Capitolo primo: INTRODUZIONE……...1

1.1 EPILESSIA POST TRAUMATICA…….1

1.1.1 Breve storia dell'epilessia……1

1.1.2 Epilessia ed epilettogenesi……....3

1.1.3 Cause e possibili fattori scatenanti……...6

1.1.4 Epidemiologia……...7

1.1.5 Diagnosi e classificazione……9

1.1.6 Epilessia post traumatica……....11

1.1.7 Epilessia post traumatica e trattamento……12

1.1.8 Geni ed epilessia post traumatica……...13

1.1.8.1 IL-1β……..15

1.1.8.2 GAD1……16

1.1.8.3 SLC1A1…….....17

1.1.8.4 ADORA1……...20

1.2 IL DNA NUCLEARE E I SUOI POLIMORFISMI……...22

1.2.1 Organizzazione del genoma……....22

1.2.2 Variabilità genetica: mutazioni e polimorfismi……24

1.2.3 Polimorfismi a singolo nucleotide…….....26

1.2.4 SNPs e applicazioni in genetica……29

Capitolo secondo: TECNICHE DI ANALISI…….31

2.1 Reazione a catena della polimerasi…….31

2.1.1 Hot Start PCR…….33

2.2 Elettroforesi…….....34

2.2.1 Elettroforesi su gel di agarosio……....36

2.2.2 TapeStation……...37

2.2.3 Elettroforesi capillare…….39

2.3 Il sequenziamento del DNA…….40

2.3.1 Sequenziamento di Sanger……....42

Capitolo terzo: SCOPO DELLA TESI……45

Capitolo quarto: MATERIALI E METODI……...46

4.1 Raccolta dei campioni ……....46

4.1.1 Informazione al paziente e consenso informato……....48

4.2 Disegno dei primers……...…48

4.3 Estrazione del DNA……....54

4.4 Amplificazione degli SNPs in singolo……....57

4.5 Quantificazione dei prodotti di amplificazione…….60

4.6 Purificazione del DNA amplificato……....62

4.7 Reazione di sequenza…….63

4.8 Rimozione dei ddNTP non incorporati…….65

4.9 Elettroforesi capillare……66

4.10 Analisi delle sequenze……67

Capitolo quinto: RISUTATI……68

5.1 Controllo dei prodotti di amplificazione……68

5.2 Analisi genetica dei polimorfismi SNPs ……81

Capitolo sesto: DISCUSSIONE……86

BIBLIOGRAFIA ……..91

RINGRAZIAMENTI……..100

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 EPILESSIA POST TRAUMATICA

1.1.1 *Breve storia dell'epilessia*

La parola epilessia deriva dal verbo greco *έπιλαμβάνειν* (*epilambanein*) che significa "*essere sopraffatti, essere colti di sorpresa*".

Tale definizione sintetizza perfettamente i caratteri fondamentali della crisi epilettica, che si manifesta all'improvviso, cessa spontaneamente e tende solitamente a ripetersi, senza che colui il quale ne è affetto, possa opporvisi. Proprio per queste sue caratteristiche di imprevedibilità ed inspiegabilità l'epilessia anticamente veniva definita morbo sacro, ed era ritenuta essere causata dall'azione di forze maligne della natura o da divinità avverse. Anche le cure utilizzate per trattare i fenomeni epilettici erano quindi legate alla sfera divina o trascendente. Tra i più antichi rituali di guarigione utilizzati in Grecia va ricordata la "pratica dell'incubazione" in cui l'individuo affetto da epilessia veniva fatto dormire sopra una lastra di pietra nel tempio d'Esculapio, il dio dell'arte medica. Di fondamentale importanza era considerata l'influenza della luna piena sulla ricorrenza degli attacchi epilettici. Ulteriori trattamenti prevedevano l'utilizzo dei semi e delle radici della peonia, della polvere delle ossa di cranio e del sangue umano. Plinio il Vecchio nei suoi scritti ha

riportato l'usanza di cospargere di sangue umano la bocca di un epilettico o di fargli succhiare il sangue che usciva dalla bocca di un gladiatore morente per trarne risultati terapeutici. Ippocrate di Kos, con il suo trattato sull'epilessia dal titolo "*De Morbo Sacro*", fu il primo grande autore del passato a rifiutare il carattere sovrannaturale dell'epilessia. Egli sottolinea come l'epilessia abbia origini di tipo ereditario ed embriologico, connesse con una malformazione del cervello, indicando, per la prima volta, il sistema nervoso come sede di tale malattia e di tutte le malattie mentali. Gli studi e le osservazioni sull'epilessia subirono un lungo periodo di stasi, per poi riabbracciare le tesi demoniaco - trascendentali durante tutto il Medio Evo, riportando di fatto la medicina in epoca pre-ippocratica. In questo periodo gli epilettici erano considerati "posseduti dal demonio" e contagiosi per i propri simili e questo fece sì che si diffondessero ovunque pratiche d'esorcismo molto violente (che spesso provocavano la morte dell'ammalato) e che il fanatismo religioso condizionasse completamente il trattamento di questi particolari pazienti.

Non era infrequente inoltre che donne epilettiche rimaste incinte venissero sepolte vive con la propria prole, e che gli uomini fossero castrati. Con queste credenze e "approcci terapeutici" si giunse al XIX secolo, quando Bravais prima e in seguito Jackson gettarono le basi per la moderna concezione dell'epilessia. Quest'ultimo in particolare nel 1861 intuì, grazie ad un'attenta

osservazione clinica che la crisi epilettica dipende da “una scarica occasionale, improvvisa, eccessiva e rapida, localizzata nelle cellule nervose della materia grigia”. Bisognò, comunque, aspettare gli inizi del novecento per assistere all'introduzione di nuovi approcci terapeutici basati sulle teorie di Jackson. Difatti nel 1912 Hauptmann introdusse il fenobarbitale, un composto con un’attività anticonvulsivante intensa e poco tossico.

Nei primi decenni del XX secolo anche le indagini diagnostiche compirono un eccezionale passo in avanti, difatti si deve al tedesco Berger la prima registrazione nel 1921 dell’attività elettrica celebrale nell’uomo. Ad oggi le tecniche diagnostiche e gli approcci terapeutici si sono enormemente raffinati, giungendo ad importanti risultati sia nella valutazione della causa responsabile di una particolare epilessia, sia sul controllo delle crisi epilettiche. Rimangono, comunque, aperti diversi interrogativi alla base della fisiopatologia delle crisi epilettica sia dal punto di vista cellulare che di circuito [1].

1.1.2 Epilessia ed epilettogenesi

L’epilessia è un disturbo cerebrale caratterizzato da una persistente predisposizione a sviluppare crisi epilettiche e dalle conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali di questa condizione.

La definizione di epilessia richiede il verificarsi di almeno una crisi epilettica [2] [3]. Le crisi epilettiche sono l'espressione di un'alterata funzionalità dei neuroni cerebrali. I neuroni sono le cellule più importanti del nostro cervello e comunicano tra loro attraverso scambi biochimici che si traducono poi in impulsi elettrici. Quando i neuroni, per molteplici ragioni, manifestano un'attività elettrica eccessiva, paragonabile ad una scarica elettrica incontrollata e sproporzionata, danno origine alla crisi epilettica, che inizia all'improvviso e termina più o meno rapidamente. L'ipereccitabilità neuronale dipende da alterazioni delle correnti ioniche che attraversano la membrana di queste cellule. In genere, si pensa che uno dei più frequenti meccanismi dell'epilessia sia lo sbilanciamento tra azione inibitoria (mediata prevalentemente dai neurotrasmettitori GABA) ed azione eccitatoria (mediata da neurotrasmettitori come il glutammato). La membrana plasmatica neuronale è costituita da un *bilayer* lipidico impermeabile agli ioni. Tuttavia gli ioni possono fluire attraverso la membrana, secondo un gradiente elettrochimico, attraverso canali costituiti da complessi proteici, che possono essere attivati da variazioni di voltaggio o da specifici ligandi.

Le pompe ioniche creano e mantengono il potenziale di riposo (-70 mV) attraverso il consumo di ATP, mentre le correnti ioniche che fluiscono attraverso i canali determinano dei cambiamenti di stato. Tipicamente, la

depolarizzazione della membrana, ad esempio a seguito dell'azione di un neurotrasmettitore, attiva i canali del sodio e del calcio voltaggio-dipendenti, che a loro volta determinano l'insorgenza del potenziale d'azione (Figura 1). Successivamente, i canali del potassio voltaggio- dipendenti si attivano e ripolarizzano la membrana. A seguito dell'arborizzazione assonale e ai numerosissimi contatti sinaptici, il segnale viene rapidamente propagato, reclutando altri neuroni in una attività sincronizzata. Pertanto lo sbilanciamento delle correnti eccitatorie o inibitorie è considerato alla base dell'epilettogenesi [4].

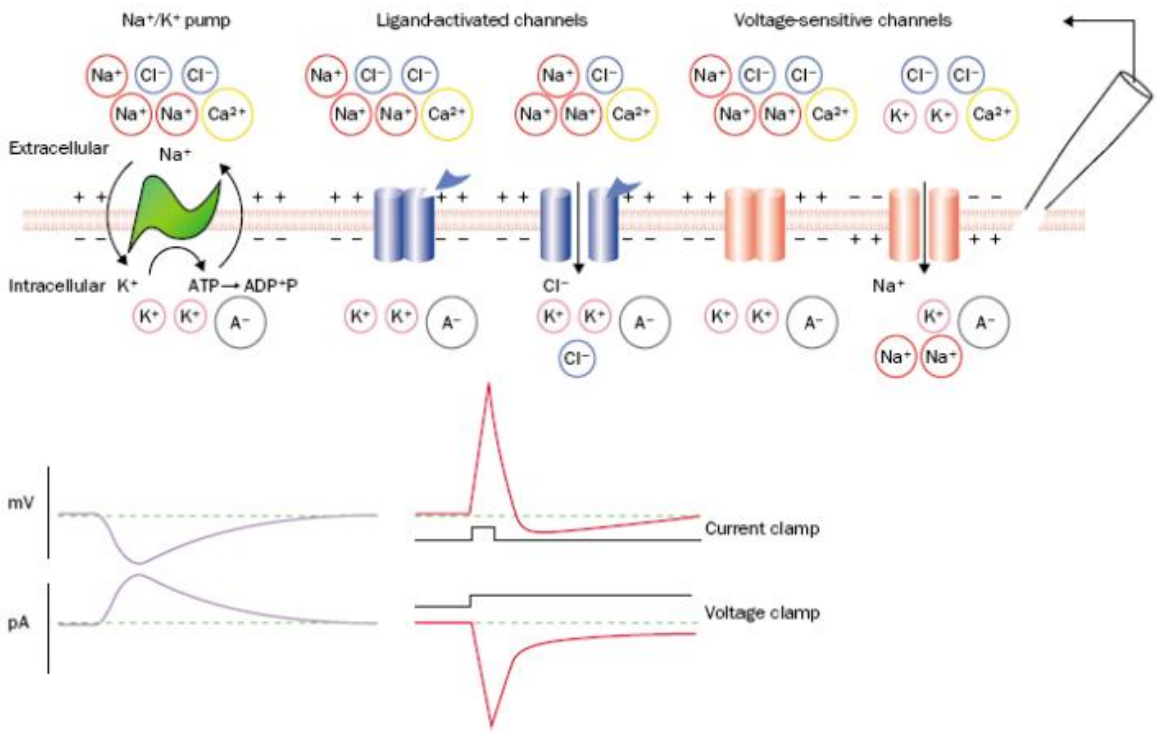


Figura 1. Rappresentazione schematica dei flussi ionici che portano ai cambiamenti del potenziale di membrana.

Perché il processo di epilettogenesi abbia inizio è necessario che ci sia un insulto iniziale. Questo sarà, probabilmente, il fattore scatenante della prima crisi epilettica. Dopo la manifestazione del primo evento critico si avrà un periodo silente (periodo latente), durante il quale il processo dell'epilettogenesi indurrà alterazioni progressive che porteranno allo sviluppo conclamato della sindrome epilettica caratterizzato dalla presenza di crisi epilettiche spontanee [5].

1.1.3 Cause e possibili fattori scatenanti

Si ritiene che cause genetiche siano alla base della maggior parte di quelle epilessie che fino a qualche anno fa venivano definite idiopatiche. Altre epilessie (un tempo definite sintomatiche) sono dovute invece a lesioni strutturali cerebrali legate a eventi che si possono verificare in gravidanza o durante il parto per sofferenza fetale, oppure essere conseguenti a malformazioni del cervello (per un’alterazione dello sviluppo della corteccia cerebrale), a esiti di malattie infettive del sistema nervoso centrale (meningiti, encefaliti), di traumi cranici gravi (per es. dopo incidenti stradali), di tumori cerebrali, di ictus cerebrali (soprattutto negli anziani), di malformazioni dei vasi sanguigni cerebrali (Figura 2). Esistono inoltre molti fattori esterni che possono facilitare la comparsa, in un soggetto predisposto, di una crisi

epilettica (Figura 2). È noto che in alcuni soggetti predisposti possono comparire crisi epilettiche dopo stress psicofisici eccessivi o in seguito a importanti modificazioni del ciclo sonno-veglia. Anche l'eccessiva assunzione di alcool o il consumo di sostanze eccitanti o droghe possono facilitare la comparsa di crisi. Nondimeno, alcuni soggetti sono particolarmente sensibili all'effetto di stimoli luminosi, sia artificiali che naturali [5].

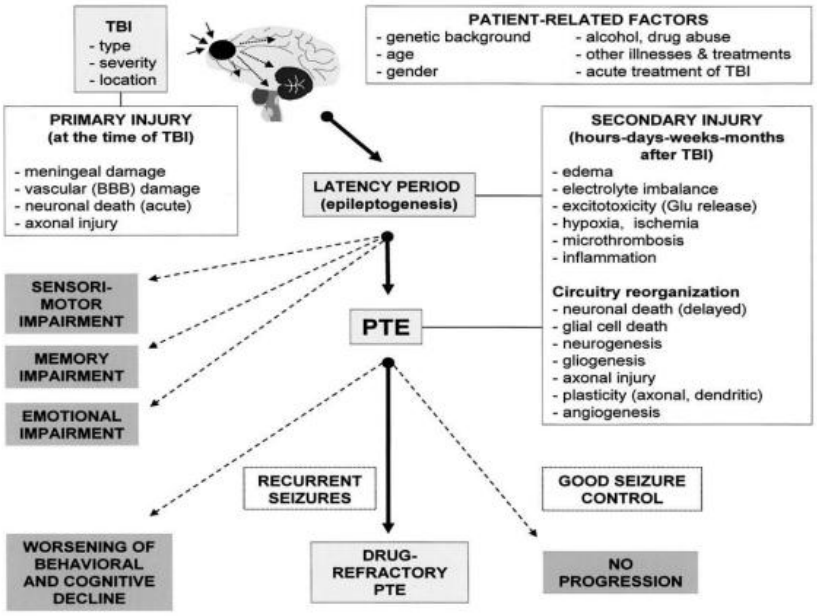


Figura 2. Rappresentazione schematica dei fattori implicati nel processo di epilettogenesi.

1.1.4 Epidemiologia

L'epilessia è una delle malattie neurologiche più diffuse, tanto da essere riconosciuta come malattia sociale dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). È probabile inoltre che la sua frequenza sia sottostimata, perché

spesso l'epilessia è tenuta nascosta per motivi psicologici e sociali. Nei Paesi industrializzati, l'epilessia interessa circa 1 persona su 100: si stima quindi che in Europa circa 6 milioni di persone abbiano un'epilessia in fase attiva (cioè con crisi persistenti e/o tuttora in trattamento) e che la malattia interessi in Italia circa 500.000-600.000 persone. Le epilessie possono colpire tutte le età della vita, ma i picchi di maggiore incidenza si hanno nei bambini e negli anziani (dopo i 65 anni di età) (Figura 3). Nei Paesi in via di sviluppo l'incidenza dell'epilessia è verosimilmente maggiore, anche se non vi sono dati epidemiologici certi [5].

