di mesotelioma pleurico maligno. Gli sFRP è una famiglia di cinque glicoproteine secrete, identificate come possibili modulatori negativi della via di trasduzione del segnale Wnt. L'inserimento del costrutto del gene SFRP nel DNA delle linee cellulari MPM prive di espressione di sFRP ha provocato apoptosi e soppressione della crescita (74).

L'idea del mesotelioma come uno dei tumori cronici correlati all'infiammazione è rafforzata dalla recente osservazione che il fattore di trascrizione associato all'infiammazione NF- κ B è costitutivamente attivo in varie linee cellulari di mesotelioma (75). Ciò comporta

l'attivazione di meccanismi anti-apoptotici come frequentemente osservato nel mesotelioma (76).

Durante lo sviluppo del mesotelioma le cellule epiteliali subiscono una transizione epiteliale da mesenchimale e sembra coinvolto un altro gene, p15, anch'esso localizzato nel locus 9p21. Infatti, da un lato, la p15 è spesso messa a tacere dalla metilazione nel mesotelioma e, dall'altro lato, in un modello animale sperimentale, la carenza combinata di p16 e p15 provoca un diverso tipo di sarcoma dei tessuti molli composto da tipi di cellule miste e mostrando differenziazione bifasica (77).

2. POLIMORFISMI DEL DNA

2.1 Storia del sequenziamento e primi studi sul DNA

La storia moderna del sequenziamento del DNA iniziò nel 1977, quando Sanger descrisse il suo metodo per determinare l'ordine dei nucleotidi del DNA usando nucleotidi modificati in grado di terminare la sintesi della catena di DNA (78). Nello stesso anno, il primo gene umano è stato isolato e sequenziato (79). Nel 1986 Hood e collaboratori (80) descrissero un miglioramento del metodo di sequenziamento di Sanger che includeva il collegamento di coloranti fluorescenti ai nucleotidi, che permetteva loro di essere letti in sequenza da un computer.

Nel 1997 Weber e Myers (81) proposero di sequenziare l'intero genoma umano ma questa loro proposta non fu ben accolta (82) visto che all'inizio del 1998 solo il 5% del genoma era stato sequenziato a causa del mancato sviluppo di efficienti tecniche di sequenziamento. Per ovviare a ciò, all'inizio del 1998 l'attuale Applied Biosystems sviluppò un sequenziatore capillare di DNA automatizzato ad alto rendimento. Grazie all'unione delle varie metodiche è stato intrapreso un progetto per il sequenziamento del genoma umano (83).

Il sequenziamento del genoma umano è iniziato l'8 settembre 1990 ed è stato completato il 17 giugno 2000, mentre l'assemblaggio è stato completato il 20 giugno 2003.

Con l'avanzamento del Progetto Genoma Umano e l'identificazione di una sequenza di riferimento è venuto spontaneo andare ad analizzare le variazioni di sequenza presenti in natura, cioè i polimorfismi del DNA composti per il 90% da polimorfismi a singolo nucleotide (SNP).

In generale esistono tante tipologie di variazione del DNA da individuo a individuo, la più semplice forma di variazione è la sostituzione, delezione o inserzione di un solo nucleotide, questo cambiamento è chiamato “*single nucleotide polymorphism*” (SNP) ed è riconosciuto come tale solo quando l’allele più raro ha una frequenza maggiore o uguale all’1% della popolazione. (84, 85).

Le variazioni genetiche si verificano naturalmente nel genoma umano e sono le tracce di errori che si verificano nella replicazione del DNA durante la divisione cellulare, sebbene anche agenti esterni, come virus e mutageni chimici, possano indurre cambiamenti nella sequenza di DNA. Il verificarsi di ogni tipo di variazione genetica è mediato da diversi meccanismi; nondimeno, la maggior parte di questi eventi o processi molecolari è attualmente poco chiara e viene ancora studiata.

2.2 Polimorfismi a singolo nucleotide

Abbiamo già detto che gli SNPs costituiscono la più semplice forma di variazione del DNA tra gli individui ma affinché si possa parlare di SNP e non di mutazione sta nella sua stabilità all’interno del genoma. Infatti parliamo di SNP solo quando l’allele più raro ha una frequenza maggiore o uguale all’1% della popolazione (84).

Ogni SNP ha due alleli che possono essere tra loro uguali o diversi e si diranno rispettivamente omozigoti o eterozigoti. Esistono 4 tipi fondamentali di SNPs classificati in transizioni e transversioni. Quando una pirimidina (C o T) viene sostituita sempre con una pirimidina o viceversa una purina è sostituita da un’altra purina, parliamo di transizione, mentre quando una purina viene sostituita con una pirimidina o viceversa parliamo di transversione. Le varianti più frequenti in questo senso sono le transizioni. (86)

A livello genomico le mutazioni possono verificarsi in qualsiasi regione, sia all'interno di geni e sia in zone introniche e possono avere o meno effetti sul fenotipo. Secondo un report pubblicato il 50% degli SNPs si verifica in regioni non codificanti, il 25% ha come conseguenza mutazioni missenso e l'altro 25% sono mutazioni silenti (85). Sostituzioni all'interno di geni possono portare a variazioni nella sintesi di proteine e quindi avere delle ripercussioni sul fenotipo e essere causa di patologie, anche gravi.

Mutazioni a di fuori delle sequenze esoniche del gene possono influire sia sulla sua espressione, andando magari ad alterare il suo promotore o possono andare a modificare lo *splicing* dell'RNA (87).

2.3 Studi e applicazioni degli SNPs

Esistono milioni di SNPs per ogni individuo e ciò ci può iniziare a far capire l'estrema utilità che possono avere in campi come la genetica forense ma non solo.

Gli SNPs non sono distribuiti uniformemente nel genoma e le loro frequenze possono variare di diverse centinaia di volte tra due regioni. In generale, gli SNP si verificano molto meno frequentemente in regioni del genoma codificanti rispetto alle regioni non codificanti (88, 89). Gli SNPs nelle regioni non codificanti, anche se non vanno ad alterare le proteine codificate, fungono da importanti marcatori genetici o fisici per studi di genomica comparativa o evolutiva. Infatti gli SNPs, se presenti nei siti regolamentari di un gene, possono influenzare i tassi di trascrizione causando cambiamenti nella produzione di codificati. Nelle regioni di codifica invece possono causare alterazioni nella struttura delle proteine e quindi alterare potenzialmente anche la loro funzione, portando allo sviluppo di malattie o cambiamenti in risposta ad un farmaco o a una tossina ambientale. Pertanto, gli SNP sono stati usati come marker molecolari in genetica delle malattie e studi

farmacogenomici. Negli studi di genetica delle malattie che utilizzano SNP, l'obiettivo è quello di identificare gli SNP che causano cambiamenti nei processi biologici cellulari che inducono stati malati (90-93). Un'altra importante applicazione in cui vengono utilizzati SNP come marcatori è negli studi di farmacogenomica (94-97). In tali studi l'obiettivo è quello di chiarire gli effetti dei polimorfismi genetici sulle risposte ai farmaci in modo da andare a predire eventuali reazioni avverse ai farmaci che potrebbero essere anche potenzialmente fatali.

Gli SNPs vengono utilizzati anche nella genetica forense per l'identificazione personale, la ricostruzione di linee parentali, la predizione dell'origine ancestrale di un individuo e la predizione dei caratteri fenotipici.

3. GENETICA E MESOTELIOMA

3.1 Biologia Molecolare del Mesotelioma Maligno

La genetica ha un ruolo di rilievo nella genesi del mesotelioma e non solo. Le linee guida per il mesotelioma pleurico stilate dall'Aiom (Associazione Italiana di Oncologia Medica) prevedono una sezione dedicata agli ultimi progressi della biologia molecolare nell'ambito del mesotelioma (98). È stato osservato che numerosi geni oncosoppressori sono alterati nel mesotelioma, in particolare NF2, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B (p15INK4b) e BAP1. NF2 è inattivato attraverso mutazioni e delezioni.

Il prodotto di NF2, la proteina neurofibromina 2 (o merlina), è una proteina di membrana associata al citoscheletro e regola diverse vie di trasmissione del segnale incluse la via del mTOR ed Hippo. L'inattivazione di NF2 è associata all'attivazione di mTOR e Hippo (99-103).

La delezione del locus 9p21 è una delle alterazioni più comuni e comporta la perdita di p16, p14 e p15, geni oncosoppressori che codificano per proteine inibitrici della kinasi ciclina-dipendente, fondamentale nella regolazione del ciclo cellulare. La delezione in omozigosi è l'alterazione che porta più frequentemente all'inattivazione di p16 ed è presente nel 70-85% dei mesoteliomi (più elevata nella forma sarcomatoide).

Mediamente, il 60% dei mesoteliomi è caratterizzato da perdita di BAP1 in seguito a delezioni e mutazioni geniche. Le mutazioni della linea germinale di BAP1 sono presenti in < 5% dei pazienti con mesotelioma. Non sembra esserci un'associazione tra mutazione di BAP1 e delezione di p16 o delezione/mutazione di NF2. BAP1 è una proteina nucleare con

funzione deubiquitinasi, critica anche nella regolazione dei meccanismi di riparo della doppia elica del DNA (104-117,118, 119).

Uno studio di sequenziamento di nuova generazione ha evidenziato la presenza di alterazioni geniche in 2 principali pathways:

1. p53/meccanismi di riparazione del DNA (TP53, SMACB1, BAP1);
2. phosphatidylinositol 3-chinasi (PIK3CA)-AKT (PDGFRA, KIT, KDR, HRAS, PIK3CA, STK11, NF2).

È stato inoltre osservato che l'attivazione di CTLA4 e del checkpoint PD-1/PD-L1, così come il ruolo prominente dell'angiogenesi con iperespressione di VEGFR, appaiono promettenti meccanismi biologici nella patogenesi del mesotelioma e nelle future scelte terapeutiche (119).

Alcune mutazioni di PIK3CA, STK11 e TP53 sono state associate al tempo di progressione di malattia ed il carico mutazionale nello stesso tumore era associato ad un tempo di progressione della malattia e a una sopravvivenza globale significativamente inferiori (120).

È interessante la recente evidenza di geni di fusione EWSR1/FUS-ATF1 in un subset di mesoteliomi insorti in soggetti particolarmente giovani senza apparente esposizione ad asbesto e con cellule neoplastiche BAP-1 positive (121).

3.2 Rischio e suscettibilità nel Mesotelioma

Sebbene il meccanismo esatto che porta allo sviluppo del mesotelioma maligno della pleura sia ancora poco conosciuto, le conclusioni di diversi studi che trattano della genetica relativa

a questa patologia sono concordi nell'affermare che la genetica ha un suo ruolo nello sviluppo del mesotelioma pleurico maligno.

Queste considerazioni ci hanno portato ad analizzare la letteratura su tale argomento.

Estremamente vasta è la letteratura che tratta dell'analisi genetica in funzione della prognosi del malato, di bersagli terapeutici e insorgenza di mutazioni della neoplasia stessa. Meno estesa risulta essere quella che si occupa di rischio e suscettibilità nei confronti dell'asbesto.

Tra i vari articoli spicca quello di Matullo et al. "Genetic Variants Associated with Increased Risk of Malignant Pleural Mesothelioma: A Genome-Wide Association Study" (122) che ha coinvolto moltissime risorse e istituti italiani e non.

L'articolo è uno studio Genome-Wide condotto al fine di identificare dei fattori genetici di rischio che possano contribuire allo sviluppo di mesotelioma pleurico maligno. Lo studio è stato condotto su un campione italiano composto da 407 casi e 389 controlli con una storia di esposizione all'asbesto. I risultati hanno mostrato che esiste associazione tra diversi SNPs e l'insorgenza del mesotelioma con elevati livelli di significatività come riportato nella Tabella 3.

Rilevanti sono stati i risultati riguardo la MMP14 ma abbassando ulteriormente la soglia di significatività scelta per discriminare l'analisi degli SNPs è stata inclusa un'altra metallopeptidasi, MMP8. Questo dato rafforza la convinzione che le metalloendopeptidasi hanno un ruolo rilevante.

Usando uno specifico software “GenomePipe tool” hanno visto che nessuno degli SNPs con i più alti livelli di significatività può prevedere un danno a livello fenotipico perché non si trovano in regioni regolatorie o in *splicing site*.

CHR Location	SNP	Ref. Allele	OR (95% CI)	P	Typed	Gene Name	Left Gene	Right Gene	Group
6q21	rs742109	A	0.55(0.43–0.71)	2.70×10^{-6}	Genotyped		PRDM1	ATG5	OVERALL
3q26.2	rs7632718	A	1.83(1.42–2.37)	3.71×10^{-6}	Genotyped	SLC7A14, CLDN11	CLDN11	RPL22L1	EXPOSED
3p24.2	rs9833191	C	0.54(0.41–0.71)	7.67×10^{-6}	Genotyped	THR8	NR1D2	MIR4792	EXPOSED
5q23.1	rs1508805	A	1.85(1.41–2.44)	1.04×10^{-5}	Genotyped		PRR16	FTMT	EXPOSED
1q25.2	rs2501618	A	2.18(1.53–3.10)	1.49×10^{-5}	Genotyped	CEP350	TOR1AIP1	QSOX1	EXPOSED
5q35.3	rs4701085	G	1.84(1.39–2.44)	1.93×10^{-5}	Genotyped	ADAMTS2	ZNF354C	AX747985	EXPOSED
4q22.1	rs4290865	A	1.98(1.44–2.71)	2.16×10^{-5}	Genotyped		FAM190A	GRID2	EXPOSED
13q14.3	rs9536579	A	0.54(0.40–0.72)	2.33×10^{-5}	Genotyped		OLFM5	MIR1297	OVERALL
7p21.2	rs3801094	A	1.75(1.35–2.27)	2.52×10^{-5}	Genotyped	ETV1	ARL4A	DGKB	OVERALL
8q24.21	rs7841347	A	0.60(0.47–0.76)	2.60×10^{-5}	Genotyped	PVT1	MYC	TMEM75	OVERALL
15q21.1	rs10519201	A	2.36(1.57–3.56)	3.82×10^{-5}	Genotyped	SHC4	EID1	SECISBP2L	EXPOSED
22q12.3	rs5756444	G	0.60(0.47–0.76)	3.95×10^{-5}	Genotyped		CSF2RB2	C22orf33/TEX33	EXPOSED

Tabella 3: Lista dei 12 “top SNP” italiani Matullo et al.

Una regione cromosomica importante nello studio è quella 3q26.2 dove è inserito il gene SLC7A14. Precedentemente non sono stati riportati collegamenti tra questo gene e il mesotelioma pleurico maligno ma la sua rilevanza in questo studio e in un altro con campioni australiani suggerisce un possibile futuro interesse per l’approfondimento di questa regione (123)

Altri 2 geni sono stati segnalati come alterati nel mesotelioma pleurico maligno e sono THR8 e MMP14.

THR8 codifica per l’ormone tiroideo del recettore beta ($TR\beta$) che possiede la funzione di oncosoppressore. Infatti sono stati fatti degli studi che hanno dimostrato che questo ormone è in grado di sopprimere la proliferazione e la trasformazione cellulare e il processo di cancerogenesi (124). Inoltre $TR\beta$ ostacola i fattori di crescita mitogeni sopprimendo l’attivazione delle chinasi extracellulari regolate dalle vie di segnalazione del fosfatidilinositolo 3-chinasi per sopprimere l’invasività delle cellule tumorali e la possibilità di dare metastasi (125, 126). Un dato di ulteriore interesse è che THR8 si trova a 28 Mb dal

gene BAP1, riconosciuto come mutato nel mesotelioma pleurico maligno (127). Inoltre sempre THRB è stato documentato in uno studio sul mesotelioma maligno che vedeva l'analisi genetica (con uno studio Genome-wide) della pleura dal lato parietale e viscerale (128).

L'altro gene interessante è l'MMP14 (metallopeptidasi della matrice 14) che è stato visto essere influente riguardo la sopravvivenza nei casi di mesotelioma pleurico maligno (129) ed è risultato essere rilevante anche in questo studio.

Ulteriori SNPs di notevole importanza sono localizzati a livello di geni come CEP350, ETV1 e SHC4 anche se non sono mai stati associati con il mesotelioma pleurico maligno ma il loro intervento è stato riportato in altre tipologie di neoplasie (130, 131, 132). Questo ci fa pensare che possano anche intervenire nello sviluppo del MPM.

Sempre riguardo il tema della suscettibilità genetica allo sviluppo di mesotelioma abbiamo considerato lo studio di Tunesi et al. (133) per andare a identificare i fattori genetici che possano interagire con il rischio di mesotelioma pleurico maligno. Tunesi et al. hanno condotto uno studio includendo 15 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) identificati nel precedente studio GWAS su soggetti italiani condotto da Matullo et al (122).

Nella Tabella 4 sottostante sono riportati tutti i risultati ottenuti con gli SNPs studiati, le mutazioni riscontrate e i dati statistici che mettono in relazione, esposizione o non esposizione all'asbesto e presenza o meno dello SNP mutato.