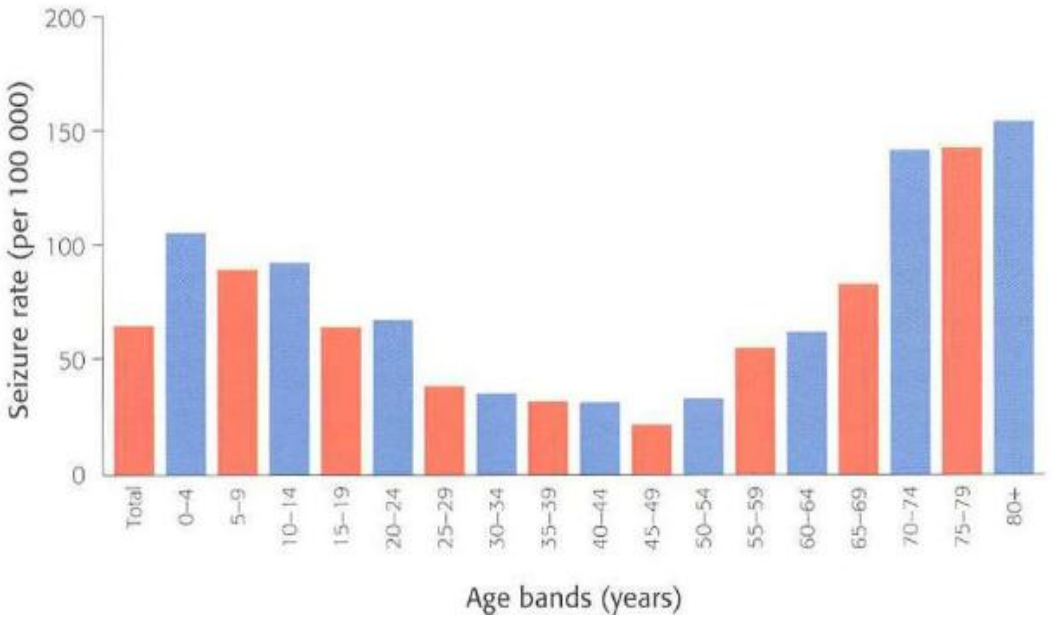


Figura 3. Incidenza dell'epilessia sulla popolazione generale.

1.1.5 Diagnosi e classificazione

Dal punto di vista clinico per porre una diagnosi di epilessia è necessario che il soggetto abbia avuto almeno due crisi epilettiche a distanza di tempo superiore alle 24 ore e che le crisi siano avvenute spontaneamente, cioè non siano state provocate da fattori specifici o da situazioni particolari.

In alternativa, è possibile porre diagnosi di epilessia qualora il paziente abbia avuto una singola crisi epilettica non provocata (o spontanea) e presenti un elevato rischio di ricorrenza di crisi epilettiche, in rapporto a specifiche caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche. Inoltre, ci sono una serie di esami che permettono di stabilire il tipo di crisi manifestata dal paziente, definire la sindrome e individuare la causa, tra cui anamnesi, elettroencefalogramma (EEG), risonanza magnetica (RM), tomografia computerizzata (TC) [5].

In letteratura sono stati descritti numerosi tipi di epilessia, classificabili in parziali e generalizzati [2]:

- EPILESSIE PARZIALI: il focus epilettogeno interessa soltanto un emisfero cerebrale. Possono essere ulteriormente classificate in semplici o complesse. Nel primo caso si caratterizzano per attacchi leggeri, che non si traducono mai in perdite di conoscenza; al contrario, le epilessie complesse comportano manifestazioni più severe, sempre

accompagnate da perdita di conoscenza (generalmente di breve durata) e da contrazioni muscolari più intense (Figura 4).

- EPILESSIE GENERALIZZATE: i neuroni che causano gli attacchi interessano entrambi gli emisferi. Si accompagnano quasi sempre a perdita di conoscenza associata a manifestazioni contrattili e spasmi di tipo mioclonico/tonico e tonico/clonico (Figura 4).

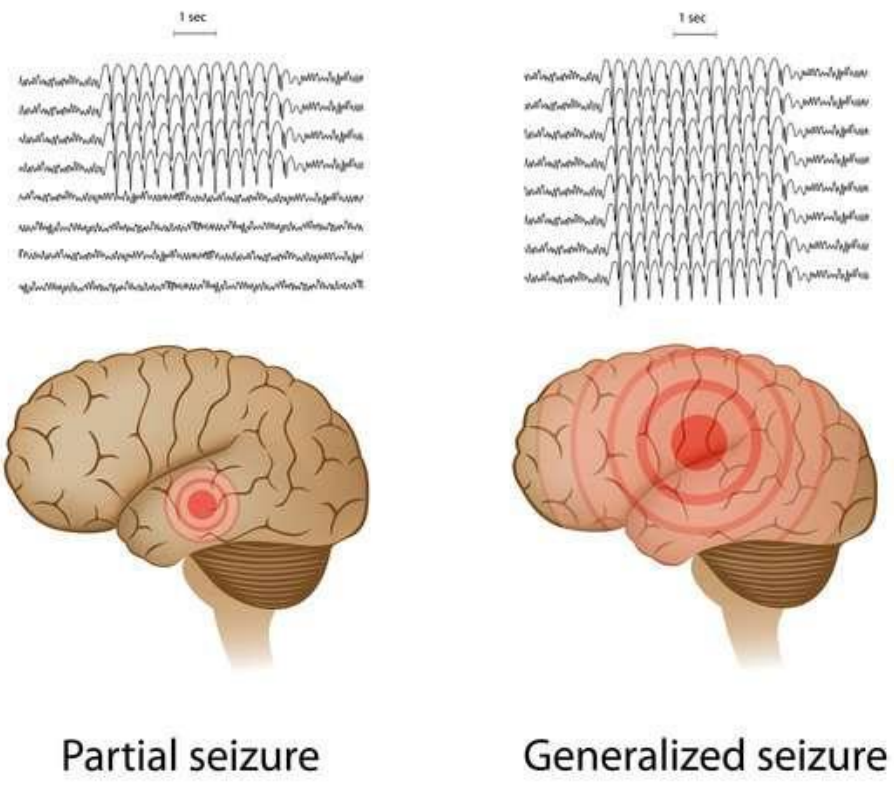


Figura 4. Raffigurazione della variazione del tracciato EEG nelle crisi parziali e generalizzate in un secondo.

1.1.6 Epilessia post traumatica

Il trauma cranico (*TBI: Traumatic Brain Injury*) è una delle cause più frequenti dello sviluppo di epilessia. Si stima che il 25% dei pazienti con traumi con contusione cerebrale e il 50% di quelli con ferite penetranti che provocano brecce durali, sviluppino attacchi epilettici. L'epilessia post-traumatica si distingue in immediata, precoce e tardiva: si definisce immediata, quando si verifica nelle prime 24 ore dal trauma cranico, precoce, quando si verifica entro la prima settimana dall'evento traumatico e tardiva, quando si sviluppa dopo la prima settimana, anche a distanza di mesi [6].

L'altro insieme di definizioni che deve essere tenuto in considerazione per gli studi relativi all'epilessia post-traumatica è il grado del TBI. La gravità del TBI viene classificata come lieve (perdita di coscienza per meno di 30 minuti e nessuna frattura cranica), moderato (perdita di coscienza superiore a 30 minuti e inferiore a 24 ore, con o senza frattura cranica) e grave (perdita di coscienza superiore a 24 ore, con contusione, ematoma o frattura del cranio) [7]. Inoltre, è stato dimostrato recentemente che i bambini piccoli manifestano soprattutto crisi precoci, ma gli adolescenti e gli adulti hanno maggiori probabilità di diventare epilettici dopo un periodo di latenza. In uno studio che ha valutato il rischio di sviluppare epilessia nei bambini e nei giovani adulti affetti da TBI, è stato riscontrato che il rischio di epilessia dipendeva

dalla gravità del trauma e dall'età del paziente che, più è elevata, più nel periodo post trauma ha una probabilità maggiore di sviluppare l'epilessia cronica [8].

1.1.7 Epilessia post traumatica e trattamento

Lo sviluppo dell'epilessia post traumatica causa danni secondari al cervello. L'attività convulsiva può generare ipossia, aumento intracranico della pressione, edema cerebrale, emorragia intracranica, aumento della domanda metabolica nel cervello ed eccitotossicità da glutammato. Al fine di prevenire le sequele neurologiche permanenti, il trattamento del neurotrauma per quanto riguarda lo sviluppo delle crisi, rientra in una delle due categorie: profilassi per crisi acute o gestione della PTE, che si sono concentrati sull'uso di farmaci antiepilettici (AED). La profilassi è attualmente raccomandata per gravi TBI da parte dei principali comitati consultivi (Brain Trauma Foundation e American Academy of Neurologia) per i primi 7 giorni.

I farmaci antiepilettici attualmente conosciuti hanno tre principali meccanismi d'azione [48]:

1. Potenziamento dell'azione del GABA (neurotrasmettitore inibitorio del cervello: che, legandosi ai suoi recettori GABA-A, GABA-B e GABA-C, favorisce l'inizio della cascata di segnali inibitori e la trasmissione

GABA-ergica. Potenziando l'azione del GABA, si migliora l'eccitabilità dei neuroni del SNC).

2. Soppressione dei canali per il sodio: il meccanismo dell'azione epilettica passa da un neurone all'altro tramite i canali del sodio. Inibendoli, si inibisce il passaggio della scarica.
3. Inibitori dei canali del calcio: quando si depolarizza una cellula, i canali del calcio presenti nel SNC possono favorire un attacco epilettico nelle persone che soffrono di epilessia. I farmaci, andando ad inibire i canali del calcio, controllano l'insorgenza di crisi poiché stabilizzano l'attività elettrica del cervello .

Mentre ci sono prove che questi anticonvulsivi profilattici riducono le crisi precoci, non c'è nessun beneficio dimostrato per la prognosi a lungo termine. Nonostante i loro usi simili, i farmaci disponibili indirizzano verso percorsi diversi. Quindi, prima di prescriverli, bisogna tenere in considerazione la gravità della lesione, lo stato del paziente, e il profilo degli effetti collaterali deve essere attentamente esaminato [9] [10].

1.1.8 Geni ed epilessia post traumatica

Sebbene il meccanismo esatto che porta allo sviluppo dell'epilessia indotta da TBI rimane scarsamente compreso, lo studio di numerosi geni ha suggerito

che la suscettibilità allo sviluppo di questa forma di epilessia sia dovuta ad alcune modificazioni genetiche. I geni coinvolti nel TBI possono essere approssimativamente classificati in quelli che influenzano l'entità della lesione (ad es. Citochine pro-e anti-infiammatorie) e quelli che influenzano la riparazione e la plasticità (per esempio, i geni neurotrofici) [11] [12]. Un'ulteriore categoria di geni che dovrebbero essere considerati sono quelli che influenzano la capacità cognitiva e neurocomportamentale pre e post TBI.

Al giorno d'oggi, sempre di più si sta cercando di attribuire un significato alla variabilità interindividuale osservata nella previsione dell'*outcome* funzionale e cognitivo a seguito di una lesione cerebrale [14] [15]. Queste variazioni, sono il risultato di alterazioni nella sequenza del DNA all'interno un determinato gene e sono indicati come polimorfismi genetici. I polimorfismi possono derivare da inserzioni o delezioni di brevi tratti di DNA all'interno di un gene, interferendo con la normale funzione dello stesso, o da sostituzioni di un singolo nucleotide (G, A, T o C). Quando un singolo nucleotide è responsabile delle modificazione nel DNA, viene indicato come polimorfismo a singolo nucleotide o SNP. Gli SNP sono il tipo più comune di variazione genetica, che si verifica con una frequenza di 1 ogni 100-300 nucleotidi, pari a circa 10 milioni nel genoma umano [11] [13]. Un SNP può trovarsi all'interno della sequenza codificante di un gene, e quindi alterare la

composizione aminoacidica di una proteina, o all'interno di una regione non codificante, come un promotore o un introne, influenzando l'espressione del gene e del suo prodotto proteico [15].

1.1.8.1 IL-1β

La famiglia IL-1 è composta da due citochine proinfiammatorie, IL-1α e IL-1β e da un antagonista del recettore, IL-1RA, che si trovano sul cromosoma 2 (2q14.1), e codificati rispettivamente dai geni IL-1A, IL 1B e IL-1RN. IL-1RA modula la risposta immunitaria legandosi ai recettori IL-1, che a loro volta inibiscono le azioni di IL-1α e IL-1β [19] [17]. Nel sistema nervoso centrale (CNS), microglia e astrociti attivati, così come nella periferia, i macrofagi e altre cellule immunitarie, sono i principali produttori di IL-1 e, a seguito di un trauma cranico, vi è un rapido aumento di IL-1, che è stato associato a lesioni ai neuroni dell'ippocampo [21]. In particolare, in seguito ad un trauma cranico, il tessuto leso aumenta l'adenosina trifosfato extracellulare, che a sua volta media l'attivazione della microglia del CNS e la produzione e il rilascio di IL-1β. Studi precedenti hanno riportato l'aumento dell'espressione di IL-1β, l'attivazione microgliale e la morte cellulare fino a un anno dopo un TBI, suggerendo che IL-1β può essere considerato un utile *marker* di infiammazione cronica che facilita e perpetua il rischio di PTE

[21]. La grande produzione di IL-1β, aumenta l'ipereccitabilità e l'eccitotossicità del CNS attraverso meccanismi calcio-dipendenti, glutamatergici e GABAergici che potenzialmente contribuiscono all'epilettogenesi. Inoltre, l'interruzione del percorso di biosintesi di IL-1β, tramite inibitori dell'enzima di conversione IL-1β (ICE / caspase-1), determina un ritardo dell'insorgenza nel tempo e nella frequenza delle crisi indotte chimicamente [22].

1.1.8.2 GAD1

Un legame comune tra la fisiopatologia associata alla TBI secondaria e la suscettibilità alle crisi epilettiche è il sistema di neurotrasmissione dell'acido gamma aminobutirrico (GABA). Il GABA è un neurotrasmettitore inibitorio primario nel cervello e, in condizioni fisiologiche, modula il tono eccitatorio [23] [49]. Quando questo equilibrio viene perturbato, possono verificarsi convulsioni. Il GABA si forma nei terminali degli assoni GABAergici e viene rilasciato nelle sinapsi, dove agisce in uno dei due tipi di recettori: GABA-A, che controlla l'ingresso di cloro nella cellula, e GABA-B, che aumenta la conduttanza di potassio, diminuisce l'ingresso di calcio e inibisce il rilascio pre-sinaptico di altri neurotrasmettitori. Il legame con il recettore GABA-A influenza la porzione precoce del potenziale post-sinaptico inibitorio mediato

da GABA, mentre il legame con GABA-B influenza la porzione tardiva [24] [50]. Il GABA è sintetizzato a partire dal glutammato, mediante l'attività dell'enzima glutammico acido-decarbossilasi (GAD). La proteina GAD matura ha due forme: GAD67, codificata dal gene GAD1 e GAD65, codificata dal gene GAD2, entrambe le quali sono responsabili della catalisi della produzione di GABA dal glutammato nel cervello. La localizzazione cromosomica è rispettivamente 2q31 e 10p11. Prove di studi sperimentali e clinici riportano che il GABA ha un ruolo importante nel meccanismo fisiopatologico di PTE e nel trattamento dell'epilessia: ad esempio, un aumento del GABA extracellulare, in combinazione con un aumento del glutammato extracellulare, è stato documentato in seguito a TBI [25]. L'aumento dei livelli di GABA può rappresentare un meccanismo di compensazione per combattere l'eccitotossicità e l'attività di crisi precoce nel cervello leso [26].

1.1.8.3 SLC1A1

Il glutammato, è il più importante neurotrasmettitore eccitatorio nel cervello umano. In risposta ad un TBI primario, vi è un rilascio immediato di glutammato nello spazio extracellulare e l'attivazione dei canali ionici. Questi fenomeni possono portare alla depolarizzazione neuronale, all'interruzione

del metabolismo cellulare e a livelli citotossici di glutammato. L'eccitotossicità, a sua volta, è in grado di portare a gonfiore neuronale e astrocitario, danno mitocondriale, morte cellulare e PTS immediato/precoce. Le convulsioni causano un'eccessiva attivazione dei recettori degli aminoacidi eccitatori, inducendo la produzione calcio-dipendente di ossido nitrico e specie reattive dell'ossigeno con conseguente danno al DNA e alle membrane cellulari da parte dei radicali liberi [27]. Inoltre, recenti studi mostrano una ridotta espressione regionale del trasportatore di glutammato che viene mantenuta cronicamente costante nella fase post-lesione ed è modificabile con Levetiracetam [28]. Queste osservazioni suggeriscono che una riduzione della *clearance* del glutammato e un'eccitossicità di basso livello, contribuiscono all'epilettogenesi. Nondimeno, la variazione genetica nei geni del trasportatore di glutammato può predisporre gli individui all'eccitotossicità dopo TBI. Ci sono cinque trasportatori di glutammato nel sistema nervoso centrale umano, codificati da geni separati. Di questi, i geni SLC1A1 e SLC1A6 codificano per i trasportatori di glutammato neuronale e i trasportatori di aminoacidi eccitatori (EAAT) 3 e 4. EAAT3/4 contribuiscono, ma non sono i principali trasportatori responsabili dell'assorbimento extracellulare di glutammato nella maggior parte delle regioni del cervello (Figura 5). Tuttavia, nelle regioni del cervello in cui l'espressione degli

astrociti è limitata, questi trasportatori possono giocare un ruolo dominante nella *clearance* del glutammato. L'espressione di EAAT4 è limitata alle cellule di Purkinje, mentre EAAT3 è espresso a livello di più tipi di neuroni. Oltre alla terminazione del segnale del glutammato, gli studi suggeriscono che EAAT3 è vitale per la sintesi del glutatione e del GABA [29]. Tuttavia, l'interruzione di queste funzioni potrebbe aumentare la suscettibilità alle crisi epilettiche attraverso l'eccitossicità, la diminuzione delle riserve di antiossidanti o la riduzione della neurotrasmissione inibitoria. Ricerche precedenti dimostrano che la variazione all'interno di SLC1A1 e SLC1A6 e l'espressione EAAT3 / 4 aumentata sono associate a molteplici condizioni neurologiche tra cui la sclerosi multipla, la schizofrenia e l'epilessia [30]. L'associazione tra i trasportatori del glutammato neuronale e diversi disordini neurologici riflettono l'importanza dell'equilibrio eccitatorio/inibitorio e suggeriscono che alcune varianti multiple possono contribuire ai singoli fenotipi e patologie [27].

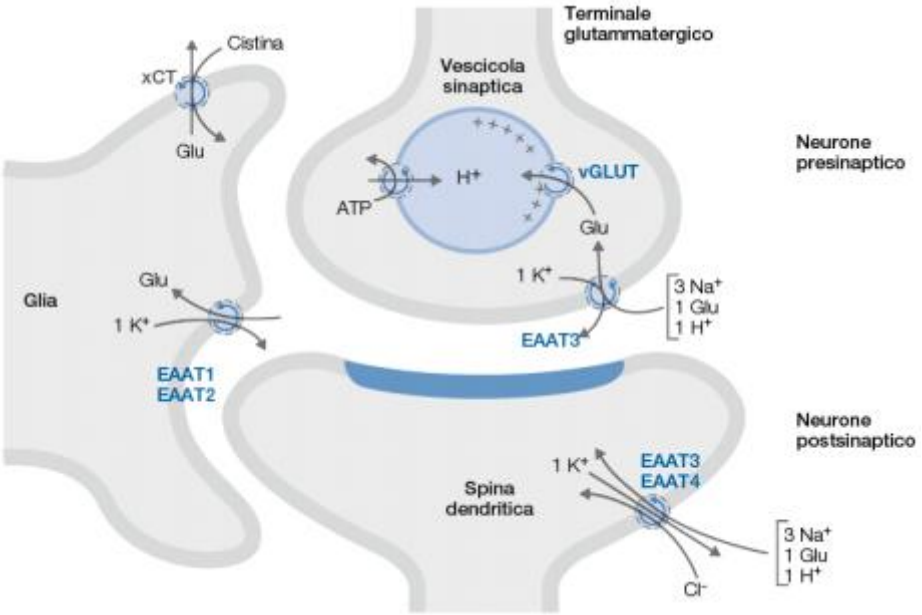


Figura 5. Rappresentazione schematizzata dei meccanismi di scambio ionico e rilascio di glutammato nei neuroni.

1.1.8.4 ADORA1

L'adenosina è un nucleoside endogeno costituito da un sistema purinico (adenina) legato ad una porzione zuccherina (ribosio) attraverso un legame β-N9 -glicosidico. Come regolatore delle funzioni metaboliche, l'adenosina si accompagna ad altri derivati nucleotidici come ATP, ADP, AMP, AMPc. E' un importante neuro-modulatore sia a livello del sistema nervoso centrale (SNC) che periferico ed esplica le sue funzioni fisiologiche interagendo con quattro sottotipi recettoriali accoppiati a proteine G: A1, A2A, A2B, A3. Questi recettori vengono codificati da geni diversi, rispettivamente ADORA1, ADORA2A, ADORA2B, ADORA3 e collocazione cromosomica 1q32.1 per

ADORA1, 22q11.23 per ADORA2A, 17p12 per ADORA2B e 1p13.2 per ADORA3. L'ampia varietà di effetti biologici provocata dall'interazione dell'adenosina con il recettore A1 è dovuta alla vasta distribuzione di questo recettore nell'organismo (SNC e organi interni quali cuore, reni, fegato e vescica). L'attivazione dei recettori A1 pre- e post-sinaptici presenti in tutte le aree cerebrali, ma soprattutto nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale, determina un effetto sedativoipnotico, anticonvulsivante, antiansia e deprimente l'attività locomotoria. Questo è dovuto all'iperpolarizzazione neuronale, determinata dall'apertura dei canali del K+ e dalla chiusura di quelli del Ca2+, che impedisce l'esocitosi di diversi neurotrasmettitori (acetilcolina, GABA, dopamina, glutammato e serotonina) dalle vescicole nello spazio sinaptico [31]. Questo ruolo nell'inibizione dell'esocitosi pre-sinaptica è risultato interessante nello studio del meccanismo di insorgenza degli attacchi epilettici: è stato osservato infatti che l'adenosina viene liberata in grosse quantità a seguito delle ripetute scariche depolarizzanti, e la conseguente inibizione del rilascio di neurotrasmettitori blocca la diffusione della scarica epilettica. L'osservazione di questo meccanismo endogeno di protezione ha aperto quindi nuove possibilità di intervento nel controllo dell'epilessia e del conseguente danno neuronale [32].

1.2 IL DNA NUCLEARE E I SUOI POLIMORFISMI

1.2.1 Organizzazione del genoma

Il genoma rappresenta il materiale genetico di un individuo e contiene l' informazione necessaria per la nascita, lo sviluppo e il mantenimento degli organismi viventi. Costituente fondamentale del genoma è il DNA (acido desossiribonucleico), costituito da catene complementari antiparallele di nucleotidi (adenina, guanina, citosina, timina) tenute insieme da legami idrogeno e avvolte in una struttura a doppia elica. Nell'uomo il DNA ha una lunghezza di 3,3 x 10^9 bp (più di due metri) ed è organizzato in cromosomi, che si presentano a coppie di omologhi e il cui numero varia a seconda della specie (Figura 6). In ogni cellula somatica umana ci sono 46 cromosomi: 22 coppie di autosomi e 2 cromosomi sessuali (X e Y). Durante la riproduzione, i cromosomi vengono trasmessi tramite le cellule germinali al nuovo individuo; i cromatidi che compongono ciascuna coppia derivano uno dall'individuo maschile e l'altro dall'individuo femminile.

Di tutto il DNA, solo una piccola frazione (2-3%) risulta codificare per le proteine funzionali, mentre il restante 97-98% ha funzioni regolative e di controllo dell'espressione dei geni e in parte funzioni ancora poco chiare [33].

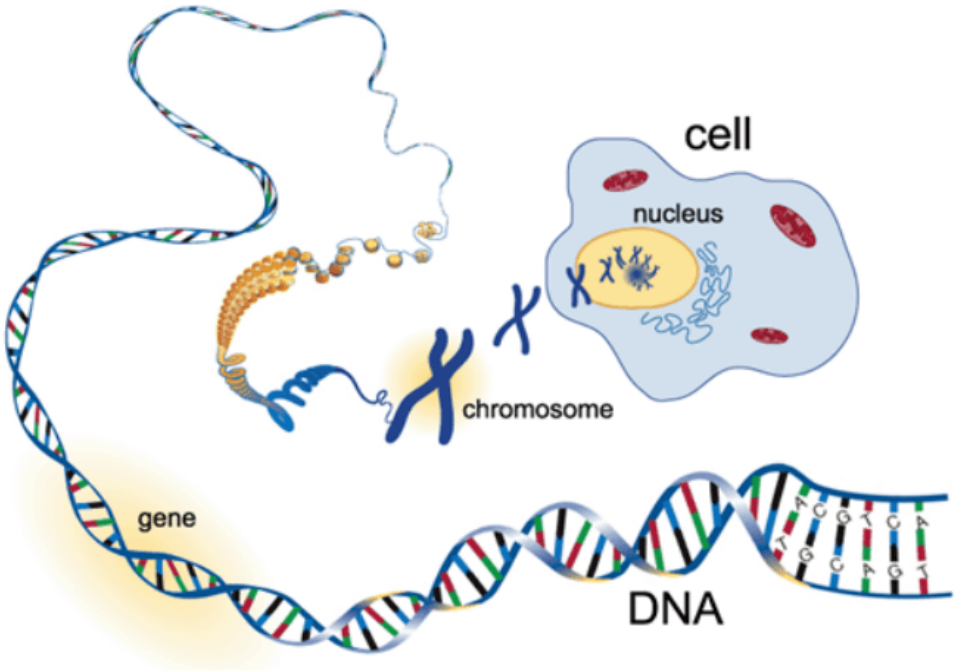


Figura 6. Struttura e organizzazione del DNA nella cellula eucariote.

Il DNA che codifica per proteine è costituito da sequenze nucleotidiche chiamate geni, presenti in singola copia nel genoma, mentre il DNA non codificante viene definito "ripetitivo". Quest'ultimo, viene comunemente diviso in due classi:

- DNA mediamente ripetitivo, costituito da sequenze nucleotidiche uguali tra loro e ripetute da alcune centinaia ad alcune migliaia di volte;
- DNA altamente ripetitivo (o DNA satellite), costituito da sequenze ripetute, organizzate in tandem.

Queste ripetizioni in tandem sono molto frequenti nei tratti di DNA intergenici e all'interno degli introni. Inoltre, presentano un elevato grado di

polimorfismo a causa della variazione del numero delle unità ripetitive in un determinato *locus*.

1.2.2 Variabilità genetica: mutazioni e polimorfismi

Le differenze tra un genoma umano e un altro sono il risultato della variabilità genetica, che avrà a sua volta effetto sul fenotipo degli individui.

La variabilità genetica è dovuta a due eventi che si verificano nel processo di divisione delle cellule germinali (meiosi): l'assortimento indipendente dei cromosomi e il *crossing-over*. Questi eventi fanno si che le cellule figlie originatesi contengano un patrimonio genetico aploide diverso tra loro. Un' altra importante fonte di variabilità genetica è la mutazione, definita come un qualsiasi cambiamento nella sequenza del DNA, e che ricopre un ampio spettro di eventi con differenti incidenze e meccanismi molecolari. Si parla, infatti, di mutazione sia quando il cambiamento riguarda un singolo nucleotide (sostituzioni, inserzioni e delezioni), sia quando si verificano piccole inserzioni e delezioni di poche basi, ma anche nel caso di inserzioni, delezioni, duplicazioni e inversioni di regioni del DNA lunghe alcune megabasi, di espansione o contrazione nel numero di elementi di DNA ripetuti in tandem, di inserzioni di elementi transponibili, di traslocazioni di segmenti cromosomici e qualsiasi tipo di anomalie nel numero dei cromosomi. Non

tutte le mutazioni vengono trasmesse da una generazione all'altra e contribuiscono al cambiamento evoluzionistico: solo le mutazioni che si verificano nella linea germinale (cellule che danno origine ai gameti, cellule uovo e spermatozoi) verranno ereditate dalle generazioni successive, mentre quelle che si verificano nelle cellule somatiche potranno avere conseguenze serie, ma non avranno ruolo in termini evoluzionistici; inoltre tali mutazioni per poter essere ereditate non devono essere letali o invalidare la fertilità dell'individuo [34]. Tuttavia, il problema emerge quando si parla di mutazioni, distinguendole dai polimorfismi. Il termine generico di mutazione è, infatti, spesso usato quando ci si riferisce a una variazione patogenica ed è quindi usata in contrasto con polimorfismo che descrive un cambiamento di sequenza nel gene che non ha alcun effetto o funzione. Inoltre mutazioni che causano malattie sono presenti, in alcune popolazioni, con frequenze superiori all'1% e perciò possono essere classificate come polimorfismi. Si parla infatti di polimorfismo quando nella popolazione esistono almeno due forme alleliche e l'allele più raro è presente con una frequenza uguale o superiore all'1% [35]. con il termine variante, invece, è chiamato un allele con frequenza al di sotto dell'1% [34]. Chiaramente, poichè le frequenze alleliche spesso variano tra le popolazioni, una variante per una popolazione potrebbe essere un polimorfismo per un'altra.

1.2.3 Polimorfismi a singolo nucleotide

La più semplice forma di variazione del DNA tra gli individui è la sostituzione, o la delezione, o l'inserzione di un singolo nucleotide con un altro (Figura 7). Questo tipo di cambiamento è chiamato " *single nucleotide polymorphism* " (SNP) ed è il polimorfismo più comune nel genoma [36]. La prerogativa affinché si possa parlare di SNP e non di mutazione è la sua frequenza e stabilità genetica. Si può parlare di SNP soltanto quando l'allele più raro ha una frequenza maggiore o uguale all'1% nella popolazione [35]. La stabilità genetica è garantita dal fatto che si stima che gli SNPs compaiano con una frequenza di circa uno su 1.000 paia di basi (bp) in tutto il genoma e oltre tre milioni di SNP sono stati tracciati finora [36]. Inoltre, bisogna tener presente che ogni SNP ha due alleli ("polimorfismi biallelici"), i quali possono essere uguali tra di loro (omozigoti) o diversi (eterozigoti).

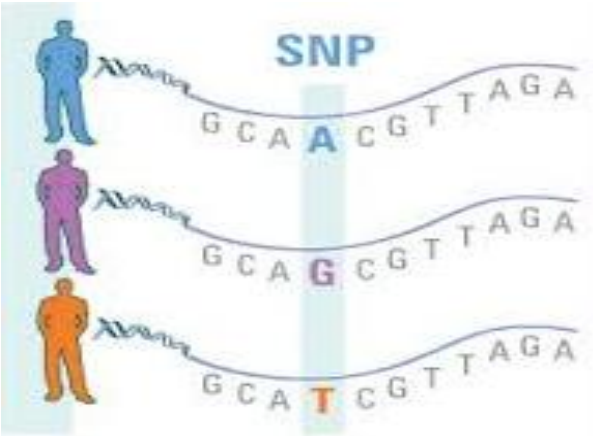


Figura 7. "*single nucleotide polymorphism*" (SNP) che determina cha variabilità genetica nella popolazione.

Esistono quattro tipi fondamentali di SNPs classificati in transizioni e transversioni. Quando una pirimidina (C o T) viene sostituita con una pirimidina o una purina (A o G) con una purina, la modificazione viene chiamata transizione; quando una purina viene sostituita con una pirimidina, o viceversa, si parla di trans versione (Figura 8).

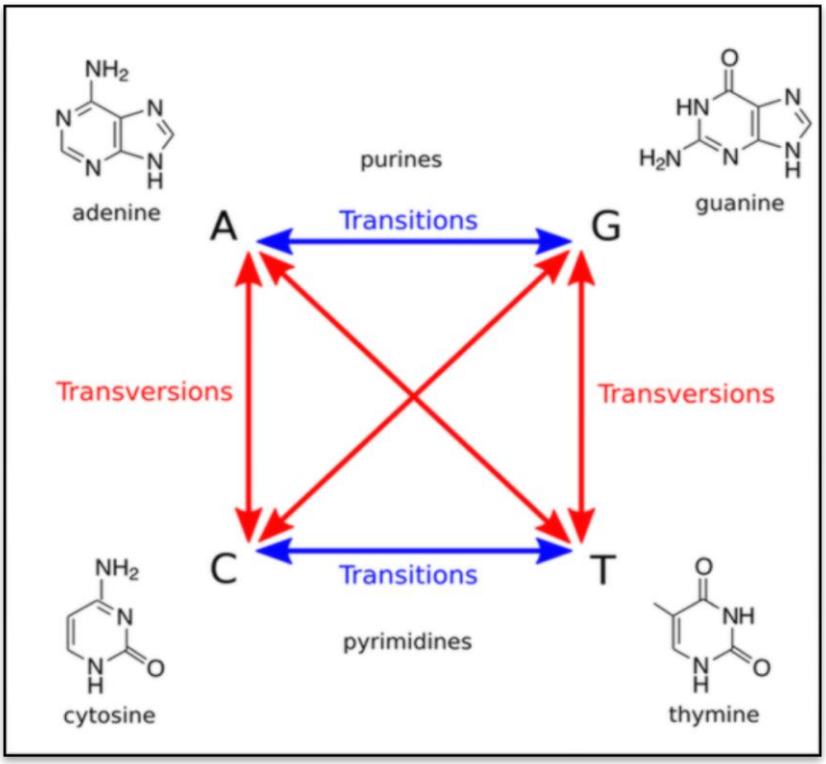


Figura 8. Schematizzazione delle transversioni e transizioni tra le basi azotate.