	SNP	EXP	Genotype (code)	Cases (N)	Controls (N)	OR*	(95%CI)
1	rs2236304 (MMP14)	0	CC (0)	4	57	1	
		0	CG/GG (1)	13	56	3.34	(1.00-11.09)
		1	CC (0)	108	116	16.00	(5.45-46.98)
2	rs742109	1	CG/GG (1)	231	138	28.87	(9.95-83.78)
		0	GG (0)	9	43	1	
		0	AG/AA (1)	8	70	0.52	(0.18-1.48)
3	rs1508805	1	GG (0)	120	67	10.25	(4.50-23.35)
		1	AG/AA (1)	219	187	6.62	(3.03-14.46)
		0	GG (0)	15	63	1	
4	rs2501618 (CEP350)	0	AG/AA (1)	2	50	0.19	(0.04-0.87)
		1	GG (0)	156	158	5.22	(2.74-9.94)
		1	AG/AA (1)	183	96	10.33	(5.35-19.93)
5	rs4701085	0	GG (0)	14	76	1	
		0	AG/AA (1)	3	37	0.53	(0.14-1.99)
		1	GG (0)	212	202	7.20	(3.78-13.73)
6	rs4290865	1	AG/AA (1)	126	52	17.41	(8.61-35.21)
		0	AA (0)	13	56	1	
		0	AG/GG (1)	4	57	0.31	(0.09-1.03)
7	rs9536579	1	AA (0)	132	158	4.64	(2.31-9.32)
		1	AG/GG (1)	207	106	10.47	(5.17-21.20)
		0	CC (0)	9	64	1	
8	rs3801094 (ETVT1)	0	AC/CC (1)	7	49	0.86	(0.29-2.52)
		1	CC (0)	186	182	7.97	(3.73-17.03)
		1	AC/CC (1)	148	71	17.21	(7.81-37.91)
9	rs7841347 (PVT1)	0	GG (0)	11	60	1	
		0	AG/AA (1)	6	53	0.55	(0.19-1.64)
		1	GG (0)	221	130	10.93	(5.30-22.54)
10	rs10519201 (SHC4)	1	AG/AA (1)	118	124	5.80	(2.79-12.08)
		0	GG (0)	5	59	1	
		0	AG/AA (1)	12	54	2.94	(0.95-9.14)
11	rs5756444	1	GG (0)	130	128	15.58	(5.83-41.68)
		1	AG/AA (1)	197	122	25.13	(9.42-67.07)
		0	AA (0)	7	37	1	
12	rs7841347 (PVT1)	0	AG/GG (1)	10	76	0.66	(0.23-1.91)
		1	AA (0)	97	54	11.56	(4.60-29.06)
		1	AG/GG (1)	242	200	7.42	(3.10-17.75)
13	rs10519201 (SHC4)	0	CC (0)	14	86	1	
		0	AC/AA (1)	3	27	0.62	(0.16-2.39)
		1	CC (0)	240	215	8.03	(4.23-15.23)
14	rs5756444	1	AC/AA (1)	99	39	20.21	(9.76-41.87)
		0	AA (0)	3	47	1	
		0	AG/GG (1)	14	66	3.37	(0.90-12.64)
15	rs7632718 (SLC74A14)	1	AA (0)	146	81	35.83	(10.44-112.96)
		1	AG/GG (1)	193	173	21.34	(6.66-71.95)
		0	GG (0)	5	28	1	
16	rs9833191 (FHRB)	0	GA/AA (1)	12	85	0.68	(0.21-2.16)
		1	GG (0)	72	88	4.56	(1.62-12.92)
		1	GA/AA (1)	267	166	10.04	(3.67-27.64)
17	rs9833191 (FHRB)	0	TT (0)	7	47	1	
		0	TC/CC (1)	10	66	1.22	(0.42-3.55)
		1	TT (0)	146	64	19.79	(8.10-48.33)
18	rs10815216	1	TC/CC (1)	193	190	9.29	(3.91-22.06)
		0	AA (0)	13	38	1	
		0	AC/CC (1)	4	75	0.17	(0.05-0.59)
19	rs73034881 (SDK1/FOXK1)	1	AA (0)	151	80	6.95	(3.33-14.51)
		1	AC/CC (1)	188	174	3.92	(1.19-8.05)
		0	GG (0)	14	72	1	
20	rs73034881 (SDK1/FOXK1)	0	AG/AA (1)	3	41	0.34	(0.09-1.29)
		1	GG (0)	253	154	9.73	(5.11-18.51)
		1	AG/AA (1)	86	100	5.16	(2.61-10.20)

Tabella 4. Analisi statistica (OR), SNPs e esposizione all'asbesto. Per la variabile "esposizione" lo 0 sta per "mancata esposizione" mentre l'1 "esposizione", invece per le varianti genotipiche 0 indica la condizione di omozigosi per l'allele non mutato e 1 indica la presenza dell'allele mutato sia in omozigosi che in eterozigosi.

Come possiamo vedere dalla Tabella 4 per ogni gene è stata eseguita un'analisi che tenesse in considerazione l'interazione tra geni e esposizione ambientale all'asbesto. Dall'analisi statistica condotta si evince che per rs22236304 il rischio di mesotelioma aumenta in soggetti non esposti che presentano l'allele variato in confronto a quelli non esposti che presentano l'allele più diffuso; il dato aumenta ulteriormente se sono presenti entrambi i fattori.

Rs1508805, rs2501618, rs4701085, rs4290865, rs10519201 and rs7632718 mostrano risultati simili, per i soggetti portatori abbiamo osservato la presenza di nessun'effetto, a tratti protezione, per i soggetti non esposti mentre il rischio aumenta in quelli esposti.

Per rs5756444 in assenza di esposizione l'allele meno frequente triplica il rischio mentre per gli esposti non sono stati mostrati effetti.

Per rs1508805 in assenza di esposizione l'allele minore conferisce protezione mentre l'esposizione raddoppia il rischio.

L'analisi GMDR per verificare l'interazione di più SNPs non mostra un modello che rappresenti in maniera soddisfacente le caratteristiche esatte richieste da un modello corretto.

L'unico modello che rispetti, non totalmente, le caratteristiche è quello che include gli SNP: rs2501618, rs1508805, rs5756444 e l'esposizione all'asbesto come notiamo nella Tabella 5.

	TBA	Sign test (p)	CV	OR (95%CI)	χ^2 (p)
EXP	0.6339	10 (0.001)	10/10	9.71 (4.20–22.44)	37.32 (<0.001)
EXP rs7632718	0.6166	10 (0.001)	6/10	3.88 (2.38–6.30)	31.22 (<0.001)
EXP rs4701085 rs1508805	0.6269	10 (0.001)	3/10	5.29 (3.18–8.80)	43.85 (<0.001)
EXP rs1508805 rs2501618 rs5756444	0.6445	10 (0.001)	5/10	6.64 (3.60–11.30)	53.17 (<0.001)
EXP rs1508805 rs2501618 rs5756444 rs7632718	0.6264	10 (0.001)	3/10	7.13 (4.25–11.97)	60.21 (<0.001)

Tabella 5. Risultati migliori per test di interazione tra SNPs esposizione all'asbesto nel rischio di MPM

Anche Cadby et al. (134) con l'adesione di Matullo, hanno condotto uno studio di tipo GWAS per ricercare eventuali varianti genetiche che possano avere un ruolo nella

suscettibilità al mesotelioma maligno. Infatti, anche nell’Australia occidentale tra il 1943 e il 1966 la crocidolite era estratta e macinata all’interno di miniere nella città di Wittenoom e questo ha portato numerosi ex-lavoratori e residenti di quella città ad essere esposti a pericolosi livelli di amianto.

Nonostante il tentativo di replicazione dello studio GWAS italiano le evidenze trovate non hanno dato risultati concordanti a quelli di Matullo, probabilmente a causa di variabili come l’eterogeneità del campione e la differenza dell’esposizione alla specifica tipologia di amianto.

In questo caso lo SNP più rilevante è l’rs17338032 localizzato nell’introne 6 del gene CRTAM. Questo SNP non sembra avere un funzione regolatoria però il gene CRTAM è altamente espresso nelle cellule CD8+ umane attivate e dalle cellule T natural killer (135), è espresso nel polmone e si pensa che sia coinvolto nell’adesione delle cellule epiteliali (135, 136, 137).

L’Sdk1 e la regione attorno a questo gene ha mostrato il risultato più coerente sia nello studio australiano che in quello italiano, infatti lo SNP più rilevante è l’rs12540101 e si trova nell’introne 4 del gene Sdk1 che codifica per una molecola di adesione indotta dalle cellule tumorali in caso di stress cellulare, in particolare quando abbiamo l’aumento di specie reattive dell’ossigeno, prodotti caratteristici dalle fibre d’asbesto depositate nel parenchima polmonare.

Anche il gene RASGRF2 ha destato interesse, codifica per un fattore di scambio nucleotidico regolato dal calcio e coinvolto nella via di segnalazione di RAS. RAS-GRF2 regola la conversione dei i movimenti delle cellule tumorali da allungata a arrotondata (138 -141).

Nelle linee cellulari di melanoma l'esaurimento di RASGRF2 è stato aumentato per incrementare la capacità invasiva delle cellule nella matrice tridimensionale.

Nessuno dei tre geni tra CRTAM, SDK1 e RASGRF2 sono mai stati segnalati in associazione al mesotelioma maligno. Questi geni sono stati associati all'adesione e alla migrazione cellulare e potrebbero avere un ruolo importante nella risposta dell'ospite alle fibre d'asbesto.

4. SCOPO DELLA TESI

In accordo con quello sopracitato, l'essere entrati a contatto e aver inalato fibre d'asbesto non è una condizione sufficiente e necessaria allo sviluppo di mesotelioma pleurico maligno ma può essere, unito ad altri fattori, un forte causa predisponente allo sviluppo di tale malattia.

Oltre questo dato, il lungo periodo di incubazione prima dello sviluppo e manifestazione della patologia porta a pensare che ci sia qualcos'altro che intervenga nella genesi della neoplasia.

In letteratura sono state fatte numerose teorie che ipotizzano la presenza di una predisposizione genetica, forti anche degli studi che hanno scoperto un rischio aumentato in pazienti consanguinei.

Questo progetto nasce quindi con lo scopo di andare a verificare se degli SNP's, selezionati dall'articolo di Tunesi et al., presenti all'interno del genoma di un individuo siano in grado di aumentare, o al contrario ridurre, la suscettibilità di un paziente allo sviluppo di mesotelioma pleurico maligno una volta entrato a contatto con fibre d'asbesto.

Una volta informati sulla letteratura riguardante l'argomento abbiamo scelto quegli SNPs che mostravano i risultati più rilevanti all'interno dello studio di Tunesi et. al e abbiamo deciso di studiarli sul nostro campione. Gli SNPs scelti sono stati rs2501618, rs1508805, rs2236304, rs742109, rs10519201, rs5756444, rs7632718 perché a seguito dell'analisi statistica, riportata sull'articolo e che metteva a confronto i dati ottenuti, questi polimorfismi mostravano valori di rischio maggiori riguardo la relazione tra l'esposizione d'asbesto e la loro presenza.

Il riscontro della frequenza di alcuni polimorfismi che impongono la suscettibilità all'asbesto potrebbero portare ad incrementare l'attenzione sanitaria verso quella popolazione di lavoratori a rischio. Conseguentemente all'aumento della sorveglianza sarebbe possibile anche effettuare una diagnosi più precoce di mesotelioma.

5. TECNICHE D'ANALISI

5.1 Estrazione del DNA in fase solida

Negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi di estrazione in fase solida per il DNA che consentono un alto rendimento in termini di quantità di DNA estratto. Per il nostro studio abbiamo utilizzato il kit QIAamp® DNA Micro della QIAGEN® (Figura 8). Nel kit vengono forniti tutti i materiali necessari all'estrazione del DNA.



Figura 8. Componenti del kit utilizzato QIAamp® DNA Micro della QIAGEN®

Nell'estrazione del DNA su matrice solida gli acidi nucleici, in presenza di sali caotropici come guanidina isotiocianato, ad adsorbirsi selettivamente alla silice di una matrice solida, nel nostro caso la membrana sul fondo della colonnina d'estrazione (142). Questi Sali caotropici distruggono i legami idrogeno in acqua e rendono quindi le proteine denaturate e gli acidi nucleici più termodinamicamente stabili rispetto alla forma nativa (143). Se la soluzione ha un pH di 7,5, l'adsorbimento del DNA alla silice è in genere attorno al 95% e tutte le impurità possono essere lavate via durante le varie fasi di lavaggio. In condizioni alcaline e in basse concentrazioni di sale il DNA eluirà più agevolmente dalla silice a cui era

legato. Questo processo di estrazione viene eseguito in centrifugazione per facilitare il passaggio del DNA e dell'eluito di scarto attraverso la membrana di estrazione (144).

5.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

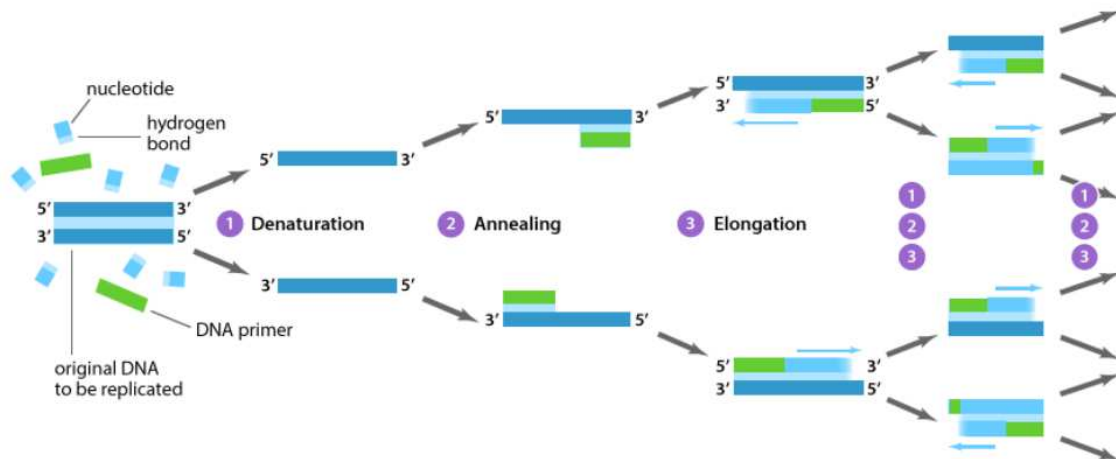


Figura 9. Rappresentazione schematica delle varie fasi della PCR dove si nota la resa esponenziale della reazione di amplificazione.

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica di amplificazione esponenziale di frammenti target di acido nucleico ed è basata su 3 fasi che prevedono variazioni cicliche di temperatura (Figura 9).

È una tecnica estremamente versatile e rivoluzionaria per moltissimi campi di studio, dalla diagnostica agli studi forensi (145).

La tecnica prevede l'iniziale allestimento di una reazione con tutti i componenti necessari alla reazione di amplificazione del frammento.

Necessiteremo principalmente quindi di:

- 2 Primer: oligonucleotidi che saranno il punto di inizio della fase di sintesi, e vengono progettati in base alla composizione della sequenza e durante la reazione uno si legherà al filamento *forward* e l'altro a quello *reverse*;
- dNTPs: deossinucleotidi 5'-trifosfato di adenina, timina, citosina e guanina che sono l'unità fondamentale che andrà poi a costituire il nuovo filamento;
- DNA polimerasi: enzima essenziale che catalizza la reazione allungamento con l'opportuna incorporazione dei dNTPs, la Taq polimerasi è la tipologia più diffusa perché a differenza di molti altri enzimi che catalizzano questa reazione, questa è in grado di lavorare ad alte temperature senza subire processi di degradazione;
- Buffer contenente magnesio e altri sali che ottimizzano il lavoro dell'enzima;
- Sequenza da amplificare.

Una volta allestita la reazione si pone la provetta in un termociclatore che è il macchinario apposito per le reazioni di PCR poiché esegue delle variazioni cicliche di temperatura essenziali per le fasi da cui è composta la reazione:

- Denaturazione (~ 94°C): i frammenti di DNA sono costituiti da due filamenti tenuti insieme da dei legami idrogeno che ad alte temperature vengono scissi permettendo la separazione dei 2 filamenti e rendendoli disponibili alle successive fasi
- Annealing (~ 60°C): i due filamenti sono separati e con l'abbassamento della temperatura viene favorito il legame con i due primer in corrispondenza delle regioni complementari;
- Allungamento (~ 72 °C): La Taq polimerasi inizia la sua attività catalizzando l'inserimento dei vari nucleotidi trifosfato a partire dai primer legati durante la fase precedente.

Il grande vantaggio di questa tecnica è quello di aumentare in maniera esponenziale i filamenti disponibili della nostra sequenza target permettendo di lavorare con quantità più elevate di DNA (146, 147)

Allo stesso tempo lo svantaggio da tenere in considerazione sono gli errori che possono essere compiuti dalla Taq polimerasi durante la sua attività di incorporazione. Questo perché tale enzima non possiede un'attività esonucleasica 3' – 5', ed è quindi incapace di correggere errori eventuali originati dall'errata incorporazione di un nucleotide non complementare. Questo rischio è presente anche se con una frequenza molto bassa. Riguardo la Taq polimerasi il tasso è di $1 - 20 \times 10^{-5}$ (148)

5.3 Hot Start PCR

È una tecnica che possiede lo stesso principio della PCR ma con piccole accortezze che permettono di incrementare la performance della reazione di amplificazione aumentando la stringenza, la sensibilità e la specificità.

Il principio base è quello di impedire che la DNA polimerasi inizi la fase di allungamento prima che la denaturazione dei frammenti di DNA sia avvenuta. Questo può verificarsi nella fase iniziale quando la quantità di primers è in notevole eccesso rispetto al target da amplificare e questo può portare, durante la fase di salita della temperatura, a legami aspecifici come dimeri di primer o legami dei primer a zone diverse da quella target.