Ciò che si è notato è che per gli SNPs questi eventi non si verificano con la stessa frequenza: ben due terzi degli SNPs conosciuti fin'ora derivano da transizioni. Questo fatto è da attribuire probabilmente al fenomeno della deaminazione della 5-meticitosina, la mutazione più frequente nell'uomo

[37]. Questa base azotata metilata è frequentemente trasformata in timina per deaminazione ed è un fenomeno che si riscontra soprattutto nei di nucleotidi CpG, noti per essere degli *hotspot* per mutazioni puntiformi nel genoma umano [38]. Tuttavia, si ritiene che queste semplici variazioni siano stabili e non deleterie per gli organismi. A livello genomico, le mutazioni possono verificarsi in qualsiasi regione, sia all'interno di geni sia in regioni intergeniche, con diversi effetti sul fenotipo. Secondo un *report* pubblicato, il 50% degli SNP si verifica nelle regioni non codificanti, il 25% porta a mutazioni missenso e il restante 25% sono mutazioni silenti [36]. Sostituzioni all'interno di geni possono essere causa di malattie ed è quindi importante conoscere gli effetti di tali cambiamenti. Una sostituzione che non altera la codifica di un aminoacido è conosciuta come "silente" o sostituzione "sinonima", mentre una mutazione che provoca cambiamento di un aminoacido è detta "missenso". Un cambiamento di base che trasforma un codone per un aminoacido in un codone di stop è detta "non-senso". Inserzioni o delezioni di una singola base dentro la regione codificante del gene determinano lo slittamento della lettura del codice genetico (*frameshift*). Questo tipo di mutazione è uno dei più dannosi, in quanto la sequenza aminoacidica viene completamente alterata. Mutazioni al di fuori del gene possono influire sulla sua espressione alterando ad esempio il suo promotore

o gli *enhancers* o i segnali di poliadenilazione; mutazioni a livello degli introni possono modificare lo *splicing* dell'RNA [34].

Si è cercato anche di teorizzare il ciclo vitale di un SNP [37], individuando quattro fasi principali perché possa esistere:

1- Comparsa di un nuovo allele variabile attraverso una mutazione nucleotidica;
2- Sopravvivenza all'iniziale vantaggio di uno dei due alleli durante le prime generazioni;
3- Aumento sostanziale della frequenza, includendo la resistenza ai cambiamenti della popolazione;
4- Fissazione nella popolazione.

La durata della vita di uno SNP destinato a essere fissato da un nuovo allele e stimata 284 mila anni [34].

1.2.4 SNPs e applicazioni in genetica

I polimorfismi trovano applicazioni in svariati campi scientifici, infatti vengono utilizzati nello studio dei geni, soprattutto collegati alle malattie, nella farmaco genomica e genetica delle popolazioni. La biologia molecolare si interessa sempre di più verso lo studio di ogni forma di polimorfismo genetico. L'attenzione verso le variazioni del DNA da individuo a individuo

nasce grazie ad alcuni grandi progetti di ricerca. Primi tra tutti lo *Human Genome Project*, avviato sin dai primi anni ottanta, e il progetto parallelo portato avanti dalla *Celera Genomics* [39]. Tali progetti hanno portato al sequenziamento e ad una iniziale analisi dell'intero genoma umano [39] [41] con la conseguente scoperta di un gran numero di variazioni stabili di un solo nucleotide. Oggi, attraverso studi su malattie genetiche, si sta cercando di determinare con precisione quali sequenze genomiche, se alterate, possono provocare un effetto patogenetico e non solo: dagli studi di associazione genetica si è visto che un determinato fattore può incrementare il rischio che si verifichi una malattia, quindi gli individui malati presentano quel fattore con frequenza maggiore rispetto agli individui sani.

Capitolo secondo

TECNICHE DI ANALISI

2.1 Reazione a catena della polimerasi

La *Polymerase Chain Reaction* è una tecnica che consente di moltiplicare in maniera esponenziale *in vitro* la quantità di materiale genetico necessaria per le successive analisi. Perché la reazione avvenga occorre avere i quattro deossiribonucleotidi trifosfati, una DNA polimerasi e i due oligonucleotidi (*primers*) [52] che servono da innesco all'enzima per generare le copie del filamento di DNA stampo, e che devono essere progettati e sintetizzati sulla base della conoscenza, almeno parziale, della sequenza di DNA che si vuole amplificare. I due *primers*, infatti, si legano alle estremità del filamento che si vuole moltiplicare: uno si lega al filamento *forward* e l'altro al *reverse*, rivolgendo entrambi l'estremità 3'-OH verso l'interno del frammento.

La reazione a catena della polimerasi è un processo costituito da tre fasi che si ripetono ciclicamente (Figura 9):

- Denaturazione: i filamenti di DNA a doppia elica, sottoposti a riscaldamento, si separano in filamenti singoli;
- *Annealing*: i primers si legano alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati;

- *Allungamento*: la polimerasi catalizza l'allungamento dei *primers* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

In questo modo l'amplificazione del DNA *target* assume un andamento esponenziale, ad esempio con 10 cicli si otterranno 2^{10} copie di DNA.

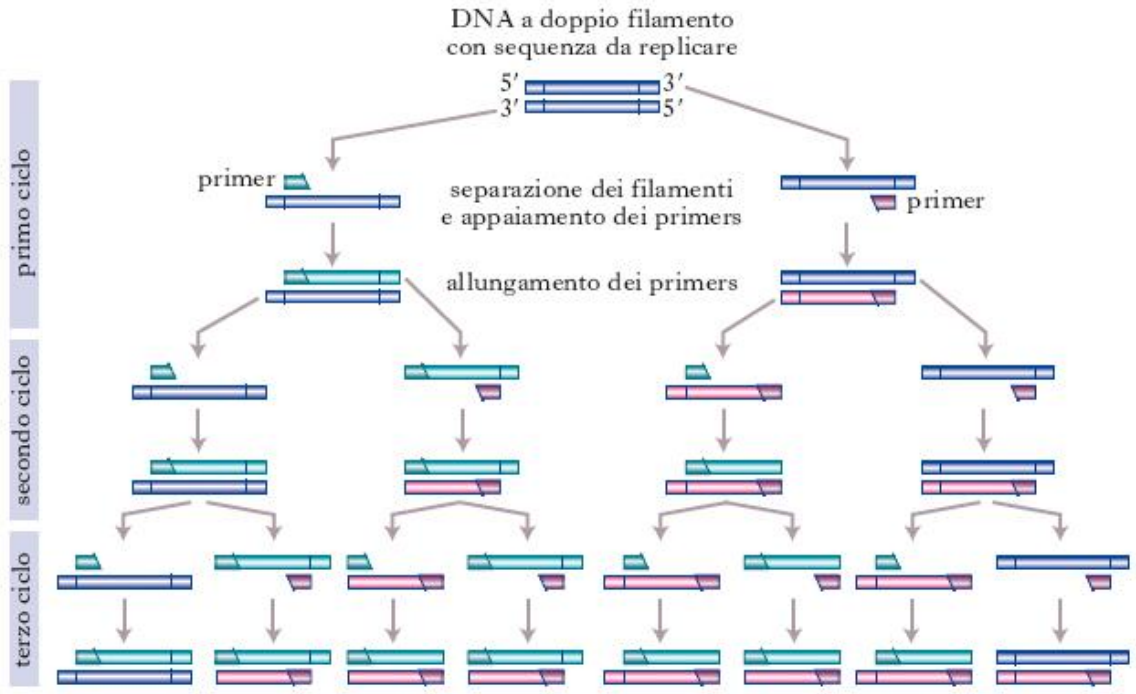


Figura 9. Rappresentazione schematizzata della reazione di amplificazione. All'aumentare dei cicli, aumenta l'amplificato in maniera esponenziale fino al consumo totale dei reagenti a disposizione.

Uno svantaggio della PCR è che la Taq polimerasi non ha l'attività di correzione di bozze, cioè manca dell'attività esonucleasica 3'-5', per cui, a

bassa frequenza, possono venire introdotti errori nelle copie di DNA. Il problema principale è posto da errori nell'incorporazione che vengono quantificati tramite tasso di errore nucleotide/ciclo, cioè la probabilità che ad ogni ciclo possa essere incorporato un nucleotide errato. Per quanto riguarda la Taq polimerasi tale tasso è di 1-20 x 10^{-5} [42].

L'enorme vantaggio di questa tecnica risiede anche nel fatto che si possono ottenere grandi quantità di DNA amplificato a partire da quantità molto piccole di DNA di partenza (picogrammi).

La PCR, inoltre, può essere effettuata anche in multiplex, cioè più sequenze possono essere amplificate contemporaneamente partendo da singole molecole di DNA.

2.1.1 Hot Start PCR

La tecnica della Hot Start PCR si avvale di una Taq polimerasi che richiede una "partenza a caldo". La HotStartTaq (Qiagen) usata in questo studio, è infatti un enzima ricombinante inattivo a temperatura ambiente. La sua attivazione avviene solo dopo un iniziale incubazione a 95°C per 15 minuti [44] [45]. Questa caratteristica consente di diminuire drasticamente la possibilità di formazione dei prodotti aspecifici di appaiamento dei *primers* lungo le sequenze target e i dimeri tra i *primers* stessi a bassa temperatura.

Inoltre, il buffer di amplificazione già pronto all'uso contenente KCl, $(NH_4)_2SO_4$ e Mg^{++}, garantisce le condizioni di stringenza adeguate. In particolare, l'aumento della concentrazione di Mg^{++} a un valore di 3 mM, si è dimostrato utile per aiutare l'*annealing* dei *primers* al DNA stampo e contemporaneamente stabilizzare l'attività della polimerasi [44].

2.2 Elettroforesi

Per ottenere la separazione fra le varie molecole presenti nella miscela di ampliconi prodotti dalla reazione di PCR, si sfrutta la proprietà del DNA di possedere una carica negativa sui gruppi fosfato dello scheletro di cui è costituito: in presenza di un campo elettrico gli ioni vengono attirati dal polo di carica opposta, quindi nel caso degli acidi nucleici, dal polo positivo. Il DNA presenta però una carica negativa per ogni unità nucleotidica, con una distribuzione uniforme di carica per unità di massa; la forza del campo elettrico esercitata su molecole di dimensioni differenti sarebbe quindi la stessa, per questo motivo per il processo di elettroforesi si usano setacci molecolari costituiti da matrici porose al fine di separare le molecole in base alla loro lunghezza [53]. Queste matrici sono costituite da gel o soluzioni polimeriche che consentono alle molecole corte di muoversi più rapidamente attraverso i pori, rallentando invece quelle di dimensioni maggiori. Poiché il

movimento di cariche attraverso un campo elettrico genera calore che porta a modificare la viscosità della matrice polimerica, alterando cosi la mobilità elettroforetica della molecola, l'elettroforesi deve essere condotta in un sistema in grado di dissiparlo. Per questo l'apparecchiatura è costituita essenzialmente da tre componenti principali: un alimentatore, che genera una differenza di potenziale, un mezzo di separazione, i cui pori devono essere di dimensioni idonee alle molecole da separare, e un termostato, che permette il controllo e la regolazione della temperatura (Figura 10). La conduzione uniforme e regolare della corrente attraverso il sistema elettroforetico è garantita da tamponi di corsa (soluzioni saline a bassa forza ionica), grazie al movimento dei propri ioni che migrano insieme a quelli del campione [34].

La velocità di migrazione dei frammenti è direttamente proporzionale alla carica dello ione e al campo elettrico applicato e inversamente proporzionale alle sue dimensioni e alla viscosità della matrice porosa usata come mezzo di separazione.

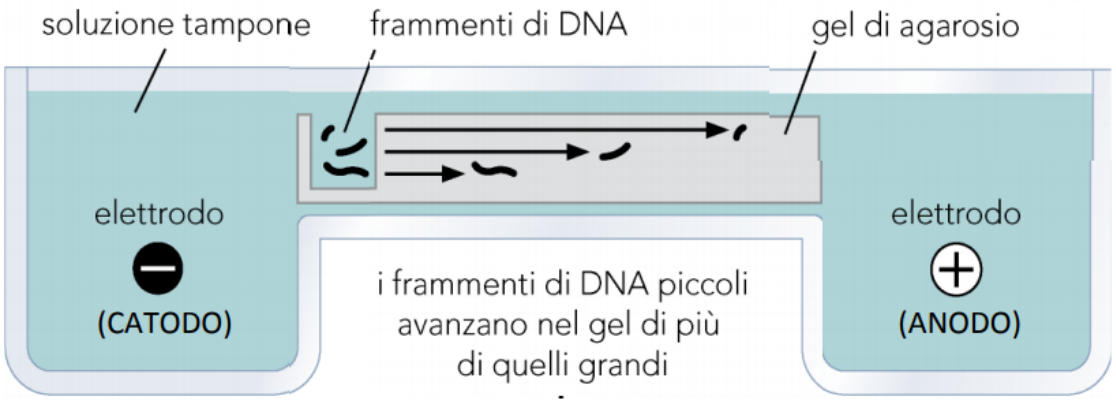


Figura 10. Struttura di una camera elettroforetica: i frammenti di DNA, di carica negativa, vengono attratti dal polo opposto e migrano ad una velocità inversamente proporzionale alla loro lunghezza e dimensione.

2.2.1 Elettroforesi su gel di agarosio

Questa tecnica di elettroforesi si sviluppa su un gel di agarosio al 2%. Come suddetto, il gel funge da setaccio, essendo costituito da una rete di pori, i quali consentono di separare le molecole in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi, quindi si avrà una separazione in funzione della velocità. L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici. E' uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda, formando una matrice attraverso dei legami a idrogeno tra le catene lineari [54] [55] [56]. L'agarosio è normalmente utilizzato per la separazione di frammenti di acidi nucleici aventi dimensioni tipicamente comprese tra 500 bp a 20 kb circa. Per consentire la visualizzazione degli acidi nucleici migrati si possono utilizzare diversi tipi di coloranti; quello più usato in assoluto è l'etidio bromuro (Figura 11) [57]. Questa molecola planare si intercala tra le basi dell'acido nucleico a doppio filamento, ed emette luce fluorescente quando irradiata con luce

ultravioletta (300 nm). L'etidio bromuro può essere aggiunto direttamente al gel (la velocità di migrazione si riduce del 10-15 %), al campione, o, alternativamente, dopo l'elettroforesi.

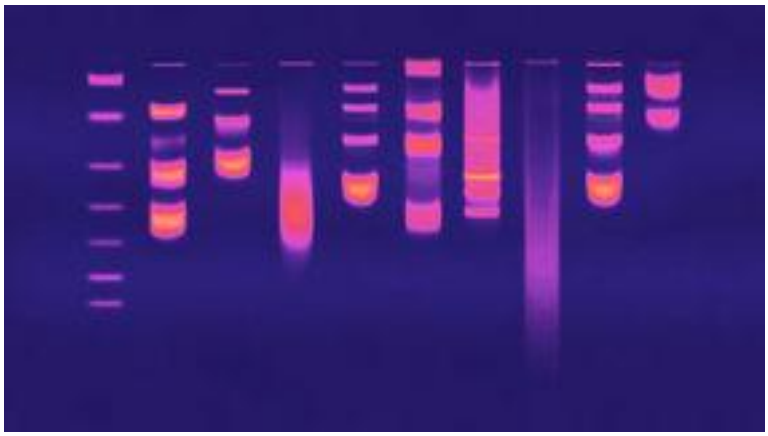


Figura 11. Tracciato elettroforetico con etidio bromuro visualizzato attraverso la luce ultravioletta.

2.2.2 TapeStation

Questa tecnica permette di separare i frammenti di DNA precedentemente amplificati su un sistema di elettroforesi automatizzata e ne calcola la quantità. È richiesta una preparazione del DNA molto ridotta e il sistema separa e analizza ciascun campione in tempi di analisi di 1-2 minuti. La corsa elettroforetica avviene su di una ScreenTape (Figura 12) costituita da una camera tampone situata nella parte superiore del canale che contiene tamponi ottimizzati per la separazione efficace di frammenti di acidi nucleici o proteine e dagli elettrodi integrati che applicano una corrente elettrica alle

estremità del dispositivo ScreenTape, eliminando la necessità di ulteriori apparecchiature per elettroforesi [51].

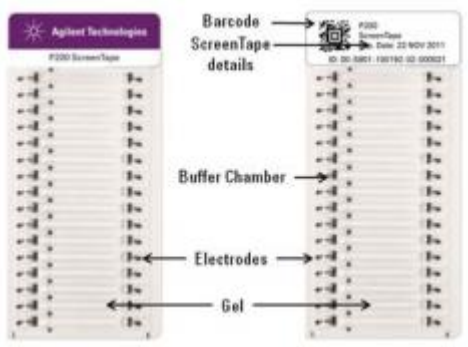


Figura 12. Dispositivo ScreenTape P200.

I risultati delle corse vengono mostrati sotto forma di un grafico e di un'immagine del gel di agarosio in alta risoluzione (Figura 13).

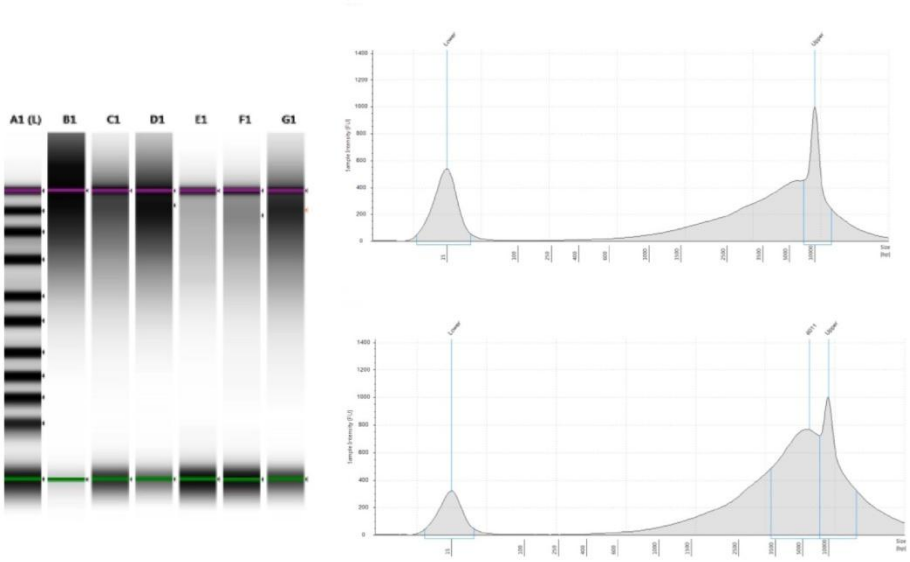


Figura 13. Gel in agarosio ad alta risoluzione e grafico relativo alla corsa elettroforetica dei campioni nella TapeStation.

2.2.3 Elettroforesi capillare

La tecnica prevede la separazione di frammenti di DNA (di carica negativa) in base alle loro dimensioni, grazie all'applicazione di un campo elettrico tra Anodo e Catodo, che li farà migrare verso il polo positivo del sistema (Figura 14). Tutto ciò si verifica all'interno di un capillare rivestito con un polimero che conferisce la corretta flessibilità.

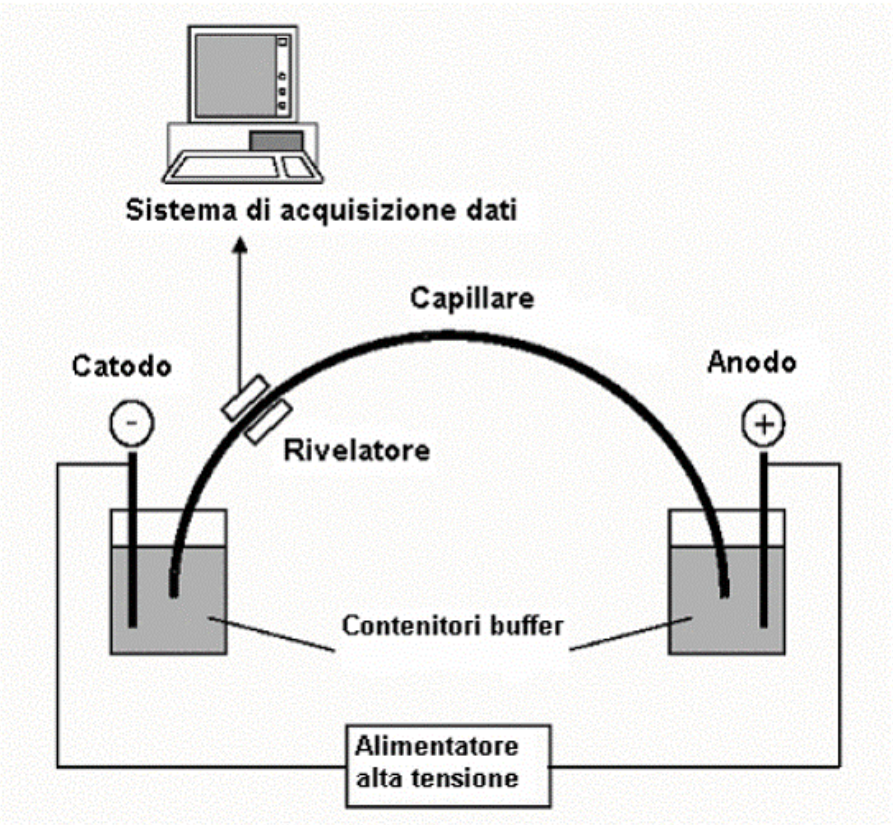


Figura 14. Schematizzazione delle componenti dell'elettroforesi capillare.

La migrazione dei frammenti è seguita rilevando le emissioni in fluorescenza a differenti lunghezze d'onda dei diversi fluorocromi dopo l'eccitazione

provocata da un laser. Le emissioni vengono raccolte ed analizzate da una camera CCD (*charge coupled device*), che elabora i diversi segnali di fluorescenza con elevata sensibilità. La sequenza delle bande di DNA marcato dai quattro fluorocromi viene visualizzata in un grafico denominato elettroferogramma, caratterizzato da una successione di picchi di quattro colori diversi, che corrispondono alle emissioni fluorescenti dei diversi fluorocromi (Figura 15), man mano che i vari frammenti di diversa lunghezza nucleotidica raggiungono, durante la corsa elettroforetica, la posizione del rilevatore (*detector*) [58].

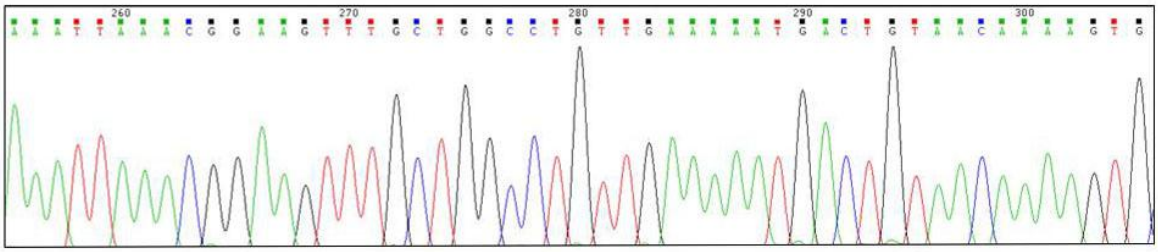


Figura 15. Elettroferogramma di un frammento nucleotidico sequenziato.

In rosso sono riportate le timine, in nero le guanine, in verde le adenine ed in blu le citosine.

2.3 Il sequenziamento del DNA

La determinazione della sequenza nucleotidica del DNA e lo strumento di eccellenza per l'individuazione e caratterizzazione di mutazioni. I metodi per la determinazione della sequenza del DNA sono stati sviluppati alla fine degli

anni ‘70 e hanno rivoluzionato la scienza della genetica molecolare. I due metodi di sequenziamento del DNA descritti nel 1977 si differenziano considerevolmente nel principio: il metodo enzimatico di Sanger o terminazione della catena con dideossinucleotidi coinvolge la sintesi di un filamento di DNA da uno stampo a singolo filamento da parte di una DNA polimerasi; il metodo di Maxam e Gilbert, implica la degradazione chimica del DNA originale [46]. Entrambi i metodi producono popolazioni di frammenti nucleotidici marcati radioattivamente che iniziano in un punto fisso e terminano in punti che dipendono dalla collocazione di una particolare base nel filamento di DNA originale. Tali frammenti possono poi essere separati tramite elettroforesi su gel di poliacrilamide e la sequenza nucleotidica può essere ricostruita direttamente da un’autoradiografia del gel. Sebbene entrambe le tecniche siano usate ancora oggi, il metodo di Sanger costituisce la tecnica d’elezione (*gold standard*) per la determinazione di sequenze nucleotidiche [47] [60]. Questo processo è stato semplificato grazie ai continui progressi tecnologici: la reazione e stata ciclicizzata mediante la PCR e moderne e innovative strumentazioni di elettroforesi capillare congiunte all’impiego di fluorocromi e a softwares computerizzati, hanno reso automatizzabile l’interpretazione del dato [46]. Negli ultimi anni, la necessità di sequenziare genomi di grandi dimensioni a costi e tempi ridotti, ha

innescato lo sviluppo di nuove tecniche di sequenziamento automatizzato in grado di soddisfare queste richieste [46]. Per sequenziamento genetico di nuova generazione (*Next generation sequencing*, NGS) si intende, pertanto, l'insieme delle tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici che hanno in comune la capacità di sequenziare, in parallelo, milioni di frammenti di DNA. Queste tecnologie hanno segnato una svolta rivoluzionaria nella possibilità di caratterizzare genomi di grandi dimensioni rispetto al metodo di sequenziamento del DNA di prima generazione (sequenziamento Sanger), grazie alla potenzialità di produrre, in un'unica seduta di analisi, una quantità di informazioni genetiche milioni di volte più grande [46].

2.3.1 Sequenziamento di Sanger

Il sequenziamento di Sanger è un metodo enzimatico che si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati per interrompere la reazione di sintesi in posizioni specifiche. I nucleotidi dideossitrifosfato (ddNTPs) sono molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, ma si differenziano per l'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2' e 3' della molecola (Figura 16).

A causa della loro struttura, impediscono che il nucleotide successivo si leghi ad essi, in quanto non possono formare legami fosfodiesterici, terminando la reazione di sintesi.

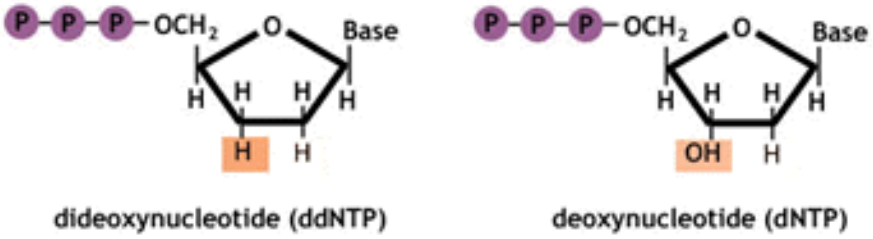


Figura 16. Struttura molecolare dei dNTPs e dei ddNTPs.

I nucleotidi modificati (ddNTPs) o il *primer* devono essere marcati (radioattivamente o per fluorescenza) in modo da poter visualizzare le bande dei frammenti di DNA neosintetizzato con l'elettroforesi.

Il campione di DNA da sequenziare viene distribuito in quattro reazioni separate, ognuna delle quali contiene la DNA polimerasi e tutti e quattro i deossinucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ad ognuna di queste reazioni viene poi aggiunto solo uno dei quattro nucleotidi dideossi (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) in quantità stechiometricamente inferiore per permettere una allungamento del filamento sufficiente per l'analisi. Questo dà origine ad una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa interrotti in corrispondenza dell'incorporazione del dideossinucleotide, che avviene casualmente quando esso è utilizzato dalla polimerasi in luogo di un nucleotide deossitrifosfato [59]. Attualmente è possibile confluire le quattro reazioni distinte in una sola utilizzando i quattro ddNTPs marcati con molecole fluorescenti in modo diverso tra loro (Figura 17).

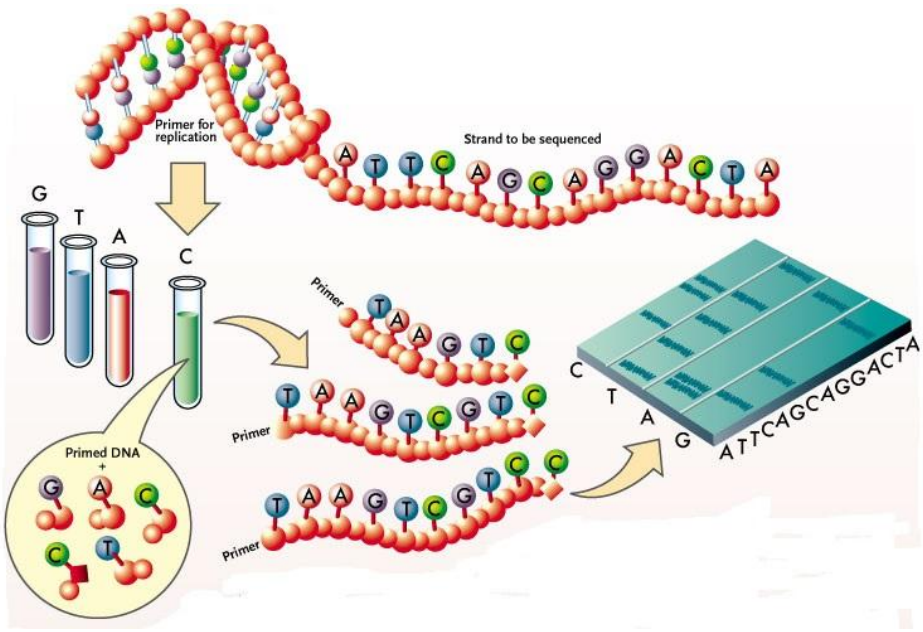


Figura 17. Raffigurazione schematica delle fasi del sequenziamento di Sanger a partire dal *template* a singolo filamento.

I BigDye® Terminator sono strutturalmente costituiti da una fluoresceina donatrice (generalmente la 6-carbossifluoresceina detta anche 6-FAM) che si lega attraverso un *linker* a una diclorodamina (dRodamina) accettrice. La fluoresceina all'interno dello strumento assorbe energia di eccitazione del raggio laser e la trasferisce attraverso il *linker* a una delle quattro dRodamine accettrici. Queste ultime, una volta eccitate, emettono luce a diversa lunghezza d'onda dando origine a quattro diverse colorazioni, ognuna caratteristica di una specifica base: adenina in verde, guanina in nero, timina in rosso e citosina in blu (Figura 17) [61].

Capitolo terzo

SCOPO DELLA TESI

Questo studio ha l'obiettivo di valutare l'eventuale presenza di fattori che proteggano o favoriscano le convulsioni post-traumatiche, attraverso lo studio dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) espressi da alcuni geni coinvolti nell'equilibrio neuronale: IL-1β, GAD1, SLC1A1, A1AR.

I trasportatori di glutammato (SLC1A1) gestiscono i livelli di glutammato e la neurotrasmissione eccitatoria, e sono stati associati sia all'epilessia che al trauma cranico. Lo studio vuole indagare se la variazione nel gene SLC1A1 sia associata ad epilettogenesi accelerata e all'aumento del rischio di PTE dopo TBI.

Inoltre, dato il ruolo dell'adenosina e A1AR, l'obiettivo di questa tesi è di determinare se la variabilità all'interno del gene A1AR e della regione fiancheggiante è associata allo sviluppo di PTE in una popolazione con trauma cranico. Analoghe indagini sono state effettuate anche sui geni IL-1β e GAD1 per confermare o escludere l'associazione con PTE.

Capitolo quarto

MATERIALI E METODI

Il programma di ricerca è strutturato in molteplici fasi analitiche che vengono di seguito elencate:

1. Raccolta dei campioni
2. Disegno dei *primers*
3. Estrazione del DNA
4. Amplificazione degli SNPs in singolo
5. Quantificazione dei prodotti dell'amplificazione
6. Purificazione del DNA amplificato
7. Reazione di sequenza
8. Rimozione dei ddNTP non incorporati
9. Elettroforesi capillare
10. Analisi delle sequenze

4.1 Raccolta dei campioni

Lo studio è di tipo longitudinale di coorte retrospettivo basato sull'arruolamento di soggetti che hanno subito un trauma cranico e che hanno successivamente manifestato delle crisi epilettiche. Nello specifico, sono stati inizialmente valutati campioni prelevati *post-mortem* e successivamente si provvederà alla prosecuzione dello studio su soggetti in vita. Nell'analisi

genetica vengono arruolati anche individui sani, che non hanno mai manifestato crisi epilettiche, da utilizzare come popolazione di controllo.

Criteri di inclusione:

- Soggetti caucasici
- Età compresa tra i 18 e i 70 anni
- Tomografia computerizzata (CT) positiva per TBI
- Anamnesi negativa per attacchi precedenti al TBI
- Anamnesi negativa per familiari con epilessia

Popolazione di controllo:

- Soggetti caucasici
- Età compresa tra i 18 e i 70 anni
- Anamnesi negativa per pregresso trauma cranico
- Anamnesi negativa per pregressi attacchi epilettici
- Anamnesi negativa per familiari con epilessia

Criteri di esclusione:

- Soggetti minori di 18 anni
- Anamnesi positiva per pregresso trauma cranico maggiore
- Anamnesi positiva per pregressi episodi di epilessia
- Anamnesi positiva per familiari con epilessia

Le analisi genetiche sono state eseguite su tamponi buccali per quanto riguarda i soggetti sani, e su campioni di sangue per quanto riguarda i soggetti affetti da PTE prelevati ai singoli pazienti e conservati in provette Falcon™ da 15ml. Tutti i campioni raccolti sono stati conservati in cella refrigerata a -20°C.

4.1.1 Informazione al paziente e consenso informato

Prima di eseguire ogni procedura prevista dallo studio clinico, tutti i soggetti saranno provvisti di un consenso informato e riceveranno informazioni complete sul protocollo di studio, prima di esprimere il proprio consenso. Inoltre verrà fornita un informativa che rilascerà informazioni complete e adeguate relative ad obiettivi e procedure. La ricerca verrà condotta in accordo con i principi etici fondati sulla Dichiarazione di Helsinki (64th WMA General Assempbly, Fortaleza, Brazil, October 2013, nella International Conference on Harmonisation for Good Clinical Practice, ICH-GCP) e in base alle norative regolatorie nazionali applicabili.