Questa tecnica punta a bloccare l'attività della DNA polimerasi fino a quando la temperatura all'interno del termociclato non ha raggiunto il valore desiderato per l'iniziale denaturazione (149). Infatti la tecnica Hot Start PCR si avvale dell'utilizzo di una Taq polimerasi che per iniziare a funzionare necessita di una "partenza a caldo" e per questo

studio è stata utilizzata la HotStartTaq della Quiagen. Si tratta di un enzima ricombinante che a temperatura ambiente risulta essere inattivo fino a quando non avviene un'iniziale incubazione a 95 °C per 15 minuti (150, 151). In più, sempre per ridurre al massimo la possibilità di formazione di prodotti aspecifici, viene utilizzato un buffer di amplificazione già pronto all'uso e contenente KCl, (NH₄)₂SO₄ e Mg⁺⁺ che garantiscono le condizioni di stringenza adeguate.

5.4 TapeStation System

È uno strumento utilizzato per l'analisi quantitativa e qualitativa degli ampliconi. Il principio base è un'elettroforesi automatizzata su gel di agarosio. La particolarità e l'ottimizzazione del processo sta nell'utilizzo di una *Screen Tape* (Figura 10) costituita da capillari estremamente sottili contenenti un mezzo di separazione alla cui estremità superiore è presente una camera tampone contenente un buffer che ottimizza la corsa elettroforetica mentre alle due estremità terminali del capillare sono presenti gli elettrodi che una volta avviata la corsa elettroforetica applicano una corrente elettrica, lungo il gel, che separa i nostri frammenti di DNA precedentemente amplificati.

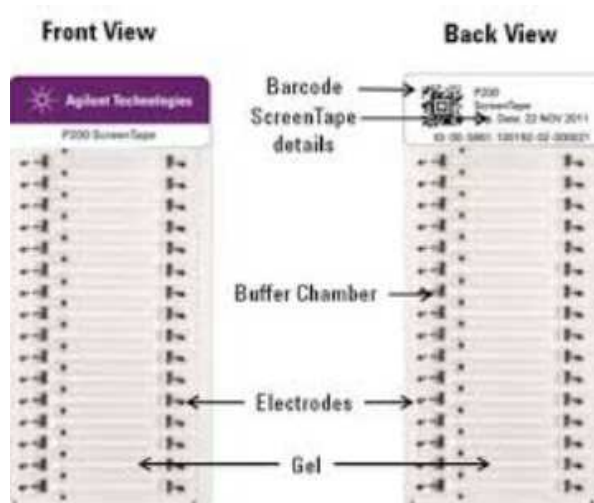


Figura 10. Esempio di *Screen Tape* utilizzata per lo studio

Lo strumento segnala il termine della corsa e il risultato finale è composto da un'immagine del gel d'agarosio ad alta risoluzione, un'elettroferogramma e una tabella con i dettagli dell'amplicone analizzato tra cui una stima della sua concentrazione.

5.5 Elettroforesi Capillare

I frammenti di DNA possono essere separati mediante elettroforesi, che sfrutta la carica intrinseca di cui è dotato il DNA. Infatti i gruppi fosfato che vanno a comporre lo scheletro dei due filamenti hanno una carica negativa, perciò, se vengono messi all'interno di un campo elettrico, tenderanno a spostarsi verso il polo positivo o anodo.

La corsa elettroforetica tradizionale si sviluppa lungo una lastra di gel con una certa concentrazione, in questo caso invece avviene all'interno di un capillare al cui interno viene iniettato un polimero che ha la stessa funzione del gel, quella di setaccio molecolare. Il polimero ha infatti una struttura microscopica tale da permettere ai frammenti più piccoli di muoversi più rapidamente e con più agilità attraverso i pori mentre le molecole più grandi avranno una corsa più lenta data dalla loro complessità spaziale (152).

La conduzione di uniforme e regolare della corrente elettrica attraverso il sistema elettroforetico è garantita dalla presenza di una soluzione tampone salina che grazie al movimento degli ioni che la compongono, che corrono assieme alla molecole, facilitano la corsa dei frammenti (87).

La velocità di migrazione dei frammenti dipende da diverse variabili del sistema. È direttamente proporzionale alla carica dello ione e al campo elettrico applicato mentre è inversamente proporzionale alla dimensione della molecola e alla viscosità della matrice e alla porosità del mezzo di migrazione.

A livello pratico lo strumento Applied Biosystem® 3130 Genetic Analyzer è costituito da 4 capillari e all'interno di ognuno avviene la corsa elettroforetica di un campione (Figura 11). La migrazione dei frammenti è seguita attraverso la rilevazione delle emissioni di fluorescenza, a differenti lunghezze d'onda, prodotte dai diversi fluorocromi legati alla parte terminale del frammento che migra a seguito dell'eccitazione provocata da un laser.

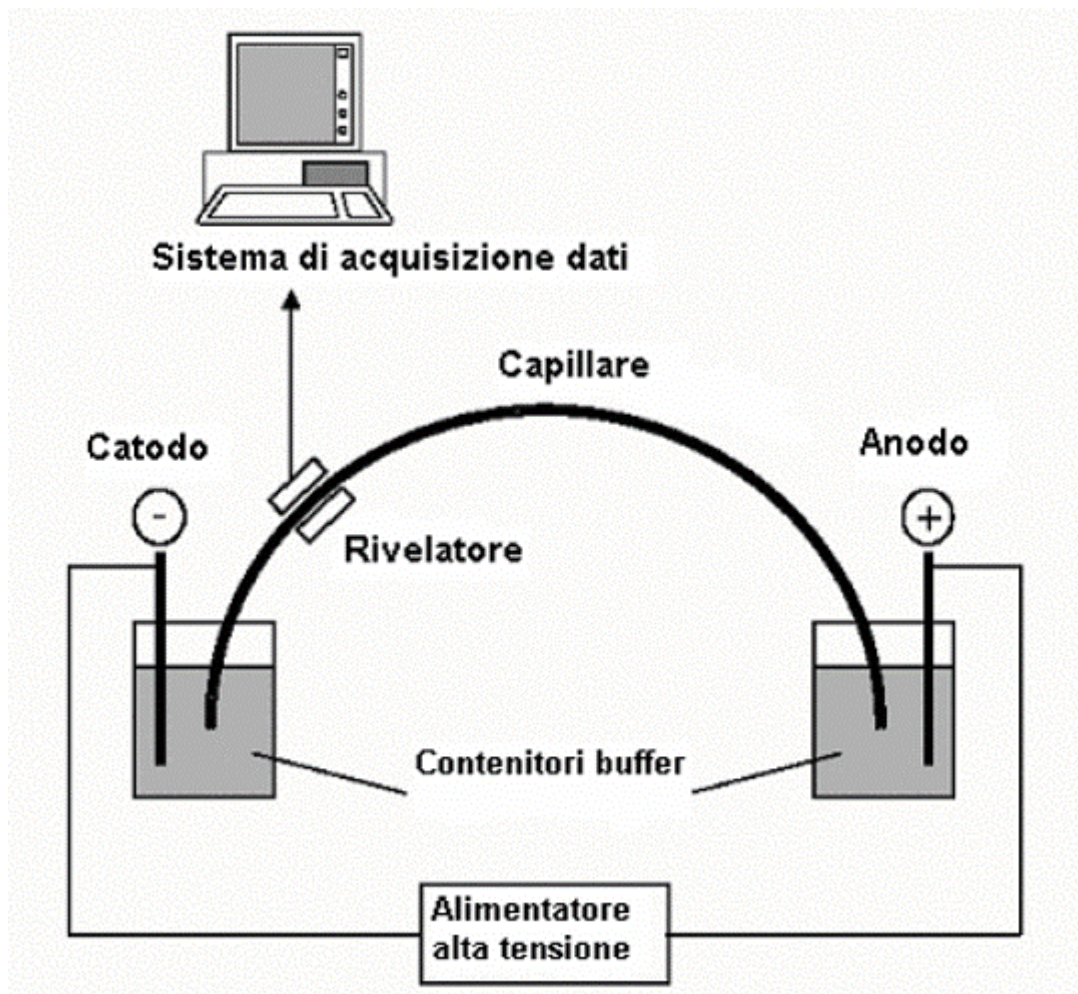


Figura 11. Rappresentazione schematica del processo di elettroforesi capillare e relativi componenti.

Man mano, spinti dal campo elettrico generato, i vari frammenti di DNA raggiungono la parte terminale del capillare dove un rivelatore (*detector*) rileva le emissioni dei vari

fluorocromi che vengono raccolte e analizzate da una camera CCD (*charge coupled device*) che elabora i diversi segnali fluorescenti con un'elevata sensibilità.

La sequenza dei segnali fluorescenti letta viene visualizzata in un grafico, elaborato sul computer, costituito da una serie di picchi di quattro colori diversi, ognuno corrispondente ad uno specifico fluorocromo e di conseguenza alla corrispondente base azotata terminale (153).

5.6 Sequenziamento di Sanger

Il sequenziamento del DNA è il processo che permette di determinare l'esatta sequenza delle basi nucleotidiche che vanno a comporre la nostra sequenza target. Questo è un ambito in piena e costante evoluzione che ha le sue radici nella seconda metà del novecento, quando Frederick Sanger elabora un metodo su base enzimatica per sequenziare il DNA (154).

Negli anni il progresso scientifico ha portato all'evoluzione di queste tecniche approdando all'elaborazione di tecniche di sequenziamento di nuova generazione ma il metodo Sanger rimane comunque il più sicuro e accurato. Infatti il sequenziamento di Sanger rimane la tecnica d'eccellenza per l'individuazione e la caratterizzazione di mutazioni.

La tecnica ha un principio enzimatico e si basa sull'utilizzo di nucleotidi dideossitriofosfato, molecole artificialmente modificate in modo tale da impedire il proseguimento della sintesi del filamento complementare. Questo a causa dell'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2' e 3' che impedisce al nucleotide successivo di legarsi, poiché a causa di questa mancanza non può formarsi il legame fosfodiesterico determinando la fine della reazione.

Per poter visualizzare la reazione i nucleotidi modificati devono essere marcati (radioattivamente o con molecole fluorescenti) in modo da poter poi successivamente rendere visibile, allo strumento per l'elettroforesi, le bande di frammenti di DNA.

Inizialmente venivano allestite quattro reazioni diverse contenenti, in tutte, DNA polimerasi e deossinucleotidi mentre singolarmente venivano poi aggiunti i nucleotidi dideossi, una tipologia diversa per ogni reazione, in una concentrazione molto inferiore a quelli deossi ma tale da poter garantire un allungamento sufficiente dei vari frammenti prima dell'inserimento dei nucleotidi dideossi. Da questa reazione originano una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa e interrotti in corrispondenza dell'incorporazione casuale del dideossinucleotide da parte della DNA polimerasi (155)

Attualmente è possibile eseguire le quattro reazioni distinte in un'unica provetta grazie all'utilizzo di dideossinucleotidi marcati con molecole fluorescenti diverse tra loro.

Il kit utilizzato è il BigDye® Terminator che contiene nucleotidi costituiti da una fluoresceina donatrice che si lega attraverso un *linker* a una diclororodamina accettrice. Nello strumento un laser va ad eccitare la fluoresceina la fluoresceina che assorbe l'energia di eccitazione e la trasferisce alle quattro dRodamine accettrici. Queste, una volta eccitate, emettono luce a diverse lunghezze d'onda che danno origine alle quattro colorazioni che identificano la specifica base incorporata: il verde per l'adenina, il nero per la guanina, il rosso per la timina e il blu per la citosina (156).

6. MATERIALI E METODI

6.1 Selezione dei campioni

I campioni sono stati scelti in funzione dello scopo dello studio e dell'anamnesi e appartenevano a soggetti con anamnesi lavorativa collegata all'esposizione di asbesto e con diagnosi, o con forte sospetto, di mesotelioma pleurico maligno.

Lo studio è di tipo longitudinale di coorte retrospettivo e il fine è quello di individuare la ricorrenza di alcuni polimorfismi che stabiliscano la propensione del soggetto, una volta entrato a contatto con una massiccia, o meno, dose di asbesto, allo sviluppo di mesotelioma pleurico. Per questo abbiamo deciso di valutare campioni di sangue post-mortem refrigerati a -20 °C, essendo un tessuto sano non interessato dalla neoplasia, e di evitare campioni prelevati direttamente dalla neoplasia stessa, a causa della possibilità di mutazione indotta dalla trasformazione neoplastica.

La maggior parte dei pazienti selezionati presentavano nelle loro cartelle cliniche dati sulla loro passata esposizione lavorativa anche se non tutti mostrano una conta delle fibre con un valore sufficiente ad attestare con certezza la loro esposizione lavorativa alle polveri d'asbesto. Infatti i "criteri di Helsinki" hanno stabilito che l'esposizione lavorativa alle polveri di asbesto è altamente probabile in caso di riscontro di oltre 1000 corpi dell'asbesto per grammo di tessuto secco (pari a circa 100 corpi per grammo di tessuto umido) alla misurazione eseguita tramite microscopia ottica (157).

Sono stati selezionati ugualmente quei casi che presentavano un'anamnesi lavorativa certa o probabile anche senza un numero sufficiente di corpi d'asbesto per grammo poiché non

sempre la conta, effettuata su un campione bioptico, è rappresentativa dell'effettiva e reale numero di corpi d'asbesto all'interno del parenchima polmonare.

Nella Tabella 6 che segue abbiamo riportato tutti i dati dei campioni scelti.

Campione	Diagnosi	Esposizione lavorativa	Conta dei corpi su tessuto secco
58-16	Sindrome asfittica da annegamento in soggetto portatore di mesotelioma pleurico	Probabile	0 ca/g
135-16	Insufficienza respiratoria da mesotelioma pleurico per esposizione lavorativa a fibre d'asbesto	Si	44000 ca/g
150-16	Insufficienza multiorgano in portatore di mesotelioma pleurico in fase terminale	Si	15838,7 ca/g
4-17	Mesotelioma pleurico, cachessia neoplastica	Si	102708,4 ca/g
24-17	Mesotelioma pleurico sarcomatoide con metastasi	Si	369,3 ca/g
68-17	Scompenso cardiaco acuto in soggetto affetto da cachessia neoplastica terminale per mesotelioma pleurico	Si	2254,9 ca/g
147-17	Mesotelioma maligno pleurico metastatico	Si	129 ca/g
185-17	Mesotelioma pleurico del polmone destro	Probabile	0 ca/g
75-18	Mesotelioma pleurico, cachessia neoplastica	Si	421 ca/g
149-18	Insufficienza cardio-respiratoria in paziente affetto da mesothelioma pleurico e/o carcinoma polmonare	Si	1385 ca/g

Tabella 6. Tabella riassuntiva delle caratteristiche del campione scelto per lo studio

6.2 Scelta dei polimorfismi

Precedentemente abbiamo citato tre importanti studi che trattano il tema della suscettibilità alle fibre d'asbesto correlato al rischio di sviluppare un mesotelioma pleurico maligno.

I risultati trovati da questi studi mostrano similitudini e differenze e non sempre sono stati concordi, ciò ha reso più complicata la scelta dei polimorfismi da utilizzare nel nostro studio.

Abbiamo scelto di direzionarci verso i due studi italiani piuttosto che verso quello australiano in modo da garantire una maggiore uniformità della popolazione e eliminare al massimo le variabili esterne. Matullo et. al (122) a seguito del loro studio GWAS hanno stilato una classifica di quelli che erano i 12 SNPs che avevano mostrato i risultati più rilevanti e similmente Tunesi et al. (133) hanno studiato questi SNPs, assieme ad altri.

Abbiamo deciso quindi di scegliere 7 dei polimorfismi più studiati sia da Matullo che da Tunesi (Tabella 7, Figura 12-18) in modo da avere più studi come linee guida e con cui confrontare i risultati al termine del nostro studio.