4.2 Disegno dei Primers

Una volta acquisite per via informatica (*www.ncbi.nlm.nih.gov*) le sequenze corrispondenti agli SNPs da studiare, ci si è occupati di disegnare le sequenze oligonucleotidiche di innesco per la reazione di amplificazione (PCR). Innanzitutto si è andati a controllare sul sito *www.thermofisher.com* eventuali coppie di *primers* già pronte, ma la localizzazione intronica della maggior parte dei polimorfismi ha fatto si che ci fossero *primers* idonei soltanto per il polimorfismo rs1143634 relativo al gene IL-1β, con localizzazione esonica. Per gli altri SNPs di questo studio è stato utilizzato il *software Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih. gov/primer-blast)*. Di ogni regione, sono state inserite nel programma sequenze di 300-400 bp per dar modo all'elaboratore di ricercare più possibilità di oligonucleotidi accoppiati. Il programma consente di immettere una sequenza alla volta e successivamente scegliere le coppie di *primers* con i parametri impostati nella sezione *"Primer Parameters"*.

Le caratteristiche su cui si è cercato di porre attenzione sono le seguenti:

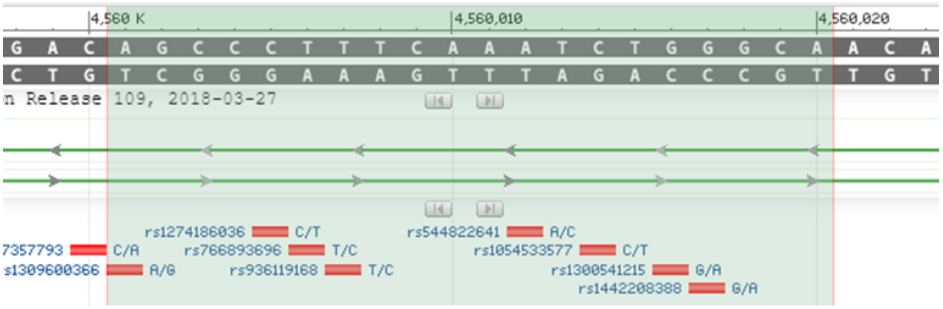
- Lunghezza ottimale di 20-30 nucleotidi;
- Quantità di nucleotidi CG (tra 20% e 80% di default);
- Evitare sequenze ripetitive di regioni contenenti *stretches* dello stesso nucleotide per limitare il fenomeno dello *slipping* del *primer* sul DNA stampo;

- Evitare code di tre o più G o C in 3' che possono portare ad un appaiamento scorretto su regioni ricche in GC (come le "isole CpG")
- Evitare la formazione di strutture secondarie che portino ad appaiamenti interni al *primer* o appaiamenti con altri *primers*, specialmente in 3', portando alla formazione di dimeri;
- Range di Temperatura di Melting tra 58.0°C e 64.0°C, con massimo di differenza di 3.0°C per coppia di *primers*.

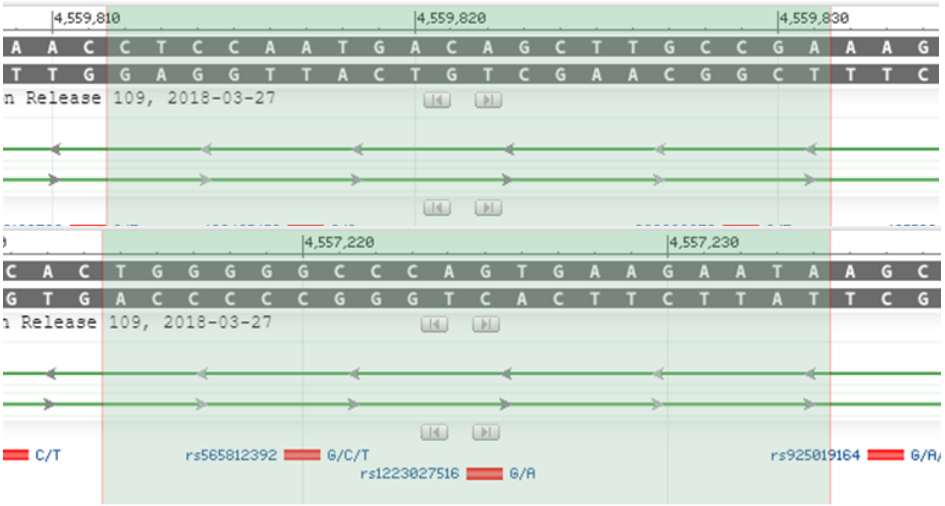
Tutti questi parametri sono stati testati dal *software* che automaticamente scarta le combinazioni di *primers* non idonee e genera le più stabili.

Per il polimorfismo rs3828275, relativo al gene GAD1, i *primers* sono stati disegnati mediante il *software Primer3Plus*, che permette di selezionare la regione di interesse (in questo caso la base di interesse) da includere tra la coppia di oligonucleotidi, perché il *software Prime-BLAST* non forniva risultati specifici per la sequenza immessa. Successivamente, le coppie di *primers* scelte sono state ispezionate tramite il *database NCBI-dbSNP*, per verificare che non ci fossero SNPs con frequenza significativa per la popolazione europea nelle regioni di appaiamento. Questo ulteriore controllo è stato utile in quanto la presenza di polimorfismi con frequenza elevata nella popolazione in quelle regioni porterebbe a possibili errori di

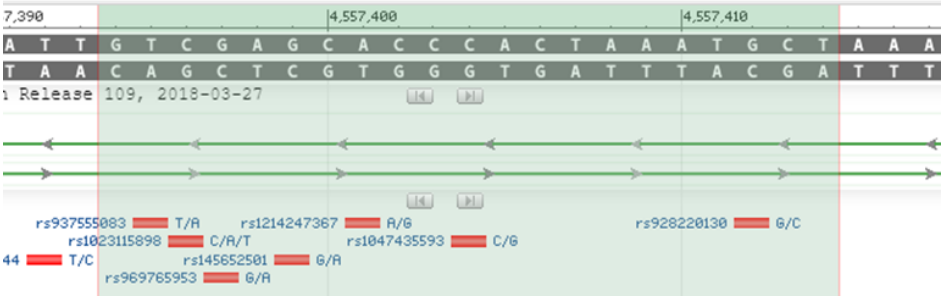
appaiamento tra *target* e *primers*, riducendo la specificità della reazione (Figura 18, a-g). Nessun *primer* presenta polimorfismi significativi.

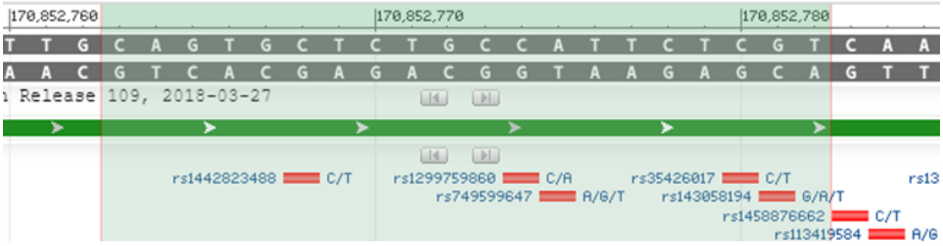


a) rs7858819: sequenza del *primer* Forward in alto e del *primer* Reverse in basso

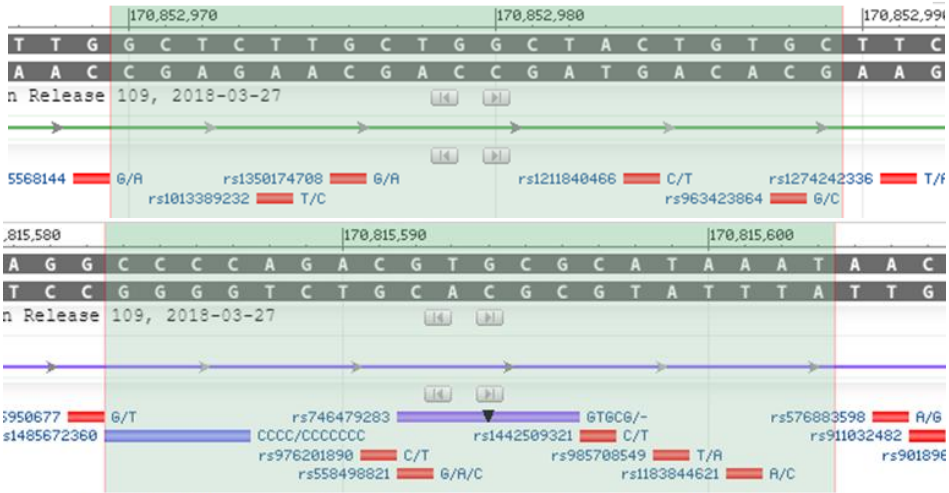


b) rs10974620: sequenza del *primer* Forward in alto e del *primer* Reverse in basso

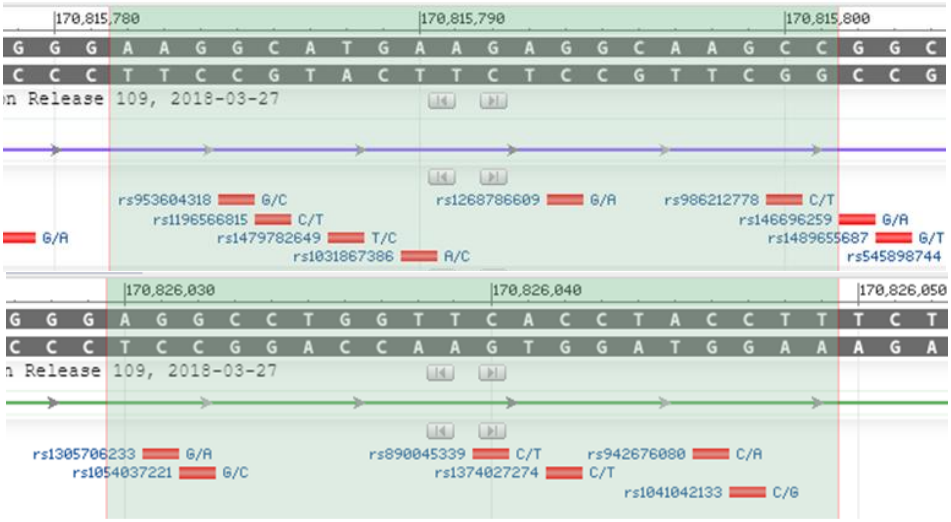




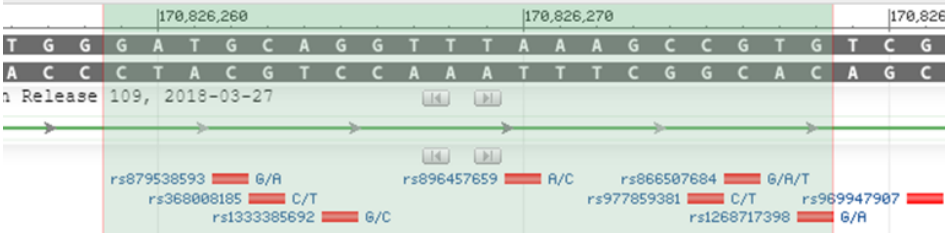
c) rs769391: sequenza del *primer* Forward in alto e del *primer* Reverse in basso



d) rs3791878: sequenza del *primer* Forward in alto e del *primer* Reverse in basso



e) rs3828275: sequenza del *primer* Forward in alto e del *primer* Reverse in basso



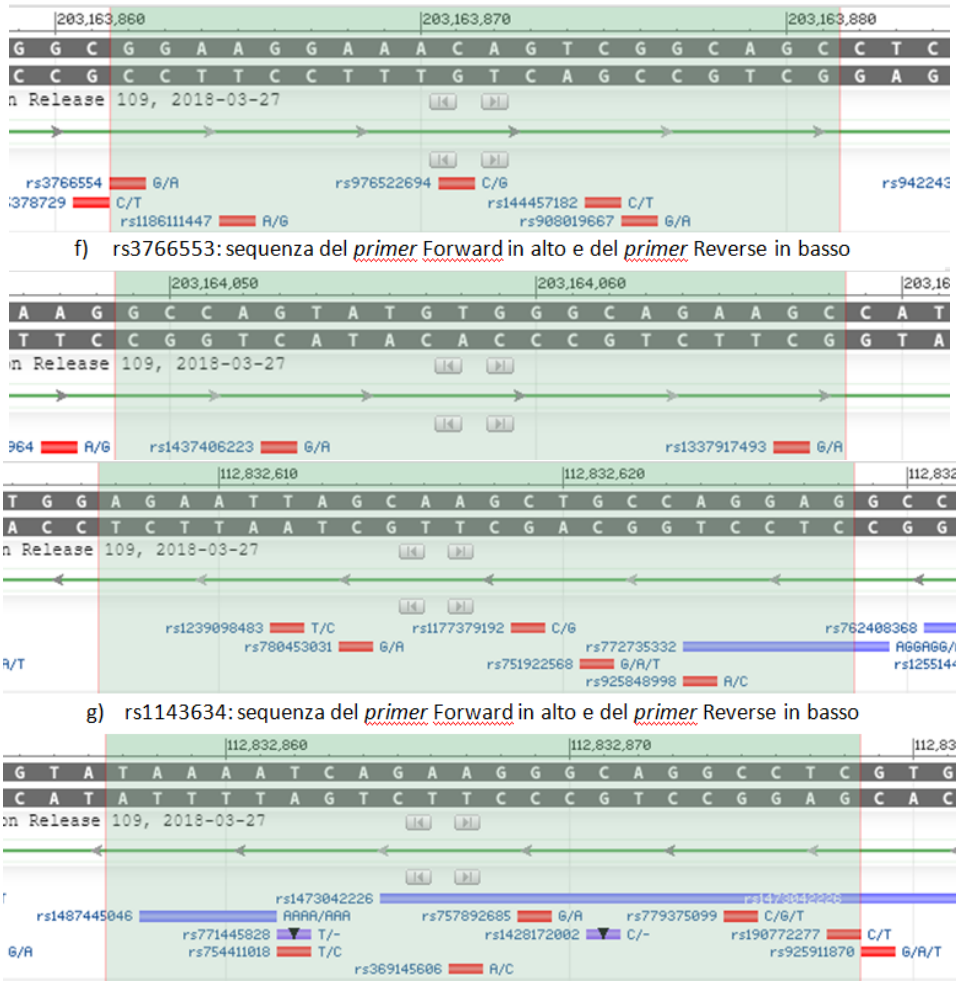


Figura 18. SNPs presenti nelle sequenze dei *primers* (5'->3') scelti per ciascun polimorfismo.

Le varie coppie di *primers* così disegnate, sono state poi trasmesse alla ditta Invitrogen o Qiagen i cui laboratori ne hanno permesso la biosintesi (Tabella 1e 2).

Gene	polimorf. (a)	GenBank/ dbSNP accession	Localizzazione cromosomica (GRCh38.p12)	Localizzazione genica	Primer Forward (5'->3')	Lungh. primer	T Melting Forward	Lungh. amplicone (bp)
SLC1A1	C>T	rs7858819	chr9: 4559892	var. intronica	CTCCAATGACAGCTTGCCGA	20	60.67°C	209
SLC1A1	C>G,T	rs10974620	chr9: 4557296	var. intronica	TGGGGGCCCAGTGAAGAATA	20	60.55°C	200
GAD1	A>G	rs769391	chr2: 170852920	var. intronica	CAGTGCTCTGCCATTCTCGT	20	60.39°C	227
GAD1	G>T	rs3791878	chr2: 170815681	var. intronica	CCCCAGACGTGCGCATAAAT	20	61.1°C	218
GAD1	C>T	rs3828275	chr2: 170826230	var. intronica	AGGCCTGGTTCACCTACCTT	20	60.48°C	249
ADORA1	A>G	rs3766553	chr1: 203163914	var. intronica	GGAAGGAAACAGTCGGCAGC	20	61.58°C	207
IL-1β	G>A	rs1143634	chr2: 112832813	var. esonica	AGAATTAGCAAGCTGCCAGGAG	22	60.68°C	272

Tabella 1. Caratteristiche principali dei 7 SNPs investigati e dei rispettivi *primers Forward* (5'->3'). (a) Allele ancestrale e allele mutato di ogni polimorfismo.

Gene	polimorf. (a)	GenBank/ dbSNP accession	Localizzazione cromosomica (GRCh38.p12)	Localizzazione genica	Primer Reverse (5'->3')	Lungh. primer	T Melting Reverse	Lungh. amplicone (bp)
SLC1A1	C>T	rs7858819	chr9: 4559892	var. intronica	TGCCCAGATTTGAAAGGGCT	20	59.89°C	209
SLC1A1	C>G,T	rs10974620	chr9: 4557296	var. intronica	AGCATTTAGTGGGTGCTCGAC	21	60.68°C	200
GAD1	A>G	rs769391	chr2: 170852920	var. intronica	GCACAGTAGCCAGCAAGAGC	20	61.64°C	227
GAD1	G>T	rs3791878	chr2: 170815681	var. intronica	GGCTTGCCTCTTCATGCCTT	20	60.97°C	218
GAD1	C>T	rs3828275	chr2: 170826230	var. intronica	CACGGCTTTAAACCTGCATC	20	57.74°C	249
ADORA1	A>G	rs3766553	chr1: 203163914	var. intronica	GCTTCTGCCCACATACTGGC	20	61.38°C	207
IL-1β	G>A	rs1143634	chr2: 112832813	var. esonica	GAGGCCTGCCCTTCTGATTTTA	22	60.36°C	272

Tabella 2. Caratteristiche principali dei 7 SNPs investigati e dei rispettivi *primers Reverse* (5'->3'). (a) Allele ancestrale e allele mutato di ogni polimorfismo.