	Polimorfismo	Riferimento/Variante	Gene	Localizzazione genetica	Localizzazione cromosomica
1	rs2501618	T > C	CEP350	Variante intronica	1:179989674
2	rs1508805	A > G	-	Extra-genico	5: 121634753
3	rs2236304	C > G	MMP14	Variante intronica	14:22843654
4	rs742109	T > C	-	Extra-genico	6:106146349
5	rs10519201	G > A, T	SHC4	Variante Intronica	15:48929394
6	rs5756444	T > C	-	Extra-genico	22:36982410
7	rs7632718	A > G	SLC7A14	Variante intronica	3:170514619

Tabella 7. Polimorfismi scelti e loro caratteristiche. La base di riferimento e il relativo SNP sono stati presi dal sito <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

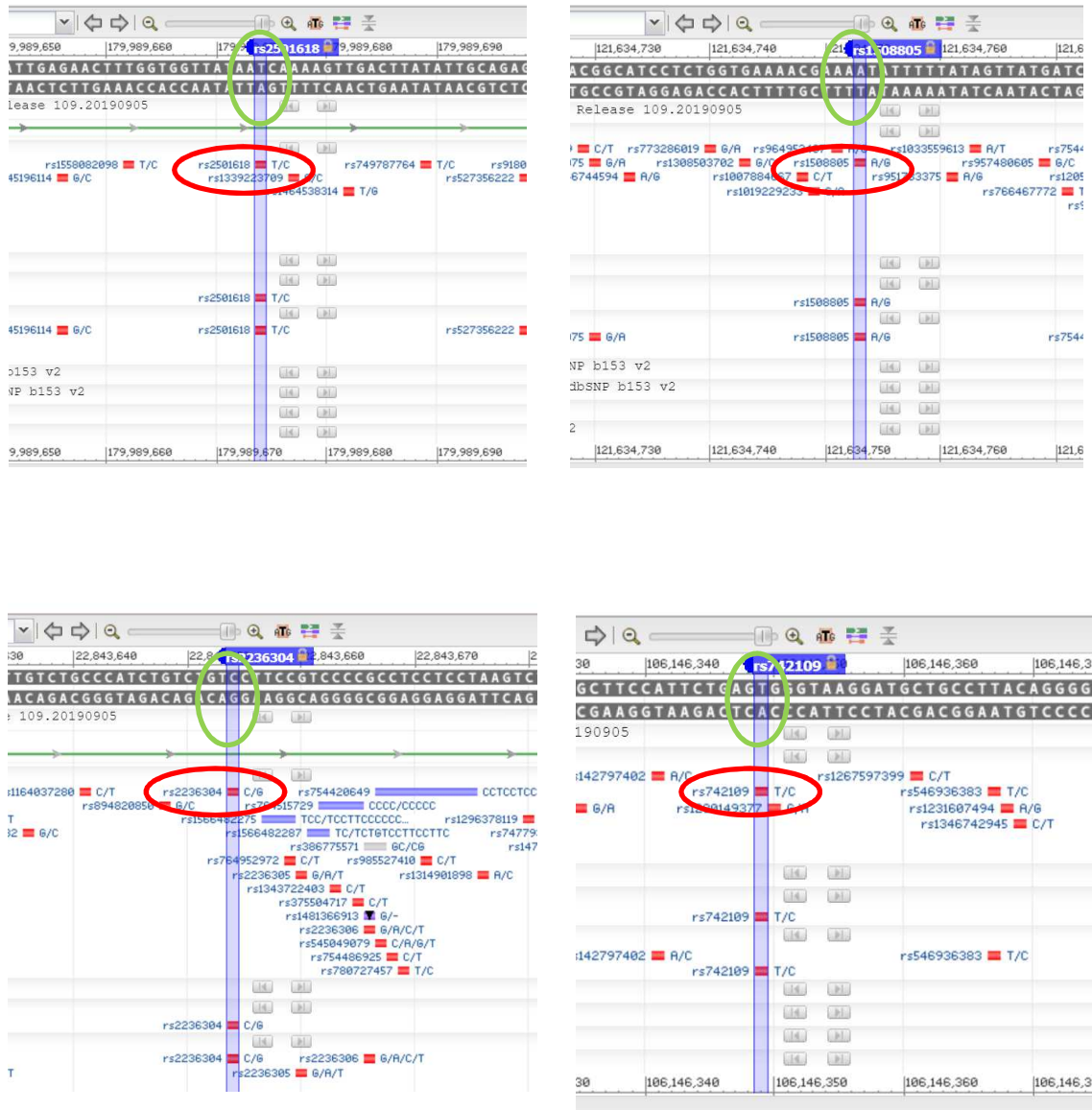


Figure 12–15. Localizzazione genetica degli SNPs, presa da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, utilizzati nello studio. In quelli appartenenti a varianti introniche di sequenze geniche possiamo apprezzare la presenza dell'introne (in verde). Cerchiato in rosso abbiamo cerchiato il nostro SNP con la variante mutata segnalata da NCBI, in verde la variante di riferimento nella sequenza di NCBI.

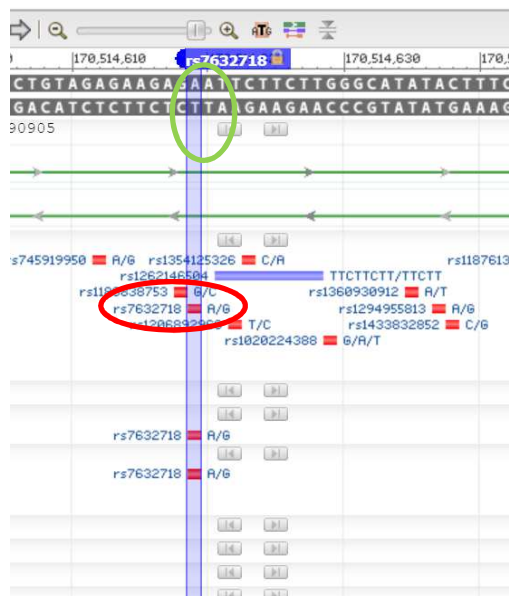
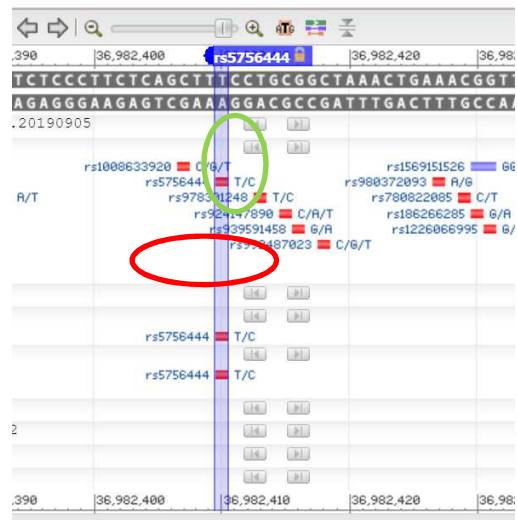
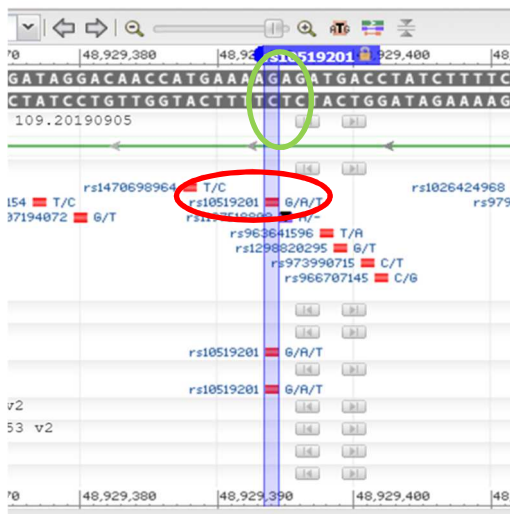


Figure 16 – 18. Localizzazione genetica degli SNPs, presa da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, utilizzati nello studio. In quelli appartenenti a varianti introniche di sequenze geniche possiamo apprezzare la presenza dell'introne (in verde). Cerchiato in rosso abbiamo cerchiato il nostro SNP con la variante mutata segnalata da NCBI, in verde la variante di riferimento nella sequenza di NCBI.

6.3 Disegno dei primers

Una volta scelti i polimorfismi da studiare siamo andati a cercare le sequenze corrispondenti agli SNPs da studiare (www.ncbi.nlm.nih.gov) e abbiamo iniziato a disegnare le sequenze dei primer di innesco per le nostre reazioni di sequenza. Abbiamo utilizzato il software Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/primer-blast). Per ogni regione sono state inserite nel programma sequenze di circa 300 paia di basi, in modo che l'elaboratore potesse ricercare il primer più adeguato. Il programma consente di immettere una sequenza alla volta e successivamente di scegliere le coppie di primers con i parametri cercati.

Le caratteristiche che su cui abbiamo posto attenzione sono state:

- Lunghezza ottimale tra i 20 e i 30 nucleotidi;
- Quantità di nucleotidi GG tra il 20% e l'80%;
- Evitare sequenze ripetitive di regioni contenenti *stretches* dello stesso nucleotide per limitare il fenomeno dello *slipping* del primer sul DNA stampo;
- Evitare code di tre o più G o C in 3' che possono portare ad un appaiamento scorretto su regioni ricche di GC;
- Evitare la formazione di strutture secondarie che portino ad appaiamenti interni al *primer* o appaiamenti con altri *primers*, portando alla formazione di dimeri aspecifici;
- Range di temperatura di Melting tra 58.0 °C e 64.0 °C con massimo 3 °C di differenza per coppia di *primers*.

Tutti questi parametri sono stati testati dal software in automatico e sono state scartate le variabili non idonee. In seguito le coppie di *primers* sono state ispezionate tramite il database NCBI-dpSNP per verificare l'assenza di SNPs con frequenza significativa per la popolazione

europea nelle regioni d'appaiamento. Tutto questo al fine di evitare errori di appaiamento tra *primers* e *target*.

Le varie coppie di primer ottenute sono rappresentate nella Tabella 8 e nella tabella 9.

GenBank/dbSNP accession	Localizzazione cromosomica	Localizzazione genica	Primer Forward (5'-3')	T° Melting	Lungh. amplicone
Rs 2501618	1:179989674	Var. intronica	CAGTCATTGAGAACTTTGGTGGT	70 °C	145
Rs 1508805	5: 121634753	Introne	ACGGCATCCTCTGGTGAAAA	68 °C	163
Rs 2236304	14:22843654	Var. intronica	AGAAGCCCATCCACACCTTTC	71 °C	105
Rs 742109	6:106146349	Introne	GACCTGGTCAACCTTTGGAGA	71 °C	83
Rs 10519201	15:48929394	Var. Intronica	GAAACCTGGCCCCATTTCAGAT	71 °C	145
Rs 5756444	22:36982410	Introne	TTCTCAGCTGGGCAATGTGTA	69 °C	145
Rs 7632718	3:170514619	Var. intronica	TGTTAAAGGAGGCTGTTCTGT	69 °C	158

Tabella 8. Caratteristiche degli SNPs scelti e dei relativi *primers forward* scelti

GenBank/dbSNP accession	Localizzazione cromosomica	Localizzazione genica	Primer Reverse (3'-5')	T° Melting	Lungh. amplicone
Rs 2501618	1:179989674	Var. intronica	ACAGCCACAGTGTTTTACAGT	67 °C	145
Rs 1508805	5: 121634753	Introne	TCTTTGTGGAAGGCACAATTCC	69 °C	163
Rs 2236304	14:22843654	Var. intronica	CTGGGGCAGAAAACACGAGG	72 °C	105
Rs 742109	6:106146349	Introne	TTTACGGGAATGCTAAGCCCC	71 °C	83
Rs 10519201	15:48929394	Var. Intronica	AATGAAACTGAGCCAGGCACT	69 °C	145
Rs 5756444	22:36982410	Introne	AAACCGTTTCAGTTTAGCCGC	69 °C	145
Rs 7632718	3:170514619	Var. intronica	TGCTGAAGCTCCTCAGTCCG	72 °C	158

Tabella 9. Caratteristiche degli SNPs scelti e dei relativi *primers reverse* scelti

6.4 Estrazione del DNA

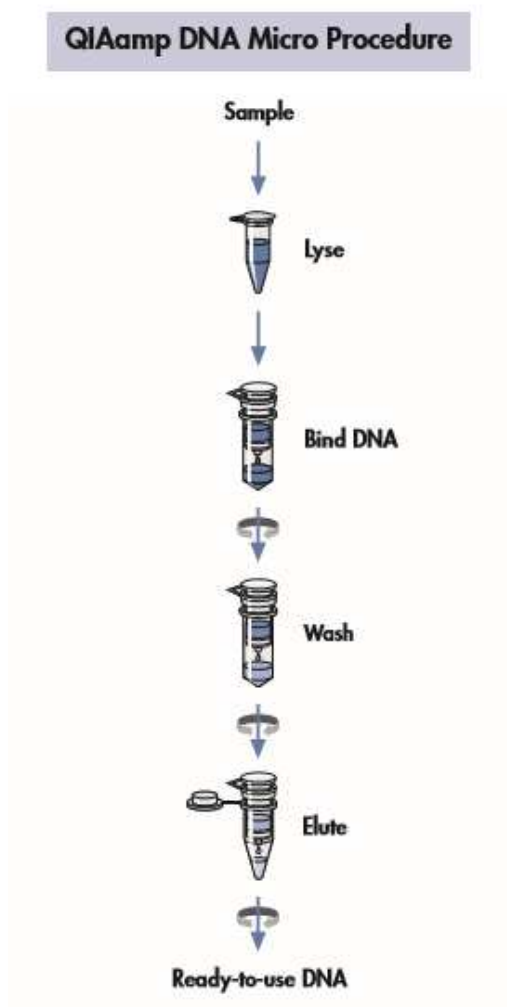


Figura 19. Rappresentazione schematica dei passaggi della fase di estrazione.

L'estrazione del DNA è stata eseguita con l'utilizzo di QIAamp® DNA Micro della QIAGEN® (158). La metodica prevede un'iniziale fase di lisi cellulare, ad alta temperatura al fine del rilascio del DNA che con i successivi passaggi in centrifuga passerà attraverso la membrana inferiore della colonnina costituita da una matrice silicea ad alta affinità per il DNA (Figura 19).

- Vortexare la provetta di sangue per uniformare il campione;
- Prelevare due gocce di sangue e aggiungerle in una provetta da 1,5 µL;

- Aggiungere 50 μL di ATL;
- Aggiungere 10 μL di proteinasi K;
- Aggiungere 100 μL di buffer AL;
- Vortexare per miscelare i reagenti al campione e lasciar incubare su *Eppendorf Thermomixer* ad una temperatura di 56°C per 10 minuti;
- Fare una breve centrifuga per rimuovere le gocce dalle pareti;
- Aggiungere 50 μL di etanolo (96- 100%) e vortexare per 15 secondi;
- Lasciar incubare a temperatura ambiente per 3 minuti;
- Centrifugare brevemente;
- Preparare una *QIAamp MinElute column* per ogni campione;
- Trasferite tutto il contenuto della provetta all'interno dell'apposita colonnina di estrazione facendo attenzione a non toccare la membrana;
- Centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm;
- Trasferire la colonnina all'interno di una nuova *collection tube* e gettare la precedente contenente l'eluato di scarto;
- Aggiungere 500 μL di Buffer AW1 sempre facendo attenzione a non toccare la membrana;
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;

- Trasferire la colonnina all'interno di una nuova *collection tube* e gettare la precedente contenente l'eluato di scarto;
- Aggiungere 500 μL di AW2 senza toccare la membrana della colonnina;
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
- Trasferire la colonnina all'interno di una nuova *collection tube* e gettare la precedente contenente l'eluato di scarto;
- Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti per asciugare la membrana;
- Trasferire la colonnina nella provetta finale da 1,5 dove finirà l'eluato finale contenete in DNA;
- Aggiungere 50 μL di Buffer AE al centro della membrana della colonnina;
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto;
- Centrifugare a 14000 rpm per 1 minuto;
- Gettare la colonnina e chiudere la provetta da 1,5 μL contenente il DNA estratto.
- Ottenuto l'estratto conservare a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o proseguire con la successiva fase di amplificazione.

6.5 Quantificazione del DNA estratto

La quantizzazione è stata eseguita con il Qubit 2.0 (159) (Figura 20), uno strumento che utilizza un principio fluorimetrico per la quantizzazione del DNA



Figura 20. Qubit 2.0: l'immagine mostra la localizzazione delle varie componenti.

Il protocollo è composto da diverse fasi:

- Portare a temperatura ambiente tutti gli standard e i reagenti per ottimizzare la performance del kit;
- Preparare e numerare l'esatto numero di provette per l'esecuzione del test, 1 per ogni campione più 2 per gli standard, 1 per il controllo positivo e 1 per il controllo negativo;
- Andiamo a preparare una mix composta, per ogni campione, da 199 μL di *Qubit*[®] *dsDNA HS Buffer* e 1 μL di *Qubit*[®] *dsDNA HS Reagent*;
- Vortexare dolcemente la mix senza creare bolle;

- Per gli standard: aggiungere 190 μL di mix in ogni provetta e 10 μL di standard 1 e 10 μL di standard 2 nelle rispettive provette;
- Per il controllo positivo: aggiungere 198 μL di mix e 2 μL di DNA a concentrazione nota;
- Per il controllo negativo: aggiungere 200 μL di mix;
- Per i campioni: aggiungere 198 μL di mix e 2 μL di DNA da quantificare;
- Vortexare dolcemente i campioni senza creare bolle;
- Lasciar incubare i campioni per 2 minuti prima della lettura;
- Effettuare la lettura fluorimetrica degli standard e successivamente quella dei controlli e dei campioni.

6.6 Amplificazione degli SNPs in singolo

I primer arrivano in laboratorio liofilizzati e vanno quindi risospesi in *TE Buffer* (pH8) prima di essere utilizzati. Insieme ai primer stessi arriva una scheda che riassume tutte le caratteristiche e i dati dei primer ordinati tra cui la concentrazione espressa in nanomoli. Queste concentrazioni sono diverse tra di loro ed è quindi necessario risospenderli affinché raggiungano tutti la concentrazione di 100 μM . Per determinare la quantità di TE Buffer da aggiungere ai primer liofilizzati sono stati eseguiti i seguenti calcoli per trasformare la nanomoli in microlitri.

Esempio:

rs2501618_Fw: 42,6 nM

$$46,2 \text{ nM} \times 1 \text{ } \mu\text{M} / 100 \text{ } \mu\text{M} = 0,0462 \text{ } \mu\text{M}$$

$$0,0462 \text{ } \mu\text{M} / 100 \text{ } \mu\text{M/l} = 0,000462 \text{ L}$$

$$0,000282 \text{ L} \times 1000 \text{ m/L} = 0,462 \text{ ml o } 462 \text{ } \mu\text{L}$$

Successivamente abbiamo diluito questi primer 1:50, sempre con il *TE Buffer*, ottenendo quindi delle aliquote ad una concentrazione di 2 μM , ideale per le successive reazioni di amplificazione.

Per l'allestimento della reazione di PCR è stato usato il QUIAGEN® Multiplex PCR Kit. In questo passaggio andiamo ad amplificare singolarmente le sequenze che contengono i nostri SNPs in modo da andare poi successivamente a verificare se la lunghezza dei nostri ampliconi coincide con quella prevista durante la progettazione dei primers.