4.3 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dai tamponi buccali mediante il DNA IQ™ Reference Sample Kit for Maxwell® 16 (Promega) [63]. Lo strumento Maxwell® 16 viene fornito con procedure automatizzate di estrazione e purificazione programmate, mediante l'uso di cartucce *ready to use*. Il DNA IQ™

Reference Sample Kit for Maxwell® 16 (Promega) utilizza la resina DNA IQ ™ per purificare i campioni, fornendo una concentrazione di DNA costante e un'affidabile analisi genetica. In Figura 19, sono riportati i reagenti dispensati nelle cartucce in ordine di utilizzo dallo strumento [64].

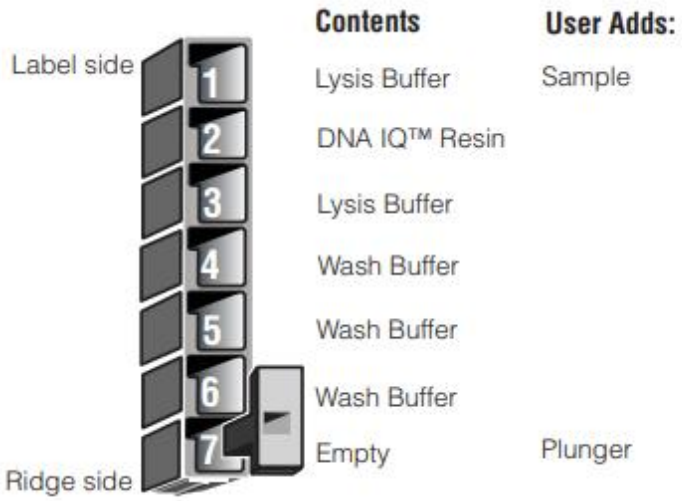


Figura 19. Cartuccia pronta all'uso per DNA IQ™ Reference Sample Kit for Maxwell 16.

Il protocollo utilizzato è quello fornito dalla ditta produttrice qui riportato:

1- Mettere una metà di un tampone buccale di cotone in un *Microtube* ClickFit e aggiungere al campione 500 µl totali di Lysis Buffer (495 µl) e DTT (5 µl). Incubare nel thermomixer a 70 ° C per 30 minuti.

2- Dopo l'incubazione a 70 ° C, agitare brevemente il *Microtube* ClickFit per recuperare il liquido evaporato ai lati della provetta.

3- Trasferire il campione nello *spin basket* di raccolta e chiudere il coperchio del *Microtube* ClickFit.

4- Centrifugare a temperatura ambiente per 2 minuti alla massima velocità per far asciugare il tampone. Rimuovere lo *spin basket*.

5- Inserire il numero corretto di cartucce da utilizzare nel *rack* di preparazione. Tenere saldamente la cartuccia e rimuovere la guarnizione.

6- Mettere un *plunger* nel pozzetto 7 di ciascuna cartuccia.

7- Trasferire il campione lisato nel pozzetto 1.

8- Accendere il Maxwell® 16 e caricare le cartucce nell'apposito alloggio con il corretto orientamento.

9- Posizionare gli *eluition tubes* nello strumento dopo aver dispensato 300 µl di *Eluition Buffer* in ognuno di essi (Figura 20). Avviare la corsa.

10- Rimuovere gli *eluition tubes* dagli alloggi ed inserirli nel *Magnetic Elution Tube Rack*. Lasciare eventuali residui di DNA IQ ™ resina sul fondo magnetizzato della provetta di eluizione. La quantità di resina varierà con la dimensione e la composizione di ciascun campione.

11- Trasferire gli eluiti in provette di stoccaggio e conservare a +4°C o proseguire con l'amplificazione.

Figura 20. Caricamento Maxwell 16.

4.4 Amplificazione degli SNPs in singolo

Il primo step di PCR ha previsto la realizzazione di amplificazione dei frammenti presi singolarmente, con i *primers* precedentemente disegnati.

I *primers* liofilizzati, con concentrazioni iniziali diverse, sono stati tutti risospesi in TE *Buffer* (pH 8) fino a 100 μM (Tabella 3). Per determinare la quantità di TE *Buffer* da aggiungere alle soluzioni madri, sono stati eseguiti i seguenti calcoli per ciascun *primer*:

Esempio:

rs7858819_F: 28,2 nM

28,2 nM x 1 μM / 100 μM = 0,0282 μM

0,0282 μM / 100 μM/l = 0,000282 l

0,000282 l x 1000 m/l = 0,282 ml o 282 μl

Successivamente, ogni singolo *primer* è stato diluito in TE *Buffer* (pH 8) in rapporto 1:50, ottenendo delle aliquote con concentrazione 2 µM in 100 µl, ideale per la reazione di PCR, utilizzando la Taq polimerasi.

Gene	Nome SNP e descrizione primer	Sequenza primer	Conc. nM	TE aggiunto (µl)
SLC1A1	rs7858819_F	CTCCAATGACAGCTTGCCGA	28,2	282
	rs7858819_R	TGCCCAGATTTGAAAGGGCT	21,1	211
SLC1A1	rs10974620_F	AGCATTTAGTGGGTGCTCGAC	25,3	253
	rs10974620_R	TGGGGGCCCAGTGAAGAATA	23,7	237
GAD1	rs769391_F	CAGTGCTCTGCCATTCTCGT	24,7	247
	rs769391_R	GCACAGTAGCCAGCAAGAGC	22,9	229
GAD1	rs3791878_F	CCCCAGACGTGCGCATAAAT	26,5	265
	rs3791878_R	GGCTTGCCTCTTCATGCCTT	35,0	350
GAD1	rs3828275_F	AGGCCTGGTTCACCTACCTT	32,4	324
	rs3828275_R	CACGGCTTTAAACCTGCATC	29,5	295
ADORA1	rs3766553_F	GGAAGGAAACAGTCGGCAGC	26,2	262
	rs3766553_R	GCTTCTGCCCACATACTGGC	30,2	302
IL-1β	rs1143634_F	AGAATTAGCAAGCTGCCAGGAG	28,6	286
	rs1143634_R	GAGGCCTGCCCTTCTGATTTTA	27,3	273

Tabella 3. Rappresentazione delle concentrazioni nM dei primers e la rispettiva quantità di TE *Buffer* (pH 8) aggiunto per la diluizione fino a100 µM.

In questo caso è stato utilizzato il QIAGEN® Multiplex PCR Kit. È stata allestista una *reaction* mix (Tabella 4) che contiene tutti i componenti richiesti per una PCR. Dal momento che le amplificazioni dei frammenti singoli servivano a verificare la corretta lunghezza degli ampliconi, sono stati utilizzati 3 µl di DNA (Tabella 4).

Reaction mix	Volume
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix Primer Forward (0,2 μM) Primer Reverse (0,2 μM) DNA	5 μl 1 μl 1 μl 3 μl
Volume Totale	10 μl

Tabella 4. Reazione di amplificazione SNP in singolo.

Le condizioni di amplificazione non sono state modificate dal protocollo standard (Tabella 5).

PCR				
95°C per 15 min (attivazione HotStarTaq DNA Polymerase)	30 cicli			
	Denaturazione	*Annealing*	Allungamento	60°C per 30 min
	94°C per 30 sec	60°C per 90 sec	72°C per 1 min	

Tabella 5. Condizioni di amplificazione SNPs in singolo.

4.5 Quantificazione dei prodotti dell'amplificazione

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

Per questa verifica è stata utilizzata la Agilent 2200 TapeStation nucleic acids system. La procedura standard prevede l'allestimento di una provetta da 0,2 ml per ogni campione, avendo l'accortezza di aggiungerne una per il *Genomic DNA Ladder*. Il *Ladder* è una miscela di DNA con peso molecolare noto, che viene inserito nelle corse elettroforetiche per permettere all'operatore di risalire alle dimensioni dei frammenti processati. In ogni provetta vengono aggiunti 4 µl di Buffer e 2 µl o di campione, o di *Ladder*. Dopo aver caricato la *screentape* ed i campioni nello strumento, si avvia la corsa (Figura 21).

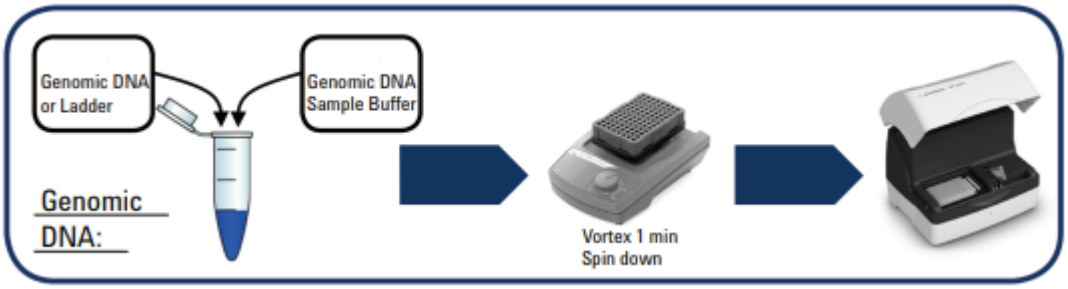


Figura 21. Procedimenti per allestimento TapeStation.

Per tutti gli altri campioni processati è stato utlizzato il kit E-Gel™ Agarose Gels with SYBR™ Safe DNA Gel Stain, 2%. I gel di agarosio E-Gel ™ sono gel senza tampone preconfezionati con elettrodi incorporati nella matrice di agarosio. Ogni gel contiene un sistema di generazione di ioni, un sistema di bilanciamento del pH e il colorante intercalante SYBR™ Safe all'interno di una cassetta di plastica trasparente (Figura 22). Ogni confezione di gel contiene due matrici a scambio ionico (IEM) che sono in contatto con il gel e gli elettrodi. Gli IEM forniscono un flusso continuo di ioni attraverso il gel, risultando in un campo elettrico prolungato necessario per il funzionamento del gel (Figura 22).

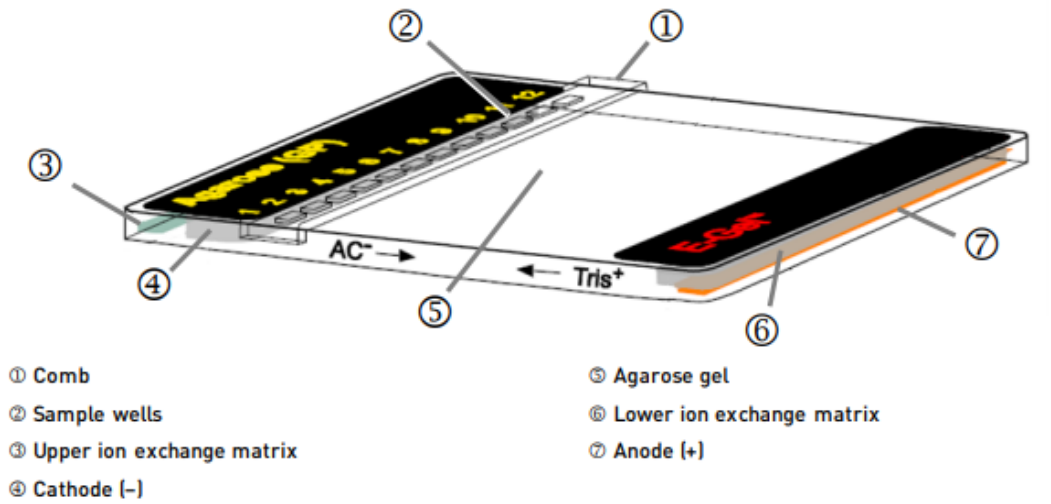


Figura 22. Rappresentazione strutturale della corsa elettroforetica su E-Gel™.

5 µl di campione sono stati aggiunti a 15 µl di acqua e caricati nei pozzetti del gel. Successivamente è stata fatta partire la corsa con i seguenti parametri:

- Tempo di corsa: 26 minuti
- *Rated Current* (*Input*): 1,3 A
- *Rated Frequency* (*Input*): 50 - 60 Hz
- *Rated Power* (*Output*): 90 W
- Umidità: 15 - 80%
- Temperatura: 15 - 30°C

La lunghezza dei frammenti ottenuti dall'elettroforesi è stata poi verificata mediante l'introduzione, nella corsa, di un campione di riferimento processato precedentemente con la tecnica della TapeStation a concentrazione e lunghezza note.

4.6 Purificazione del DNA amplificato

Gli amplificati contenenti gli SNPs sono stati sottoposti ad una purificazione. Exo-CIP PCR *cleanup* è un protocollo che viene utilizzato per purificare i prodotti di PCR per il sequenziamento diretto. Si sfrutta l'azione di due enzimi per rimuovere i dNTP non incorporati e i *primers* in eccesso. *Exonuclease I* (enzima Exo) è un enzima che digerisce il DNA a singolo filamento come i *primers* e prodotti PCR incompleti. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (enzima Cip), invece, rimuove i dNTP che non sono stati incorporati nel DNA della PCR.

La purificazione è stata ottenuta incubando a 37°C per un'ora il prodotto di amplificazione con 4 µl di Exo-CIP, una mix contenente entrambi gli enzimi. In questo caso, le quantità dei reagenti utilizzate sono riportate in Tabella 6.

Exo Mix		CIP Mix	
Buffer Exo ExoI H_2o	1,2 µl 0,3 µl 11 µl	Buffer CIP CIP H_2O	1,25 µl 1,25 µl 10 µl
Volume Totale	12,5 µl	Volume Totale	12,5 µl

Tabella 6. Reazione di purificazione mediante i due enzimi Exo e CIP.

Successivamente, le provette contenenti il prodotto purificato sono state incubate ad 80°C per 20 minuti per inattivare l'attività enzimatica prima di procedere con il sequenziamento di Sanger.

4.7 Reazione di sequenza

Le reazioni di sequenza sono state condotte sia in direzione 5'-3', sia nella direzione opposta, utilizzando il *primer forward* e il *reverse*, gli stessi impiegati anche per le reazioni di PCR, con una concentrazione di 0,2 µM. Il sequenziamento è stato eseguito con il BigDye® Terminator v1.1 Sequencing

Buffer kit (ThermoFisher). In un volume finale di 10 µl, 1 µl di DNA amplificato è stato aggiunto a 2 µl di BigDye® Sequencing Buffer, 1 µl di 5x BigDye® Terminator Sequencing Buffer e 1 µl del *primer Forward* o *Reverse*. La soluzione è stata portata al volume finale di 10 µl con l'aggiunta di 5 µl di acqua deionizzata (Tabella 7).

Reaction mix	Volume
BigDye Sequencing Buffer	2 µl
5x BigDye Terminator Sequencing Buffer	1 µl
Primer Forward o *Reverse*	1 µl
DNA	1 µl
H_2O	5 µl
Volume Totale	10 µl

Tabella 7. Reazione di sequenziamento su piastra.

Sono stati effettuati 25 cicli di denaturazione a 96°C per 1 minuto e 96°C per 10 secondi, *annealing* a 50°C per 5 secondi ed allungamento a 60°C per 4 minuti (Tabella 8).

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

Tabella 8. Condizioni di amplificazione per la reazione di sequenza.

4.8 Rimozione dei ddNTPs non incorporati

Prima di sottoporre i prodotti del sequenziamento ad elettroforesi capillare, si è proceduto alla purificazione in piastra, rimuovendo i ddNTPs non incorporati. Per questo scopo è stata utilizzato il BigDye® XTerminator Purification Kit che prevede la preparazione di una premix di 55 µl per ogni campione composta da SAM Solution e XTerminator Solution (Tabella 9).

Componenti premix	Volume
SAM Solution	45 µl
XTerminator Solution	10 µl
Volume Totale	55 µl

Tabella 9. Reazione di purificazione mediante BigDye® XTerminator Purification Kit.

La XTerminator Solution è una resina contenente microbiglie che catturano i ddNTPs non incorporati facendoli precipitare sul fondo della provetta, lasciando in soluzione il DNA amplificato. Questo processo avviene grazie al vortex di 30 minuti e alla successiva centrifugazione per 2 minuti a 3500 rpm.