La reazione allestita per ogni campione prevede (Tabella 10)

Reaction Mix	Volume
2x QUIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5 μL
Primer Forward (2 μM)	1 μL
Primer Reverse (2 μM)	1 μL
H ₂ O	2 μL
DNA	1 μL
Volume totale	10 μL

Tabella 10. Reazione di amplificazione per SNPs in singolo con protocollo Qiagen Multiplex PCR kit

Le temperature impostate nel programma di amplificazione sono quelle previste dal protocollo standard (Tabella 11).

Attivazione Hot StartTaq DNA Polymerase	95 °C per 15 min	
Denaturazione	94 °C per 30 sec	30 cicli
Annealing	60 °C per 90 sec	
Allungamento	72 °C per 1 min	
(Riappaiamento??)	60 °C per 30 min	

Tabella 11. Condizioni di amplificazione per SNPs in singolo.

6.7 Quantificazione dei prodotti dell'amplificazione

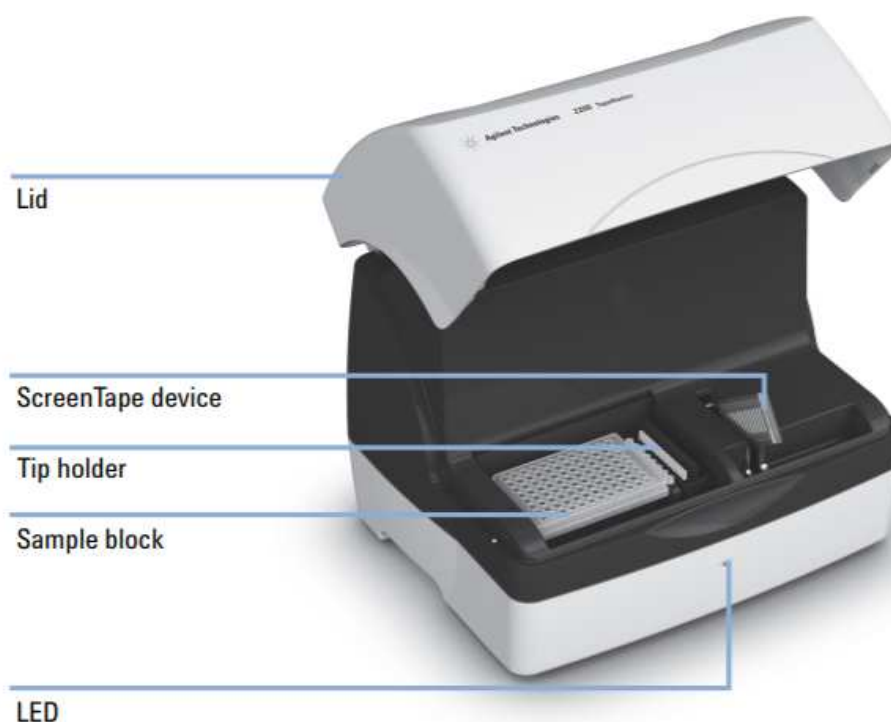


Figura 21. Visione frontale e localizzazione delle varie componenti.

Una volta terminata la PCR dei nostri ampliconi andiamo ad eseguire un *quality check* per il primo campione di verifica per andare a controllare che le sequenze amplificate con i nostri

primer siano effettivamente della lunghezza da noi prospettata e di essere sicuri che i parametri scelti per l'esecuzione dell'analisi siano corretti.

Per la quantificazione degli ampliconi è stato usato l'Agilent 2200 TapeStation nucleic acid system (Figura 21) che prevede inizialmente l'allestimento di una reazione con 4 μ L di Buffer e 2 μ L del campione che voglio andare ad analizzare. Carico sullo strumento tutto l'occorrente tra cui la provetta contenente il campione, la screentape e i puntali necessari allo strumento per lavorare e avvio la corsa.

Al termine della corsa lo strumento ci restituisce un grafico e un'immagine ad alta risoluzione del gel di agarosio dove è avvenuta la corsa. Da questi risultati riusciamo a verificare se è stato amplificato l'amplicone di nostro interesse.

6.8 Purificazione del DNA amplificato

Dopo l'amplificazione del andiamo a eseguire la purificazione delle nostre sequenza. Il protocollo utilizzato è l'Exo-CIP PCR cleanup e sfrutta l'azione di due enzimi che hanno il fine di degradare i dNTP non incorporati e i primers in eccesso. Il primo è *Exonuclease I* (Exo) ed è un enzima che digerisce il DNA a singolo filamento come i primers e i prodotti PCR incompleti mentre il secondo è il Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Cip) ed utilizzato per rimuovere i dNTP che non sono stati incorporati nella sintesi del nuovo filamento durante la PCR.

Vengono allestite due mix separate per i due enzimi che verranno poi riunite in un secondo momento (Tabella 12).

Exo Mix		CIP Mix	
Buffer Exo	1,2 μ L	Buffer CIP	1,25 μ L
ExoI	0,3 μ L	CIP	1,25 μ L
H ₂ O	11 μ L	H ₂ O	10 μ L
Volume totale	12,5 μ L	Volume Totale	12,5 μ L
Volume Exo-Cip Mix		25 μ L	

Tabella 12. Reazione di purificazione mediante enzimi Exo e Cip.

Il dosaggio soprascritto deve essere considerato in funzione del numero di campioni da processare. In ogni provetta vengono aggiunti 10 μ L di campione amplificato e 5 μ L di mix Exo-CIP e vengono messi ad incubare sul termociclatore a 37 °C per 1 ora e successivamente a 80 °C per 20 minuti. Il fine è quello di inattivare i primer in eccesso dalle reazioni precedenti per ottimizzare il sequenziamento.

6.9 Reazione di sequenza

Le reazioni di sequenza delle nostre regioni d'interesse sono state condotte sia in direzione 5'-3' che in direzione opposta grazie all'utilizzo di primer *forward* e *reverse*, utilizzati anche per le reazioni di PCR, con una concentrazione di 2 μ L. Il sequenziamento è stato eseguito con il BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Buffer kit (ThermoFisher). La reazione di sequenziamento è stata allestita come segue (Tabella 13):

Reaction Mix	Volume
BidDye Sequencing Buffer	2 μ L
5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	1 μ L
Primer <i>Forward</i> o <i>Reverse</i>	1 μ L
DNA	0,6 μ L
H ₂ O	5,4 μ L
Volume Totale	10 μ L

Tabella 13. Reazione di sequenziamento su piastra

È stata eseguita un'incubazione iniziale a a 96 °C per 1 minuto per una denaturazione iniziale e successivamente 25 cicli con un programma che prevedeva: una fase ciclica di denaturazione a 96 °C per 10 secondi, una fase di annealing a 50 °C per 5 secondi e una di allungamento a 60 °C per 4 minuti (Tabella 14).

Denaturazione	96 °C per 1 minuto	25 cicli
	96 °C per 10 secondi	
Annealing	50 °C per 5 secondi	
Allungamento	60 °C per 4 minuti	

Tabella 14. Programma di amplificazione per la reazione di sequenza.

6.10 Rimozione dei ddNTPs non incorporati

Prima di procedere con il sequenziamento con l'elettroforesi capillare abbiamo eseguito un'ulteriore purificazione per rimuovere tutti i nucleotidi non incorporati. In questa fase è stato utilizzato il BigDye® XTerminator Purification Kit che prevede l'aggiunta al campione di una premix composta da 45 µL di SAM Solution e 10 µL di XTerminator Solution. La XTerminator Solution è una resina contenente delle microbiglie che, durante il processo di incubazione di 30 minuti sul vortex e una successiva centrifugazione di 2 minuti a 3500 rpm, catturano i ddNTPs non incorporati facendoli precipitare sul fondo della provetta lasciando in soluzione il DNA purificato.

6.11 Elettroforesi capillare

Lo strumento utilizzato è l'Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer ed è uno strumento per l'elettroforesi capillare dotato di 4 capillari in grado di analizzare 4 sequenze per volta.

Una volta conclusa tutta la reazione di sequenza e eseguita la preparazione dello strumento andiamo a caricare la piastra contenente i nostri prodotti di sequenziamento purificati.

La corsa è stata eseguita con specifici parametri:

- Numero di capillari: quattro
- Polimero: POP4
- Tempo di iniezione: 1.5 secondi
- Voltaggio di iniezione: 2.0 Kv
- Voltaggio della corsa: 15.0 Kv
- Temperatura di corsa: 60 °C
- Tempo di corsa: 1000 secondi

- Analysis method: BDX_BDT11_v.1.1_SeqAlte

6. 12 Analisi delle sequenze

Per l'analisi delle sequenze sono stati utilizzati due programmi: SeqScape® Software e Sequencing Analysis Software 6. Il primo è un software capace di confrontare ed allineare la sequenza ottenuta con una sequenza di riferimento e successivamente identificare variazioni nucleotidiche classificandole come note o non note. Tutto questo grazie all'iniziale creazione di una o più sequenze di riferimento, in base al progetto che andremo ad analizzare.

Prima di iniziare con l'analisi vera e propria abbiamo provveduto all'inserimento delle nostre sequenze di riferimento, una per ogni SNP studiato e successivamente all'inserimento di tutte le varianti nucleotidiche note in modo che il programma riesca a classificare la variante come nota o non nota. Al termine dell'inserimento di tutte le informazioni abbiamo ottenuto il progetto completo su cui siano andati a lavorare, inserendo le sequenze ottenute dopo il sequenziamento di Sanger.

Per tutte quelle sequenze che il programma non è riuscito ad allineare alla sequenza di riferimento, a causa di problemi con il sequenziamento, abbiamo provveduto ad utilizzare il Sequencing Analysis Software 6 che permette un'interpretazione migliore della sequenza ma non è in grado di segnalare il polimorfismo cercato.

Entrambi i software identificano le 4 basi azotate con colori diversi: il verde per l'adenina, il rosso per la timina, il nero per la guanina e il blu per la citosina. Nel caso della presenza di un'omozigosi il programma segnala direttamente la lettera che indica il nucleotide coinvolto (A, T, C o G) mentre in caso di eterozigosi vengono utilizzate delle lettere che indicano la contemporanea presenza di due basi come ad esempio Y (eterozigosi CT), K

(eterozigosi GT), M (eterozigosi AC), R (eterozigosi AG). Come nell'elettroferogramma in Figura 21 che presenta una condizione di eterozigosi e ci permette di apprezzare la contemporanea presenza dei due picchi sovrapposti nella stessa posizione.

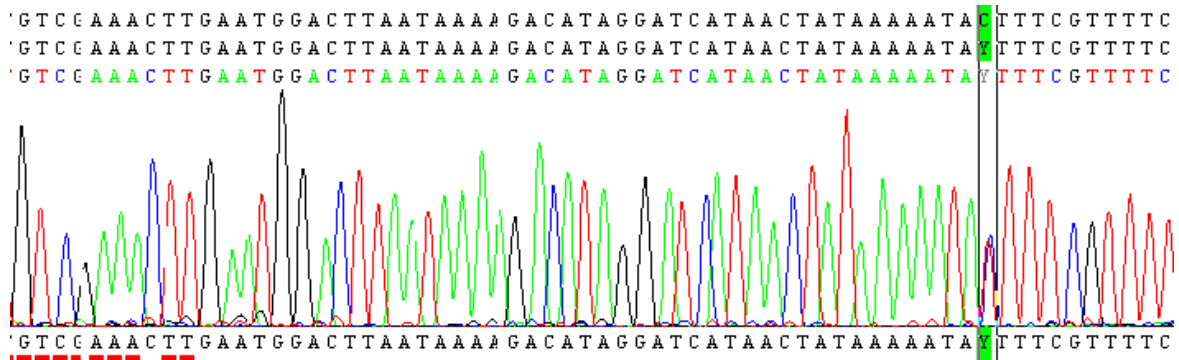


Figura 21. Elettroferogramma che mostra una condizione di eterozigosi CT, indicata dal Software con Y.

7. RISULTATI

7.1 Risultati della quantizzazione

Una volta estratto il nostro DNA dai vari campioni abbiamo proceduto ad effettuare la quantizzazione del DNA estratto, in modo da poter conoscere la concentrazione di partenza e eventualmente, nel caso in cui fosse troppo alta, diluirla per lavorare con una concentrazione standard ottimale di 10 ng/μL.

La lettura della concentrazione è stata eseguita in doppio e il risultato finale è stato ottenuto come media dei due valori di lettura.

Dopo la lettura fluorimetrica i risultati quantitativi sono stati (Tabella 14):

Campione	Prima lettura	Seconda lettura	Media
58-16	3,94 ng/μL	3,91 ng/μL	3,93 ng/μL
135-16	12,2 ng/μL	12,7 ng/μL	12,45 ng/μL
150-16	38,2 ng/μL	38,3 ng/μL	38,3 ng/μL
4-17	17,1 ng/μL	16,7 ng/μL	16,9 ng/μL
24-17	2,05 ng/μL	2,04 ng/μL	2,05 ng/μL
68-17	20,1 ng/μL	20,3 ng/μL	20,2 ng/μL
147-17	50 ng/μL	51 ng/μL	50,5 ng/μL
185-17	34,1 ng/μL	33,7 ng/μL	33,9 ng/μL
75-18	10 ng/μL	10 ng/μL	10 ng/μL
149-18	16,8 ng/μL	17 ng/μL	16,9 ng/μL

Tabella 14. Risultati delle concentrazioni di DNA acquisite con una lettura fluorimetrica con Qubit 2.0

7.2 Controllo dei prodotti di amplificazione

Per andare a testare l'efficienza dei nostri primer abbiamo eseguito questo controllo sul primo campione processato in modo da essere sicuri che anche per gli altri campioni i prodotti di amplificazione fossero specifici per il nostro target.

Così come illustrato in "Materiali e metodi" questo controllo è stato eseguito con l'Agilent 2200 TapeStation nucleic acid system per verificare il controllo delle lunghezze dei nostri ampliconi (Tabella 15).

SNPs	Primer Forward	Lungh. . Fw	Primer Reverse	Lungh. Rv	Lungh. amplicone
rs2501618	CAGTCATTGAGAACTTTGGTG GT	23	ACAGCCACAGTGTTTTA CAGT	21	145
rs1508805	ACGGCATCCTCTGGTGAAAA	20	TCTTTGTGGAAGGCAC AATCC	22	163
rs2236304	AGAAGCCCATCCACACCTTTC	21	CTGGGGCAGAAAACAC GAGG	20	105
rs742109	GACCTGGTCAACCTTTGGAG A	21	TTTACGGGAATGCTAA GCCCC	21	83
rs10519201	GAAACCTGGCCCCATTCAGA T	21	AATGAAACTGAGCCAG GCACT	21	145
rs5756444	TTCTCAGCTGGGCAATGTGTA	21	AAACCGTTTCAGTTTAG CCGC	21	145
rs7632718	TGTTAAAGGAGGCTGTTCTG T	22	TGCTGAAGCTCCTCAGT CCG	10	158

Tabella 15. Dati relativi ai primer utilizzati, alla loro lunghezza e al valore atteso di lunghezza del nostro amplicone

Al termine della nostra corsa elettroforetica abbiamo scaricato e analizzato i risultati ottenuti. Di seguito riportiamo l'immagine ad alta risoluzione del gel d'agarosio (Figura 22) e per ogni amplicone il tracciato elettroforetico relativo alla corsa del campione di verifica e le tabelle contenenti i dati dell'amplicone.

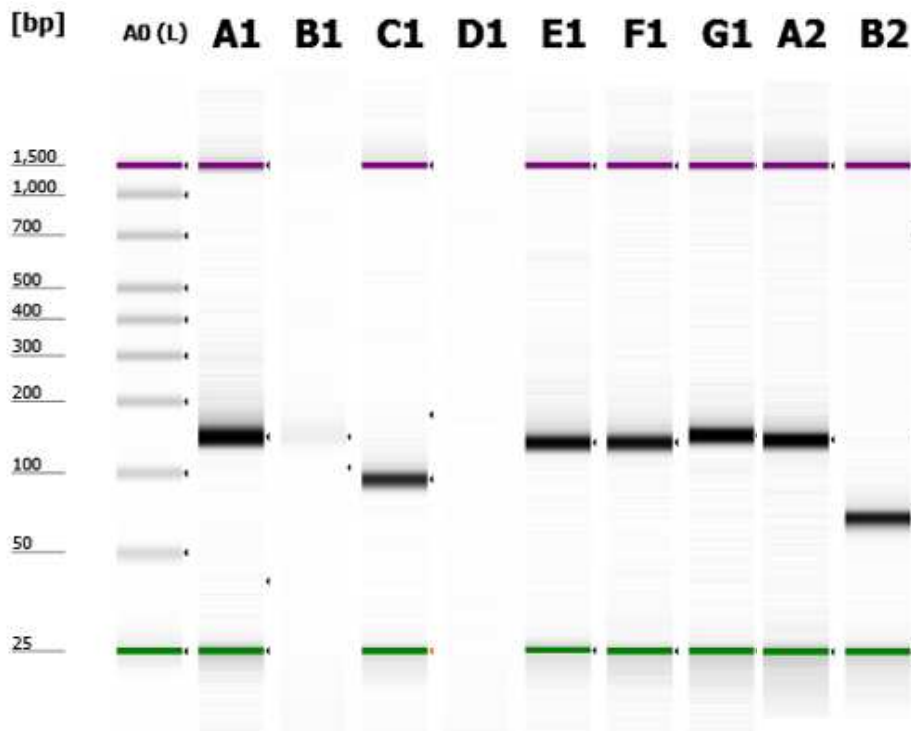


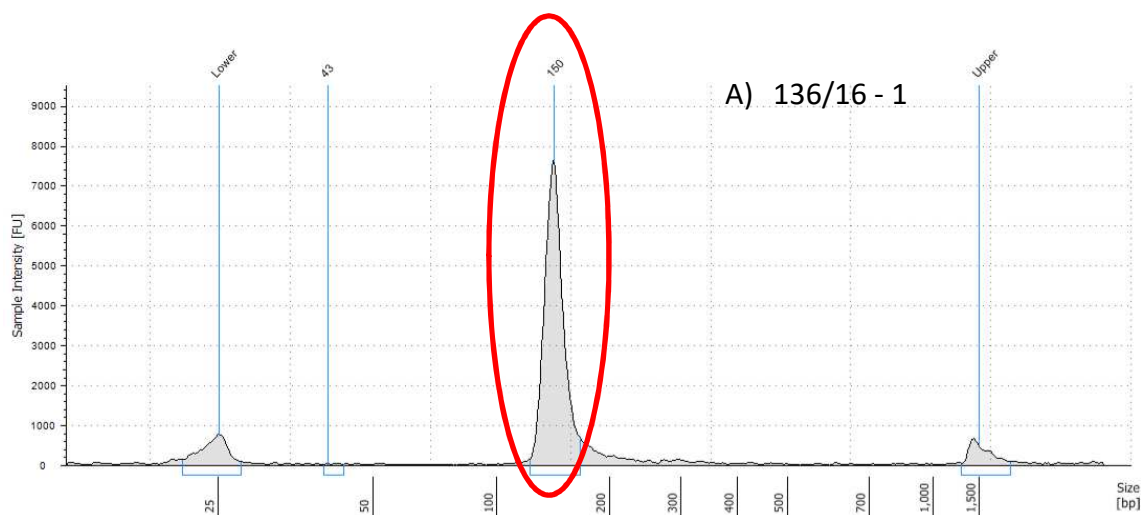
Figura 22. Immagine ad alta risoluzione del gel su cui è avvenuta la corsa. In viola il marker upper, in verde il marker lower e nel mezzo le bande delle nostre sequenze.

Durante la prima corsa lo strumento ha avuto delle difficoltà nei pozzetti B1 e D1 e infatti si può notare l'assenza di una banda netta nel caso di B1 e l'assenza completa nel caso di D1. Una volta visto il risultato inatteso abbiamo eseguito un'ulteriore corsa elettroforetica nei pozzetti A2 e B2 e non ci sono stati problemi.

Ai pozzetti corrispondono i seguenti SNP: A1 135/16-1, B1 135/16-2, C1 135/16-3, D1 135/16-4, E1 135/16-5, F1 135/16-6, G1 135/16-7, A2 135/16-2 (seconda corsa), B2 135/16-4 (seconda corsa).

Da un primo controllo della migrazione delle bande rispetto allo standard, abbiamo appurato che la lunghezza attesa degli ampliconi corrispondeva alla lunghezza attesa. Il software ha

poi assegnato una lunghezza, espressa in bp, ad ogni amplicone ed è stata osservata una corrispondenza tra le taglie attese e quelle ottenute, come mostrato nelle figure seguenti (Figure 23-28).



Peak Table

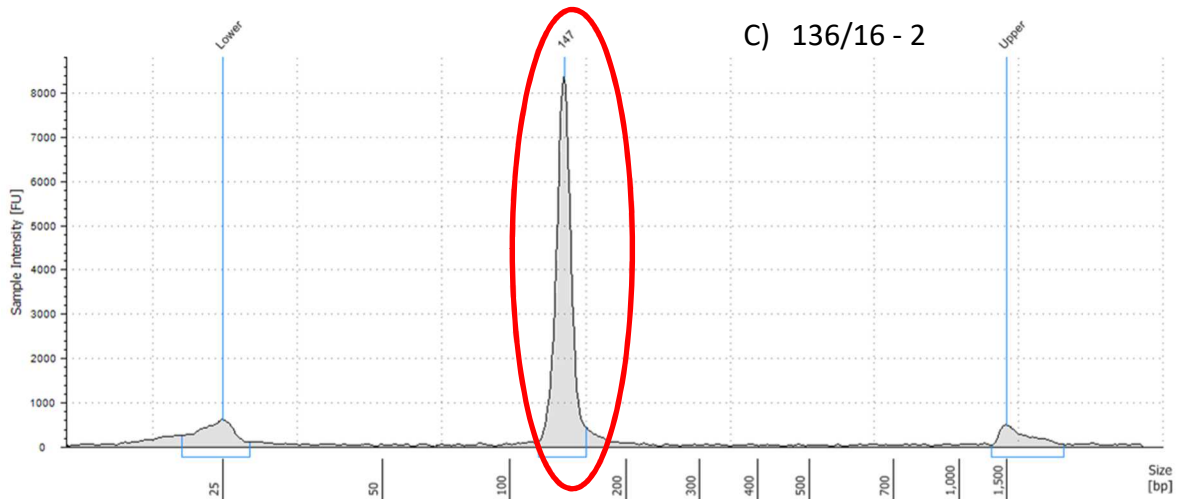
Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	386	-	23800	-		Lower Marker
43	7.99	-	288	0.29		
150	2720	-	27900	99.71		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

Figura 23.

Figura 22-28. Grafici raffiguranti i picchi relativi ai markers upper e lower e ai campioni testati. Nelle tabelle collegata sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui la lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/μL.

In ordine abbiamo: Figura 22 rs2501618, Figura 23 rs1508805, Figura 24 rs2236304, Figura 25 rs742109, Figura 26 rs10519201, Figura 27 rs5756444, Figura 28 rs7632718.

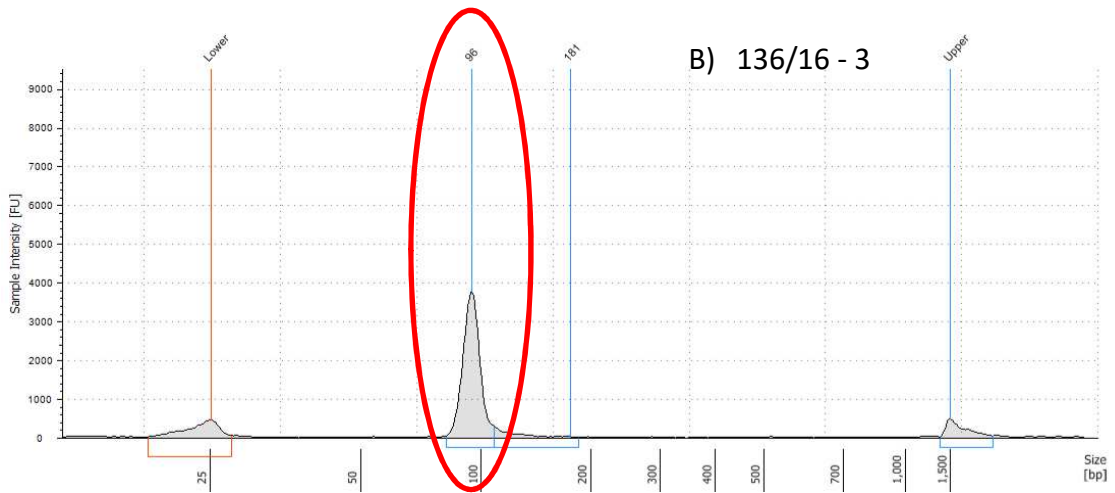
Figura 24.



Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Assigned Conc. [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Peak Molarity [$\mu\text{mol}/\text{l}$]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	382	-	23500	-		Lower Marker
147	2120	-	22200	100.00		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

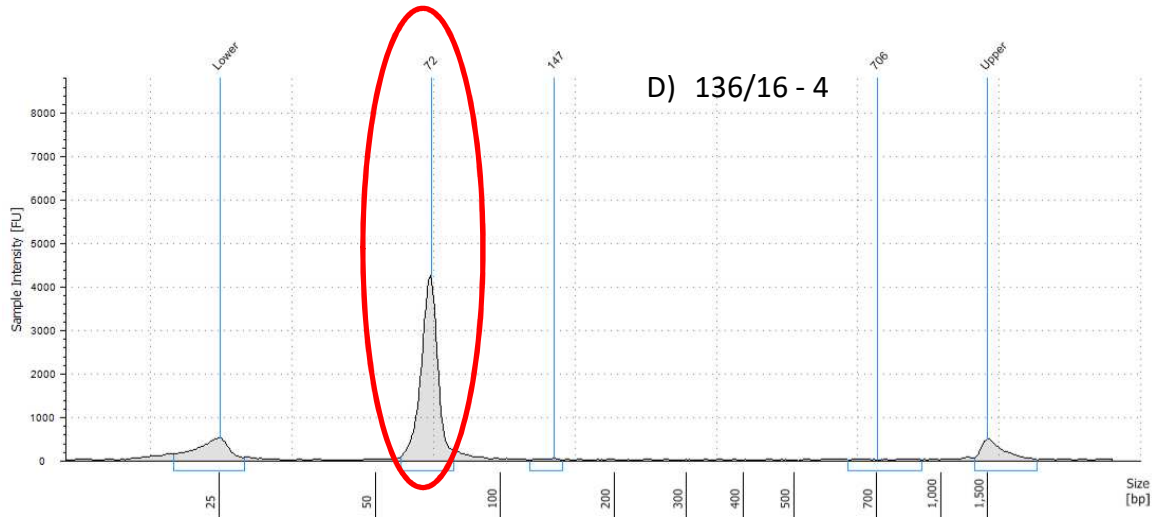
Figura 25.



Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Assigned Conc. [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Peak Molarity [$\mu\text{mol}/\text{l}$]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	388	-	23900	-		Lower Marker
96	1730	-	27700	92.60		
181	138	-	1170	7.40		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

Figura 26.

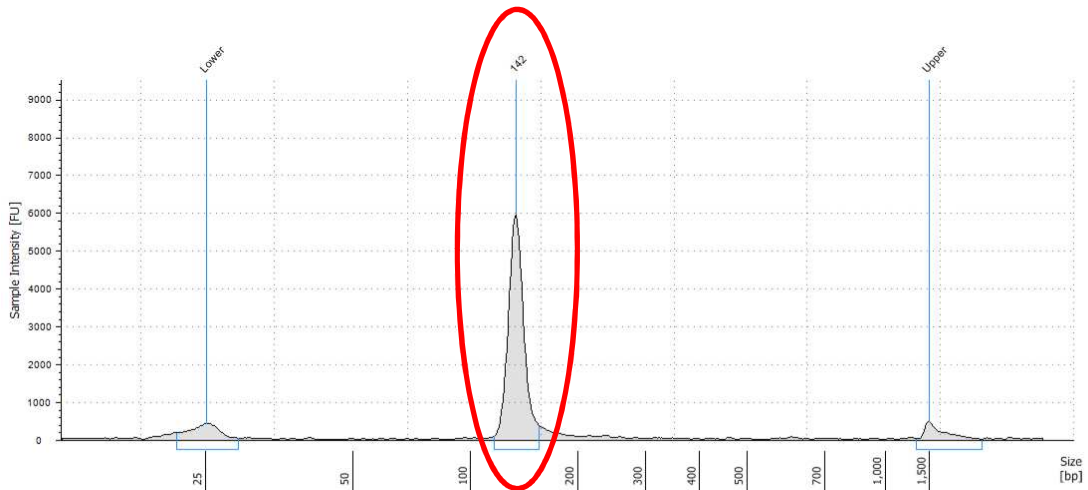


Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	381	-	23400	-		Lower Marker
72	1550	-	33000	96.49		
147	18.6	-	195	1.16		
706	37.7	-	82.2	2.35		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

Figura 27.

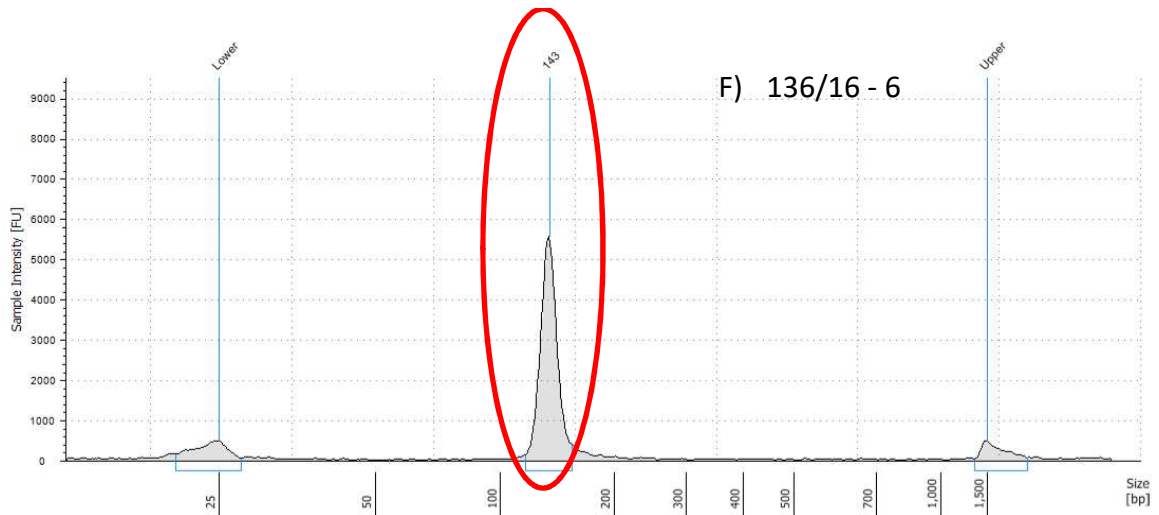
E) 136/16 - 5



Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	363	-	22300	-		Lower Marker
142	2510	-	27100	100.00		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

Figura 28.

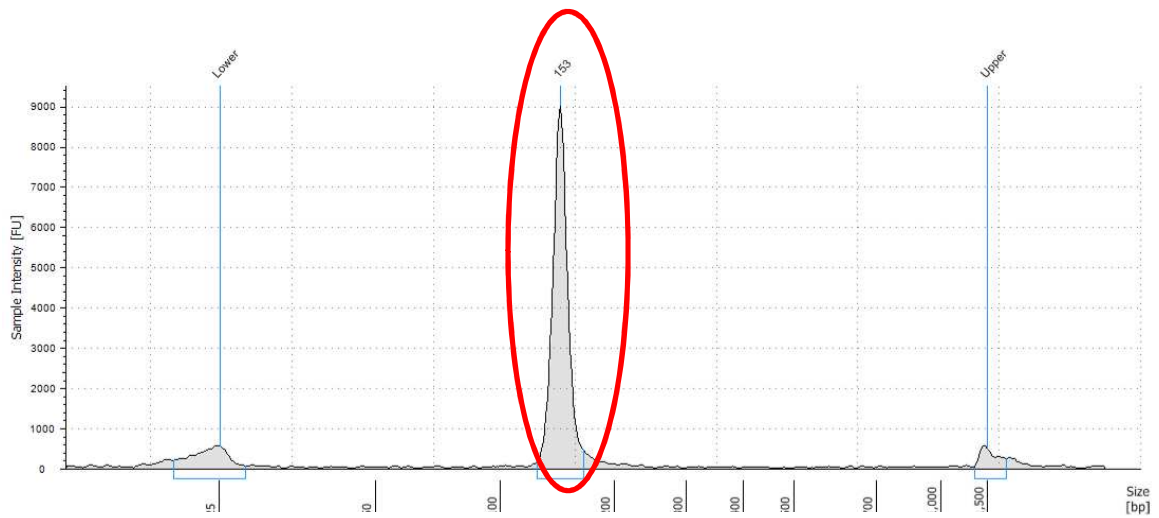


Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	379	-	23300	-		Lower Marker
143	2050	-	22000	100.00		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

Figura 29.

G) 136/16 - 7



Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/μl]	Assigned Conc. [pg/μl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	530	-	32600	-		Lower Marker
153	3470	-	35000	100.00		
1,500	250	250	256	-		Upper Marker

7.3 Analisi degli SNPs

Una volta terminata la fase di laboratorio abbiamo analizzato gli elettroferogrammi delle sequenze dei vari polimorfismi ottenuti dal sequenziamento del 3130.

Dopo aver allineato le nostre sequenze per facilitarne la lettura abbiamo analizzato la sequenza in corrispondenza dei nostri polimorfismi andando ad individuare la presenza o meno delle varianti attese.

I risultati dei polimorfismi ottenuti sono riassunti nella Tabella 17 accompagnata da alcuni elettroferogrammi d'esempio (Figura 30, Figura 31).

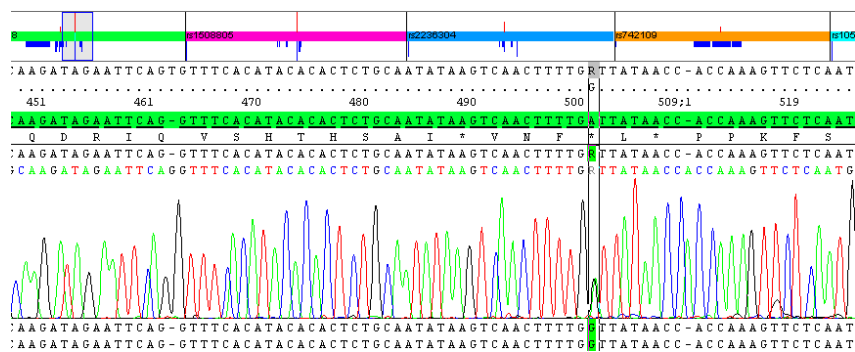


Figura 30. Elettroferogramma con condizione di eterozigosi AG come si evince dalla presenza dei due picchi sovrapposti che il programma indica con la lettera R (R = eterozigosi AG)

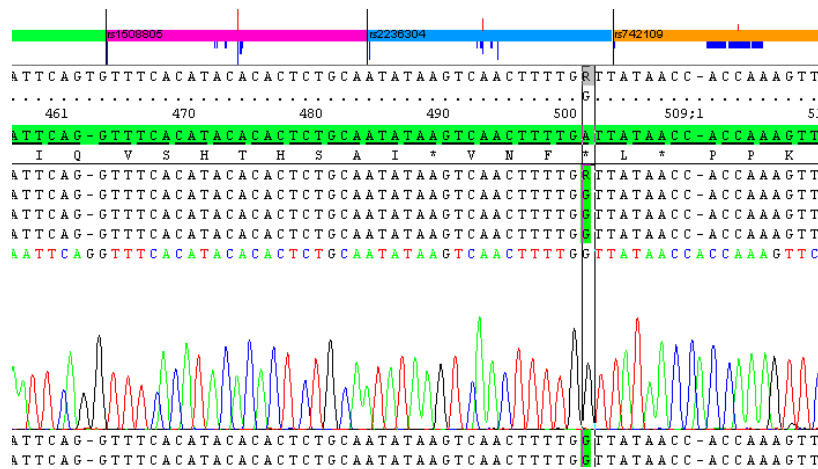


Figura 31. Condizione di omozigosi GG espresso da un unico picco nero che identifica la base

Per stabilire lo SNP di riferimento e quello variato ci siamo basati su quelli presi in esempio da Tunesi che identifica come “major allele” quello di riferimento che compare con maggior frequenza nella popolazione di riferimento mentre come “minor allele” l’eterozigosi o omozigosi per l’allele mutato (Tabella 16).

SNP	rs2501618	rs1508805	rs2236304	rs742109	rs1051920	rs5756444	rs7632718
Reference	G	C	C	G	G	T	G
Variant	A	T	G	A	A-T	C	A

Tabella n°. Tabella con le varianti di riferimento e gli SNPs considerati mutati.

		Polimorfismi						
		rs2501618	rs1508805	rs2236304	rs742109	rs1051920	rs5756444	rs7632718
Campioni	58-16	GG	CT	GG	AG	GG	CT	GG
	135-16	AG	TT	CC	GG	GG	CT	AA
	150-16	GG	CT	CC	AG	GG	TT	AG
	004-17	GG	CT	CC	GG	GG	TT	AG
	147-17	GG	CC	GG	AG	GG	CT	AA
	24-17	GG	CC	CC	AA	GG	CT	GG
	68-17	GG	CT	CC	AG	GG	TT	AA
	185-17	GG	CT	CC	GG	GT	CT	AG
	149-18	GG	CT	CC	AG	GG	CT	AA
	75-18	GG	CT	CC	AG	GG	CT	AG

Tabella 17. Schema riassuntivo dei risultati ottenuti al termine dell’analisi. Le condizioni di mutazione in omozigosi sono evidenziate in giallo, mentre quelle in eterozigosi sono evidenziate in arancio.

- rs2501618: nel 90% dei casi il nostro campione presenta un’omozigosi per l’allele di riferimento GG mentre solo in un caso abbiamo la presenza dell’allele variato in eterozigosi AG. Durante l’analisi del primo amplicone del campione 135-16 abbiamo inoltre riscontrato un ulteriore SNP, rs78737770, che dopo un’analisi su NCBI abbiamo visto essere già stato studiato e associato a nessuna variazione fenotipica.

- rs1508805: la condizione di eterozigosi CT è la più diffusa con il 70% dei casi mentre l'omozigosi dell'allele minore TT è stata riscontrata solo in un caso, i 2 restanti non presentano SNP variati.
- rs2236304: l'allele maggiore non variato è il più diffuso con 8 casi su 10 e per gli altri 2 abbiamo riscontrato una condizione di omozigosi per l'allele mutato GG.
- rs742109: il 60% del campione è eterozigote per AG, uno mostra la condizione di omozigosi dell'allele minore AA mentre i restanti 3 sono omozigoti per l'allele maggiore.
- rs10519201: Il campione presenta due possibili varianti alleliche per lo SNP mutato e come nel primo caso il 90% dei campioni è omozigote per l'allele di riferimento GG e non presenta mutazioni ma c'è un caso che mostra una condizione di eterozigosi GT mentre lo SNP G > A non è stato trovato in nessun caso.
- rs5756444: in 7 casi su 10 abbiamo constatato la presenza della condizione di eterozigosi CT mentre solo 3 casi si presentano con la variante selvatica.
- rs7632718: la maggioranza dei casi si presenta come mutata, il 40% eterozigote AG, un altro 40% è omozigote AA il restante 20% è omozigote GG.

8. DISCUSSIONE

Abbiamo preso in esame 10 campioni appartenenti a ex-pazienti con diagnosi di mesotelioma pleurico e passata esposizione lavorativa all'asbesto e abbiamo confrontato i nostri risultati ottenuti con quelli acquisiti da Tunesi nel suo studio (Grafico 1).

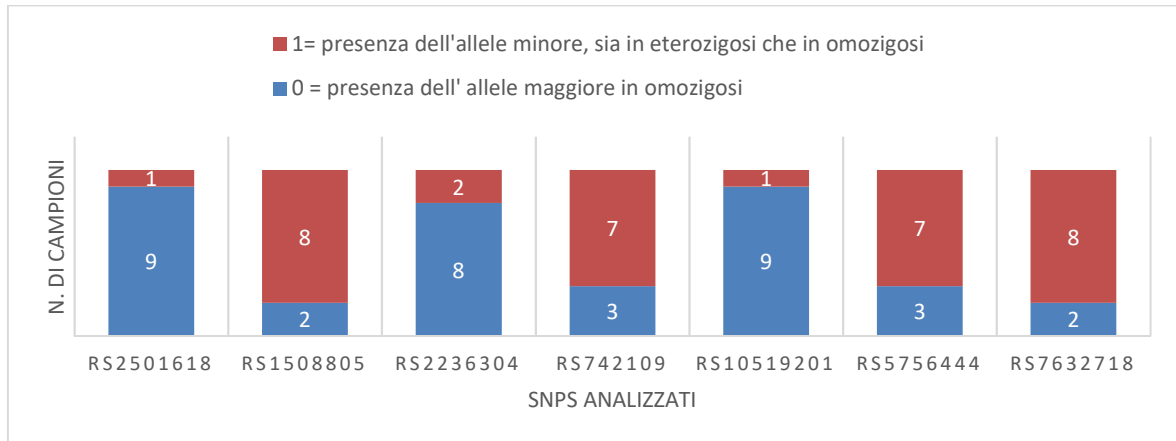


Grafico 1: Risultati ottenuti al termine dello studio

Per il primo polimorfismo preso in esame, rs2501618 notiamo che la quasi totalità dei casi, ad eccezione del campione 135-16 (che presenta l'eterozigote AG), presenta la variante selvatica in omozigosi. Questi risultati non sono in linea con quanto riportato nello studio di Tunesi in quanto questo polimorfismo risulta essere collegato all'aumento del rischio di sviluppo di mesotelioma pleurico maligno se considerato in sinergia con l'esposizione all'asbesto.

L'rs1508805 presenta la situazione opposta a quella appena analizzata e vede la condizione di omozigosi CC per l'allele selvatico in soli 2 campioni mentre nei rimanenti si osserva una condizione di eterozigosi e un caso di omozigosi per l'allele minore. Tali risultati sono concordanti con quanto ipotizzato da Tunesi, dove la presenza dell'allele minore, sia in condizioni di omozigosi e di eterozigosi, sembra aumentare il rischio di sviluppare

mesotelioma (OR=10,33) in condizione di esposizione all'asbesto. In assenza di esposizione e in presenza dell'allele minore il valore di OR è pari a 0,19.

Il terzo polimorfismo, rs2236304, presenta la maggioranza dei casi con l'allele selvatico non mutato mentre gli altri due casi che presentano un'omozigosi per lo SNP considerato. Negli studi osservati gli indici statistici ci portano ancora una volta a considerare l'effetto sinergico tra esposizione all'asbesto e la presenza dell'allele minore come fattore di rischio. I risultati ottenuti non sono concordanti con lo studio poiché la maggioranza dei casi presenta una condizione di omozigosi per l'allele non mutato.

Tunesi ha riscontrato che l'rs742109 ha un effetto protettivo in caso di mancata esposizione con l'asbesto, mentre, così come per gli altri, in caso di esposizione il fattore di rischio tende verso la suscettibilità allo sviluppo della patologia. Nel nostro caso abbiamo ex pazienti con esposizione certa o probabile data dall'anamnesi lavorativa e questo dato, come previsto, ha aumentato notevolmente il rischio di sviluppo della patologia.

Rs10519201 presenta una casistica identica a quella del primo polimorfismo analizzato, cioè con il 90% dei campioni senza mutazione e un solo campione con una condizione di eterozigosi per lo SNP considerato. In questo caso possiamo dire che i risultati non sono in linea con quanto riportato da Tunesi in cui la presenza dell'allele minore e dell'esposizione all'asbesto aumentava il rischio di sviluppare la patologia. Anche la condizione di omozigosi per l'allele selvatico, se unita all'esposizione all'asbesto rappresenta comunque un fattore di rischio, questo ci lascia intuire quanto preponderante sia l'esposizione all'asbesto nello sviluppo di mesotelioma pleurico maligno.

Per il sesto polimorfismo, rs5756444 considerando la condizione di esposizione all'asbesto, la presenza di mutazione, rispetto alla sua assenza, ha come conseguenza una diminuzione

del rischio di sviluppo della malattia, seppur questo rischio rimanga comunque presente ed elevato. La nostra casistica è concorde con il risultato perché anche se la maggioranza dei casi presenta lo SNP mutato, ricordiamo che questo implica comunque una notevole percentuale di rischio.

Nell'ultimo caso, rs7632718, l'esposizione all'asbesto rappresenta sempre la causa preponderante nello sviluppo della neoplasia, sia in assenza che in presenza dello SNP mutato, ma secondo lo studio di Tunesi la presenza della mutazione aumenta la suscettibilità al mesotelioma pleurico. Nel nostro studio la maggior parte dei campioni studiati presenta l'allele mutato e pertanto vi è una corrispondenza con quanto riportato da Tunesi.

Per concludere, dopo aver analizzato e studiato i risultati da noi ottenuti possiamo dire che il ruolo predominante dell'asbesto rimane una certezza ma gli indici statistici ci portano anche a riflettere sull'aumento del rischio che si registra quando nel paziente rileviamo la presenza degli SNPs analizzati nel presente studio. Infatti come già osservato in letteratura il background genetico dell'individuo considerato può modulare il processo di cancerogenesi indotto dall'esposizione all'asbesto ma rimane ancora molto difficile trovare i fattori specifici di questa interazione senza una significativa evidenza statistica.

BIBLIOGRAFIA

1. Neumann, V.; Loseke, S.; Nowak, D.; Herth, F.J.; Tannapfel, A. Malignant pleural mesothelioma: Incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health. *Dtsch Arztebl Int.* 2013, 110, 319–326. [PubMed]
2. Robinson, B.M. Malignant pleural mesothelioma: An epidemiological perspective. *Ann. Cardiothorac Surg.* 2012, 1, 491–496
3. <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/corretta-informazione/tutti-i-tipi-di-amianto-sono-cancerogeni>.
4. Faig J, Howard S, Levine EA, Casselman G, Hesdorffer M and Ohar JA: Changing pattern in malignant mesothelioma survival. *Transl Oncol* 8: 35-39, 2015.
5. Price B and Ware A: Time trend of mesothelioma incidence in the United States and projection of future cases: an update based on SEER data for 1973 through 2005. *Crit Rev Toxicol* 39: 576-588, 2009.
6. Robbins e Cotran, “Le basi patologiche delle malattie”, Elsevier, 8° edizione, volume 2.
7. Mosby Elsevier, Soft tissue tumors, Sharon W. Weiss, John R. Goldblum, 5° edizione.
8. <https://www.inail.it/cs/internet/docs/alg-pubbl-registro-nazionale-mesoteliomi-6-rapporto.pdf>
9. Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg.* 2000;44:565–601.
10. Suzuki Y, Yuen SR, Ashley R. Short, thin asbestos fibers contribute to the development of human malignant mesothelioma: pathological evidence. *Int J Hyg Environ Health.* 2005;208:201–210.

11. Yarborough CM. Chrysotile as a cause of mesothelioma: an assessment based on epidemiology. *Crit Rev Toxicol.* 2006;36:165–187.
12. Bernstein DM, Chevalier J, Smith P. Comparison of Calidria chrysotile asbestos to pure tremolite: final results of the inhalation biopersistence and histopathology examination following short-term exposure. *Inhal Toxicol.* 2005;17:427–449.
13. Powers A, Carbone M. The role of environmental carcinogens, viruses and genetic predisposition in the pathogenesis of mesothelioma. *Cancer Biol Ther.* 2002;1:348–353.
14. Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, et al. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:10214–10219.
15. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al. TNF- α inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- κ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:10397–10402.
16. Choe N, Tanaka S, Xia W, et al. Pleural macrophage recruitment and activation in asbestos-induced pleural injury. *Environ Health Perspect.* 1997;105 Suppl 5:1257–1260.
17. Xu A, Zhou H, Yu DZ, et al. Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species. *Environ Health Perspect.* 2002;110:1003–1008.
18. Shukla A, Gulumian M, Hei TK, et al. Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:1117–1129.

19. Dogan AU, Dogan M, Hoskins JA. Erionite series minerals: mineralogical and carcinogenic properties. *Environ Geochem Health*. 2008;30(4):367–381.
20. Ortega-Guerrero MA, Carrasco-Núñez G. Environmental occurrence, origin, physical and geochemical properties, and carcinogenic potential of erionite near San Miguel de Allende, Mexico. *Environ Geochem Health*. 2014; 36(3):517–529.
21. Sheppard R. Occurrences of Erionite in Sedimentary Rocks of the Western United States. Denver, CO: US Department of the Interior, US Geological Survey; 1996. Open file report 96-108.
22. Giordani M, Mattioli M, Ballirano P, et al Geological occurrence, mineralogical characterization, and risk assessment of potentially carcinogenic erionite in Italy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2017;20(2):81–103.
23. Kliment CR, Clemens K, Oury TD. North American erionite-associated mesothelioma with pleural plaques and pulmonary fibrosis: a case report. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(4):407–410.
24. Oczypok EA, Sanchez MS, van Orden DR, et al. Erionite-associated malignant pleural mesothelioma in Mexico. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9(5): 5722–5732.
25. Cardile V, Renis M, Scifo C, et al. Behaviour of the new asbestos amphibole fluoro-edenite in different lung cell systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(5):849–860.
26. Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, et al; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol*. 2014;15(13): 1427–1428.

27. Piolatto G, Negri E, La Vecchia C, et al. An update of cancer mortality among chrysotile asbestos miners in Balangero, northern Italy. *Br J Ind Med.* 1990;47(12):810–814.
28. Turci F, Tomatis M, Compagnoni R, et al. Role of associated mineral fibres in chrysotile asbestos health effects: the case of balangeroite. *Ann Occup Hyg.* 2009;53(5):491–417.
29. Pira E, Pelucchi C, Piolatto PG. Mortality from cancer and other causes in the Balangero cohort of chrysotile asbestos miners. *Occup Environ Med.* 2009; 66(12):805–809.
30. Donaldson K, Poland CA, Murphy FA, et al. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(15):2078–2086.
31. Marsh GM, Gula MJ, Youk AO, et al. Historical cohort study of US manmade vitreous fiber production workers: II, mortality from mesothelioma. *J Occup Environ Med.* 2001;43(9):757–766.
32. Boffetta P, Donaldson K, Moolgavkar S, et al. A systematic review of occupational exposure to synthetic vitreous fibers and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol.* 2014;44(5):436–449.
33. Travis LB, Hauptmann M, Gaul LK, et al. Site-specific cancer incidence and mortality after cerebral angiography with radioactive thorotrast. *Radiat Res.* 2003;160(6):691–706.
34. Maurer R, Egloff B. Malignant peritoneal mesothelioma after cholangiography with thorotrast. *Cancer.* 1975;36(4):1381–1385.

35. Stey C, Landolt-Weber U, Vetter W, et al. Malignant peritoneal mesothelioma after Thorotrast exposure. *Am J Clin Oncol*. 1995;18(4):313–331.
36. Cicala C, Pompetti F, Carbone M. SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *Am J Pathol*. 1993;142(5):1524–1533.
37. Manfredi JJ, Doug J, Liu WJ, et al. Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma. *Cancer Res*. 2005;65(7):2602–2609.
38. Lundstig A, Dejmek A, Eklund C, Filinic I, Dillner J. No detection of SV40 DNA in mesothelioma tissues from a high incidence area in Sweden. *Anticancer Res*. 2007;27(6B):4159–4161.
39. Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43(10):1022–1025.
40. Choe N, Tanaka S, Xia W et al. Pleural macrophage recruitment and activation in asbestos-induced pleural injury. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (Suppl 5): 1257–1260.
41. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. *Mesothelioma. Cancer Genet Cytogenet* 2001; 127: 93–110.
42. Bianchi AB, Mitsunaga SI, Cheng JQ et al. High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10854–10858.
43. Sekido Y, Pass HI, Bader S et al. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1227–1231.

44. Deguen B, Goutebroze L, Giovannini M et al. Heterogeneity of mesothelioma cell lines as defined by altered genomic structure and expression of the NF2 gene. *Int J Cancer* 1998; 77: 554–560
45. Poulikakos PI, Xiao GH, Gallagher R et al. Re-expression of the tumor suppressor NF2/merlin inhibits invasiveness in mesothelioma cells and negatively regulates FAK. *Oncogene* 2006; 25: 5960–5968.
46. Fleury-Feith J, Lecomte C, Renier A et al. Hemizyosity of Nf2 is associated with increased susceptibility to asbestos-induced peritoneal tumours. *Oncogene* 2003; 22: 3799–3805.
47. Lecomte C, Andujar P, Renier A et al. Similar tumor suppressor gene alteration profiles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell Cycle* 2005; 4: 1862–1869.
48. Kratzke RA, Otterson GA, Lincoln CE et al. Immunohistochemical analysis of the p16INK4 cyclin-dependent kinase inhibitor in malignant mesothelioma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1870–1875.
49. Yang CT, You L, Yeh CC et al. Adenovirus-mediated p14(ARF) gene transfer in human mesothelioma cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 636–641.
50. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM et al. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 1994; 54: 5547–5551.
51. Xio S, Li D, Vijg J et al. Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma. *Oncogene* 1995; 11: 511–515.
52. Prins JB, Williamson KA, Kamp MM et al. The gene for the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor, CDKN2A, is preferentially deleted in malignant mesothelioma. *Int J Cancer* 1998; 75: 649–653.

53. Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N et al. Aberrant methylation and simian virus 40 tag sequences in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 2001; 61: 5727–5730.
54. Wong IH, Lo YM, Zhang J et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 71–73.
55. Destro A, Ceresoli GL, Baryshnikova E et al. Gene methylation in pleural mesothelioma: Correlations with clinico-pathological features and patient's follow-up. *Lung Cancer* 2007; 59: 369–376.
56. Jongsma J, van Montfort E, Vooijs M et al. A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *Cancer Cell* 2008; 13: 261–271.
57. Chang LS, Akhmametyeva EM, Wu Y et al. Multiple transcription initiation sites, alternative splicing, and differential polyadenylation contribute to the complexity of human neurofibromatosis 2 transcripts. *Genomics* 2002; 79: 63–76.
58. Arakawa H, Hayashi N, Nagase H et al. Alternative splicing of the NF2 gene and its mutation analysis of breast and colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 565–568.
59. Pykett MJ, Murphy M, Harnish PR, George DL. The neurofibromatosis 2 (NF2) tumor suppressor gene encodes multiple alternatively spliced transcripts. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 559–564.
60. Schmucker B, Tang Y, Kressel M. Novel alternatively spliced isoforms of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor are targeted to the nucleus and cytoplasmic granules. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1561–1570.
61. Sherman L, Xu HM, Geist RT et al. Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* 1997; 15: 2505–2509.

62. Gutmann DH, Geist RT, Xu H et al. Defects in neurofibromatosis 2 protein function can arise at multiple levels. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 335–345.
63. Okada T, You L, Giancotti FG. Shedding light on Merlin's wizardry. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 222–229.
64. Jin H, Sperka T, Herrlich P, Morrison H. Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* 2006; 442: 576–579.
65. Horiguchi A, Zheng R, Shen R, Nanus DM. Inactivation of the NF2 tumor suppressor protein merlin in DU145 prostate cancer cells. *The Prostate*. 2008 Mar 24.
66. Tang X, Jang SW, Wang X et al. Akt phosphorylation regulates the tumoursuppressor merlin through ubiquitination and degradation. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1199–1207.
67. Altomare DA, You H, Xiao GH et al. Human and mouse mesotheliomas exhibit elevated AKT/PKB activity, which can be targeted pharmacologically to inhibit tumor cell growth. *Oncogene* 2005; 24: 6080–6089.
68. Harvey P, Warn A, Dobbin S et al. Expression of HGF/SF in mesothelioma cell lines and its effects on cell motility, proliferation and morphology. *Br J Cancer* 1998; 77: 1052–1059.
69. Mohiuddin I, Cao X, Ozvaran MK et al. Phosphatase and tensin analog gene overexpression engenders cellular death in human malignant mesothelioma cells via inhibition of AKT phosphorylation. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 310–316.
70. Opitz I, Soltermann A, Abaecherli M et al. PTEN expression is a strong predictor of survival in mesothelioma patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 33: 502–506.

71. McLaughlin ME, Kruger GM, Slocum KL et al. The Nf2 tumor suppressor regulates cell-cell adhesion during tissue fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3261–3266.
72. Ramos-Nino ME, Testa JR, Altomare DA et al. Cellular and molecular parameters of mesothelioma. *J Cell Biochem* 2006; 98: 723–734.
73. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324–331.
74. Lee AY, He B, You L et al. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 2004; 23: 6672–6676.
75. Sartore-Bianchi A, Gasparri F, Galvani A et al. Bortezomib inhibits nuclear factor-kappaB dependent survival and has potent in vivo activity in mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5942–5951.
76. Lee AY, Raz DJ, He B, Jablons DM. Update on the molecular biology of malignant mesothelioma. *Cancer* 2007; 109: 1454–1461.
77. Krimpenfort P, Ijpenberg A, Song JY et al. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature* 2007; 448: 943–946.
78. F. Sanger et al., *Nature* 265, 687 (1977).
79. P. H. Seeburg et al., *Trans. Assoc. Am. Physicians* 90, 109 (1977)
80. E. C. Strauss, J. A. Kobori, G. Siu, L. E. Hood, *Anal. Biochem.* 154, 353 (1986).
81. J. L. Weber, E. W. Myers, *Genome Res.* 7, 401 (1997).
82. P. Green, *Genome Res.* 7, 410 (1997). 23. J. C. Venter et al., *Science* 280, 1540 (1998).
83. J. C. Venter et al., *Science* 280, 1540 (1998).
84. Brookes AJ. The essence of SNPs, *Gene*. 1999 Jul 8, 234(2):177-86.

85. Shastri BS. SNPs: impact on gene function and phenotype, *Methods Mol Biol.* 2009;578:3-22.
86. Miller RD, Kwok PY. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine, *Hum Mol Genet.* 2001;10(20):2195-8.
87. Tagliabracci A., Alessandrini F., Mazzarini L, Onofri V, Onori, N, Turchi C. *Introduzione alla genetica forense*, Springer-Verlag Italia 2010.
88. Li WH, Sadler LA. 1991. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129:513–23.
89. Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, et al. 1998. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat. Genet.* 19:233–40.
90. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. 2000. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin. Genet.* 58:250–64
91. Emahazion T, Feuk L, Jobs M, Sawyer SL, Fredman D, et al. 2001. SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends Genet.* 17:407–13
92. Tost J, Gut IG. 2005. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin. Biochem.* 38:335–50
93. Kwok PY, Gu Z. 1999. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol. Med. Today* 5:538–43
94. Güzey C, Spigset O. 2004. Genotyping as a tool to predict adverse drug reactions. *Curr. Top Med. Chem.* 4:1411–21
95. Pirmohamed M, Park BK. 2001. Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:298–305

96. Marsh S, Kwok P, McLeod HL. 2002. SNP databases and pharmacogenetics: great start, but a long way to go. *Hum.Mutat.* 20:174–79
97. McCarthy JJ, Hilfiker R. 2000. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat.Biotechnol.* 18:505–8
98. https://www.aiom.it/wpcontent/uploads/2018/11/2018_LG_AIOM_Mesotelioma.pdf
99. Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, Travis WD; World Health Organization Committee for Tumors of the Pleura. The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2016 Feb;11(2):142-54
100. Husain AN, Colby T, Ordonez N, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2017 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2017; 142(1): 89-108
101. van Zandwijk N, Clarke C, Henderson D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Dis.* 2013 Dec;5(6):E254-307
102. Churg A, Attanoos R, Borczuk AC, et al. Dataset for Reporting of Malignant Mesothelioma of the Pleura or Peritoneum: Recommendations From the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Arch Pathol Lab Med.* 2016; 140: 1104-10
103. Novello S, Pinto C, Torri V, et al. The Third Italian Consensus Conference for Malignant Pleural Mesothelioma: State of the art and recommendations. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Aug;104:9-20.

104. Cigognetti M, Lonardi S, Fisogni S, et al. BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod Pathol.* 2015;28:1043–1057.
105. McGregor SM, Dunning R, Hyjek E, et al. BAP1 facilitates diagnostic objectivity, classification, and prognostication in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol.* 2015;46:1670–1678.
106. Sheffield BS, Hwang HC, Lee AF, et al. BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH to separate benign from malignant mesothelial proliferations. *Am J Surg Pathol.* 2015;39:977–982
107. Wang A, Papneja A, Hycza M, Al-Habeeb A, Ghazarian D. BAP1: gene of the month. *J Clin Pathol.* 2016 May 27. pii: jclinpath-2016-203866
108. Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, et al. Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer.* 2017;104:98- 105
109. Wu D, Hiroshima K, Yusa T, et al. Usefulness of p16/CDKN2A fluorescence in situ hybridization and BAP1 immunohistochemistry for the diagnosis of biphasic mesothelioma. *Ann Diagn Pathol.* 2017;26:31-37
110. Shinozaki-Ushiku A, Ushiku T, Morita S, Anraku M, Nakajima J, Fukayama M. Diagnostic utility of BAP1 and EZH2 expression in malignant mesothelioma. *Histopathology.* 2017;70(5):722-33
111. Hida T, Hamasaki M, Matsumoto S, et al. BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH results in combination provide higher confidence in malignant pleural mesothelioma diagnosis: ROC analysis of the two tests. *Pathol Int.* 2016;66(10):563-70

112. Walts AE, Hiroshima K, McGregor SM, Wu D, Husain AN, Marchevsky AM. BAP1 immunostain and CDKN2A (p16) FISH analysis: clinical applicability for the diagnosis of malignant mesothelioma in effusions. *Diagn Cytopathol.*2016;44(7):599-606
113. Hwang HC, Pyott S, Rodriguez S, et al. BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH in the diagnosis of sarcomatous and desmoplastic mesotheliomas. *Am J Surg Pathol.*2016;40(5):714-8
114. Hwang HC, Sheffield BS, Rodriguez S, et al. Utility of BAP1 immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology specimens. *Am J Surg Pathol.*2016;40(1):120-6
115. Andrici J, Sheen A, Sioson L, et al. Loss of expression of BAP1 is a useful adjunct, which strongly supports the diagnosis of mesothelioma in effusion cytology. *Mod Pathol.*2015;28(10):1360-8
116. Churg A, Sheffield BS, Galateau-Salle F. New markers for separating benign from malignant mesothelial proliferations: are we there yet? *Arch Pathol Lab Med.*2016;140(4):318-21
117. Righi L, Duregon E, Vatrano S, et al. BRCA1-Associated Protein 1 (BAP1) Immunohistochemical Expression as a Diagnostic Tool in Malignant Pleural Mesothelioma Classification: A Large Retrospective Study. *J Thorac Oncol* 2016;11(11):2006-17
118. Nasu M, Emi M, Pastorino S, Tanji M, Powers A, Luk H, et al. High Incidence of Somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2015;10(4):565-7

119. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev* 2017; 17: 475-88
120. Lo Iacono M, Monica V, Righi L, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes in advanced stage malignant pleural mesothelioma: a retrospective study. *J Thorac Oncol*. 2015 Mar;10(3):492-9
121. Desmeules P, Jpubert P, Zhang L, et al. A subset of malignant mesothelioma in young adults are associated with recurrent EWSR1/FUS-ATS1 fusions. *Am J Surg Pathol* 2017;41(7):980-88
122. Matullo G, Guarrera S, Betti M, Fiorito G, Ferrante D, et al. (2013) Genetic Variants Associated with Increased Risk of Malignant Pleural Mesothelioma: A Genome-Wide Association Study. *PLoS ONE* 8(4): e61253.
123. Gray SG, Fennell DA, Mutti L, O'Byrne KJ (2009) In arrayed ranks: array technology in the study of mesothelioma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 4: 411–425.
124. Garcia-Silva S, Aranda A (2004) The thyroid hormone receptor is a suppressor of ras-mediated transcription, proliferation, and transformation. *Mol Cell Biol* 24: 7514–7523.
125. 39. Martinez-Iglesias O, Garcia-Silva S, Tenbaum SP, Regadera J, Larcher F, et al. (2009) Thyroid hormone receptor beta1 acts as a potent suppressor of tumor invasiveness and metastasis. *Cancer Res* 69: 501–509.
126. 40. Lu C, Mishra A, Zhu YJ, Meltzer P, Cheng SY (2011) Genomic profiling of genes contributing to metastasis in a mouse model of thyroid follicular carcinoma. *American journal of cancer research* 1: 1–13.

127. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, et al. (2011) Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 43: 1022–1025.
128. Roe OD, Anderssen E, Helge E, Pettersen CH, Olsen KS, et al. (2009) Genomewide profile of pleural mesothelioma versus parietal and visceral pleura: the emerging gene portrait of the mesothelioma phenotype. *PloS one* 4: e6554.
129. Crispi S, Calogero RA, Santini M, Mellone P, Vincenzi B, et al. (2009) Global gene expression profiling of human pleural mesotheliomas: identification of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14) as potential tumour target. *PLoS One* 4: e7016.
130. Oh S, Shin S, Janknecht R (2012) ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochimica et biophysica acta* 1826: 1–12.
131. 44. Fagiani E, Giardina G, Luzi L, Cesaroni M, Quarto M, et al. (2007) RaLP, a new member of the Src homology and collagen family, regulates cell migration and tumor growth of metastatic melanomas. *Cancer research* 67: 3064–3073.
132. 45. Korzeniewski N, Cuevas R, Duensing A, Duensing S (2010) Daughter centriole elongation is controlled by proteolysis. *Molecular biology of the cell* 21: 3942–3951.
133. Tunesi S. et al., Gene–asbestos interaction in malignant pleural mesothelioma susceptibility, *Carcinogenesis*, 2015, Vol. 36, No. 10, 1129–1135.
134. Cadby G. et al., A genome-wide association study for malignant mesothelioma risk, *Lung Cancer* 82 (2013) 1–8
135. Patino-Lopez G, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Verge GM, Lechner SM, et al. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2006;171:145–55.

136. Umetsu DT, DeKruyff RH. Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma: the many pathways to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:975–9.
137. Garay E, Patino-Lopez G, Islas S, Alarcon L, Canche-Pool E, Valle-Rios R, et al. CRTAM: a molecule involved in epithelial cell adhesion. *J Cell Biochem* 2010;111:111–22.
138. Du R, Litonjua AA, Tantisira KG, Lasky-Su J, Sunyaev SR, Klanderman BJ, et al. Genome-wide association study reveals class I MHC-restricted T cell-associated molecule gene (CRTAM) variants interact with vitamin D levels to affect asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:368–73, 373 e1-5.
139. Yoon S, Woo SU, Kang JH, Kim K, Shin HJ, Gwak HS, et al. NF-kappaB and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. *Oncogene* 2012;31:3467–81.
140. Bosco N, Pelliccia F, Rocchi A. Characterization of FRA7B, a human common fragile site mapped at the 7p chromosome terminal region. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;202:47–52.
141. Calvo F, Sanz-Moreno V, Agudo-Ibanez L, Wallberg F, Sahai E, Marshall CJ, et al. RasGRF suppresses Cdc42-mediated tumour cell movement, cytoskeletal dynamics and transformation. *Nat Cell Biol* 2011;13:819–26.
142. Vogelstein, B., & Gillespie, D (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 615 – 619.
143. Tereba, A. M., et al. (2004) Simultaneous isolation and quantitation of DNA. U.S. Patent 6, 673, 631.

144. Hanselle, T. et al. (2003) Isolation o genomic DNA from buccal swab for forensic analysis using fully automated silica-membrane purification technology. *Legal Medicine*, 5, S145-S149.
145. Budowle B, Schutzer SE, Einseln A, Kelley LC, Walsh AC, Smith JA, Marrone BL, Robertson J, Campos J (2003) Public health. Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science* 301:1852–3
146. Saldanha J, Minor P (1994) A sensitive PCR method for detecting HCV RNA in plasma pools, blood products, and single donations. *J Med Virol* 43:72–6. Mullis KB (July 28, 1987) Process for amplifying nucleic acid sequences. US4683202
147. Kolmodin LA, Williams JF (1997) PCR. Basic principles and routine practice. *Met Mol Biol* 67:3–15
148. Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR, *Cold Spring Harb Protoc.* 2009; 2009(4):pdb.ip66
149. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl Acids Res* 20:1717–23.
150. Paul N, Shum J, Le T. Hot Start PCR, *Methods Mol Biol.* 2010; 630: 301-18
151. Green MR, Sambrook J. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR), *Cold Spring Harb Protoc.* 2018; 2018(5): pdb.prot095125.
152. Bocek P. Electrophoresis: past, presenti and future. Editorials *Electrophoresis.* 2009 Jun; 30 Suppl 1:S1.
153. Robert F, Bouilloux JP, Denoroy L. Capillary electrophoresis: principle and applications, *Ann Biol Clin (Paris).* 1991; 49(3):137-48.

154. F. Sanger, A.R. Coulson (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 25;94(3): 441-448.
155. Estrada-Rivadeneira D. Sanger sequencing, *FEBS J.* 2017; 284(24):4174
156. Heiner CR., Hunkapiller KL, Chen SM, Glass Ji, Chen EY. Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry, *Genome Res.* 1998;8(5):557-61.
157. Consensus Report 1997: Asbestos, asbestosis, and cancer: the Helsinki criteria for diagnosis and attribution. *Scand J Work Environ Health.* 1997; 23: 311-6.
158. QIAamp® DNA Micro HandBook, Third Edition, December 2014, QIAGEN®.
159. https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_HS_Assay_UG.pdf