4.9 Elettroforesi capillare

L'elettroforesi capillare è stata necessaria per visualizzare i prodotti del sequenziamento di Sanger. In questo caso, la piastra contenente i prodotti di sequenziamento purificati, è stata caricata direttamente sullo strumento Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer con i seguenti parametri [62]:

- Numero di capillari: quattro
- Polimero: POP4
- Tempo di iniezione: 1.5 secondi
- Voltaggio di iniezione: 2.0 Kv
- Voltaggio di corsa: 15.0 Kv
- Temperatura di corsa: 60°C
- Tempo di corsa: 1000 secondi
- *Anlalysis method*: BDX_BDT11_v.1.1

4.10 Analisi delle sequenze

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

Capitolo quinto

RISULTATI

Nel corso di questo studio sono stati analizzati 6 individui di sesso maschile che hanno sviluppato un epilessia post traumatica e 11 soggetti sani, presi come popolazione di riferimento.

L'età media dei soggetti con PTE è di 71.3, mentre quella degli individui sani è di 41.27. Per quanto riguarda i soggetti con PTE, le cause del trauma sono: sinistro stradale (n=5) di cui due per investimento, esito di aggressione (n=1). L'anno del TBI risulta compreso tra il 2011 e il 2017. Nella Tabella 10 sono riportate le caratteristiche descrittive dei campioni analizzati con le relative informazioni sul tipo di trauma cranico subito.

Le analisi genetiche sono state eseguite su campioni di sangue intero per quanto riguarda i soggetti affetti da TBI, e su tamponi buccali per i soggetti di controllo.

5.1 Controllo dei prodotti di amplificazione

Come precedentemente accennato, i prodotti di amplificazione sono stati fatti correre in elettroforesi per verificare che le loro lunghezze e dimensioni corrispondessero a quelle attese.

Campione	Sesso	Età	Anno del trauma cranico	Tipo di trauma e causa di morte	Causa del trauma	Indagini strutturali effettuate	Diagnosi di PTE
64-16	M	60	2016	insufficienza cardiorespiratoria acuta conseguente politrauma complesso encefalo-toracico.	sinistro stradale	non presenti	si
64-17	M	86	2017	insufficienza multi-organo (evento terminale) in esiti di lesioni encefaliche e shock emorragico (eventi intermedi) conseguenti a politrauma	sinistro stradale	TAC total body; TAC encefalo, eco addome	si
118-16	M	83	2016	trauma cranio-encefalico e cervicale fratturativo con sindrome da immobilizzazione protratta e disfunzione multiorgano	sinistro stradale, investimento	TC torace, bacino ; eco addome; TC cranio	si
139-14	M	72	2014	esiti di un politrauma complesso che ha provocato plurime fratture ossee e multiple lacerazioni vasali arteriose della regione colica destra	sinistro stradale	TAC torace-addome	si
145-11	M	76	2011	grave evento lesivo cranio encefalico (causa iniziale) caratterizzato da una rapida e progressiva cessazione delle attività encefaliche (causa intermedia) che ha condotto ad un quadro di arresto cardio-circolatorio (causa terminale)	sinistro stradale, investimento	TAC encefalo, RX emico stato dx, Rx rachide cervicale, Rx rachide dorsale, ECO addome, Rx torace	si
20-15	M	54	2015	trauma fratturativo cranio-encefalico parieto occipitale destro complicato da massiva gastrorragia da ulcere acute della mucosa gastrica (ulcere di Cushing) e polmonite da aspirazione	esito di aggressione	TC massiccio facciale (senza contrasto), TC cerebrale (senza contrasto)	si

Tabella 10. Descrizione della casistica.

Nello specifico, come prima verifica è stato scelto un campione della popolazione di controllo e processato in TapeStation in modo tale da avere le lunghezze degli ampliconi e le relative quantità. La quantità di DNA amplificato per ogni coppia di *primers* è stata utile per stabilire quanti microlitri aggiungere alla reazione di sequenza per ottenere risultati ottimali. Questo è possibile grazie alla presenza del Ladder e dei *markers upper* e *lower* che permettono di confrontare il tracciato elettroforetico del campione con uno di riferimento, e calcolarne la lunghezza (Figura 23).

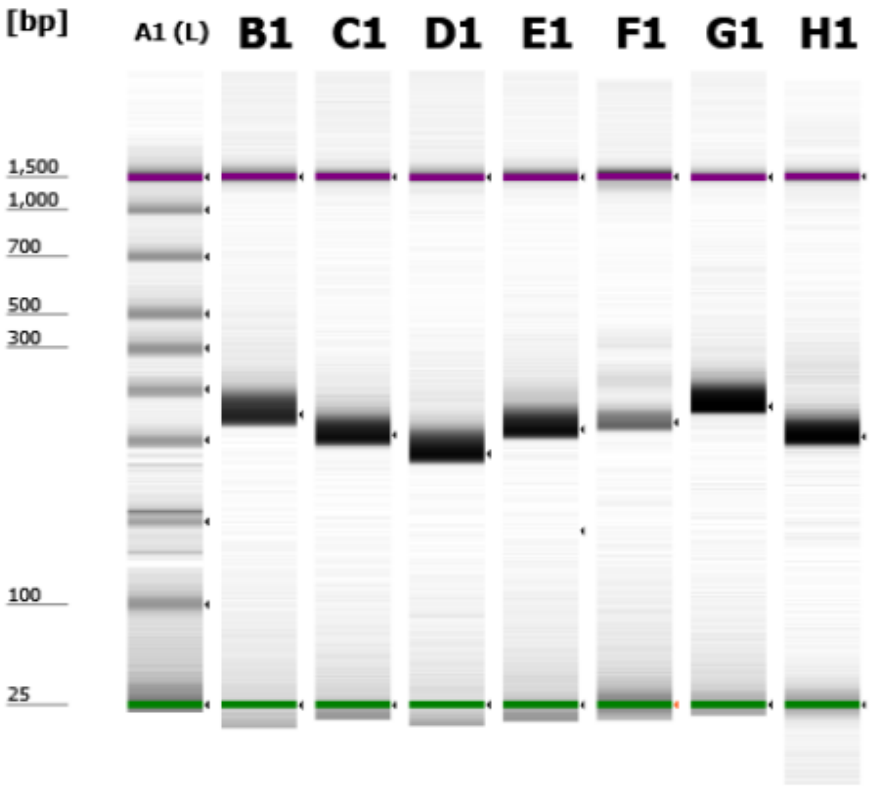
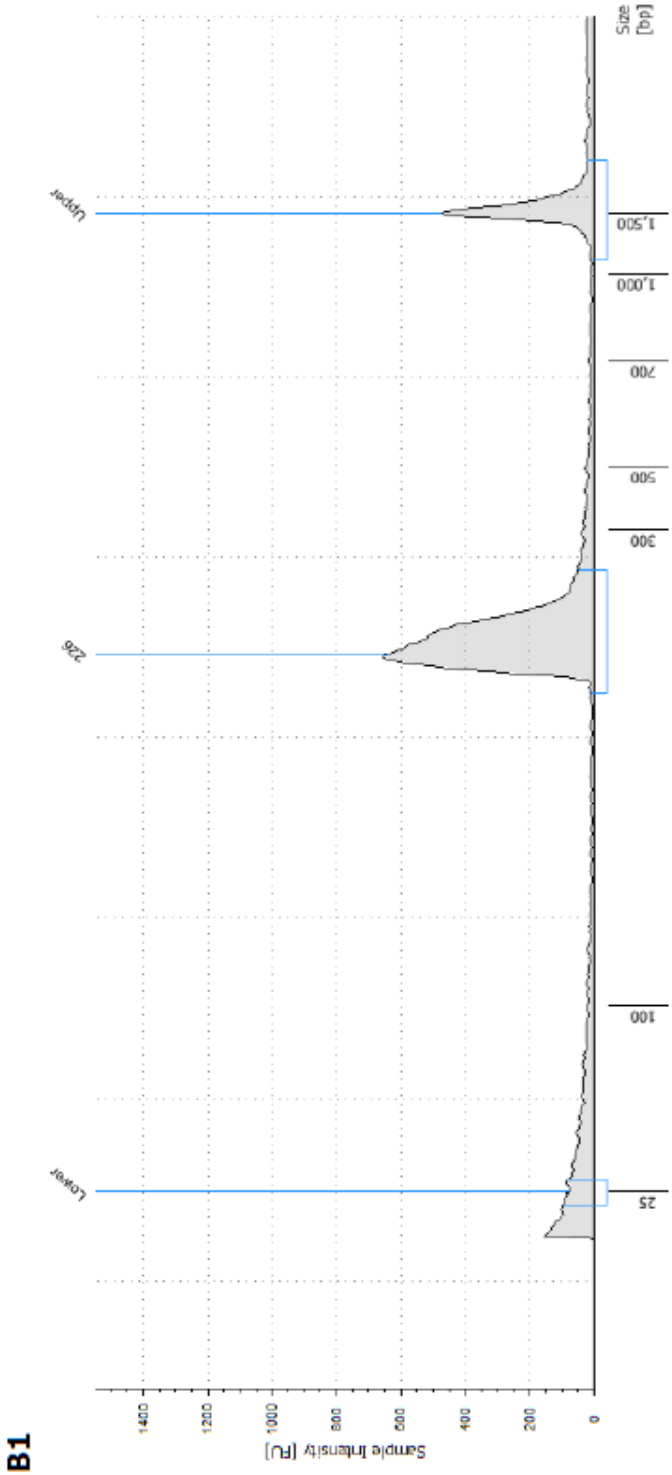


Figura 23. Raffigurazione del tracciato elettroforetico del campione LF della popolazione di controllo. Partendo da sinistra verso destra ritroviamo rispettivamente: Ladder (A1),

rs1143634 (B1), rs7858819 (C1), rs10974620 (D1), rs769391(E1), rs3791878 (F1), rs3828275 (G1), rs3766553 (H1).

I risultati della corsa sono illustrati nelle Figure 24-30. Lo strumento ha rilevato la presenza di DNA amplificato in tutti i campioni. Confrontando le bande elettroforetiche con il Ladder per stabilire le dimensioni dei frammenti amplificati, si osserva che le lunghezze degli amplificati rilevati dallo strumento sono riferibili a quelle attese (Tabella 11).

Le concentrazioni di DNA target e la relativa quantità in microlitri aggiunta nella reazione di sequenza sono riportate in Tabella 12. Si noti che l'amplicone corrispondente al polimorfismo rs3791878 ha una concentrazione (452 pg/µl) molto inferiore rispetto agli altri che si aggirano tutti intorno ai 2681 pg/µl, perciò, di tale amplificato sono stati aggiunti 3 µl di DNA nella reazione di sequenza.

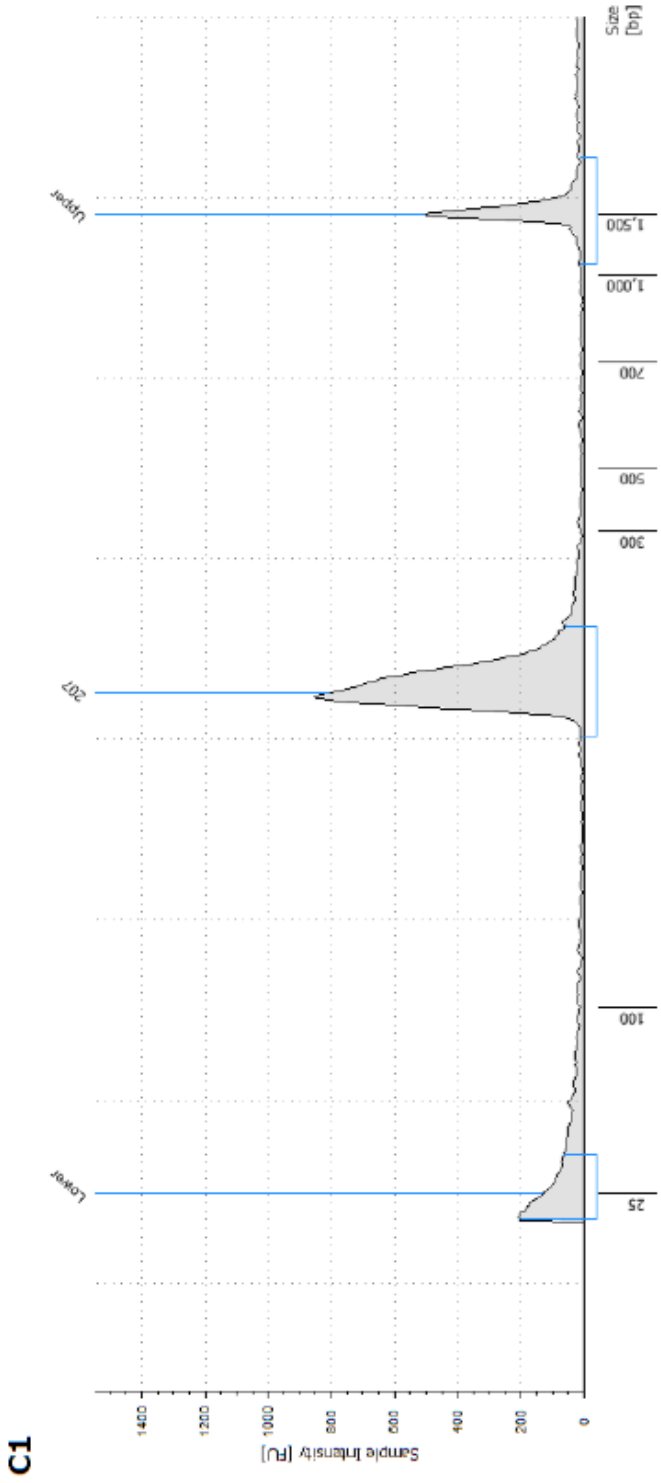


PTE1

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	121	-	7430	-		Lower Marker
226	1910	-	13000	100.00		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

Figura 24. Grafico raffigurante i picchi relativi ai *markers upper*, *lower* e al campione rs1143634 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.

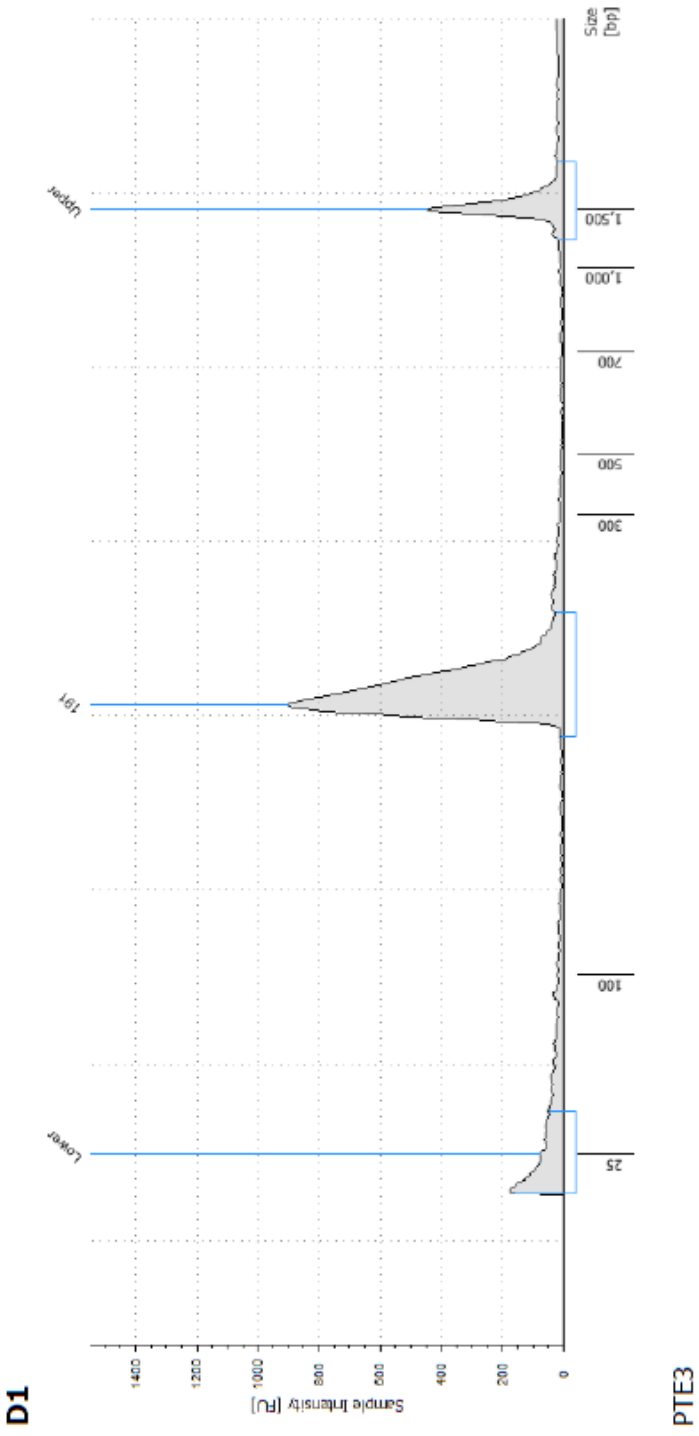


PTE2

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	482	-	29700	-		Lower Marker
207	2180	-	16200	100.00		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

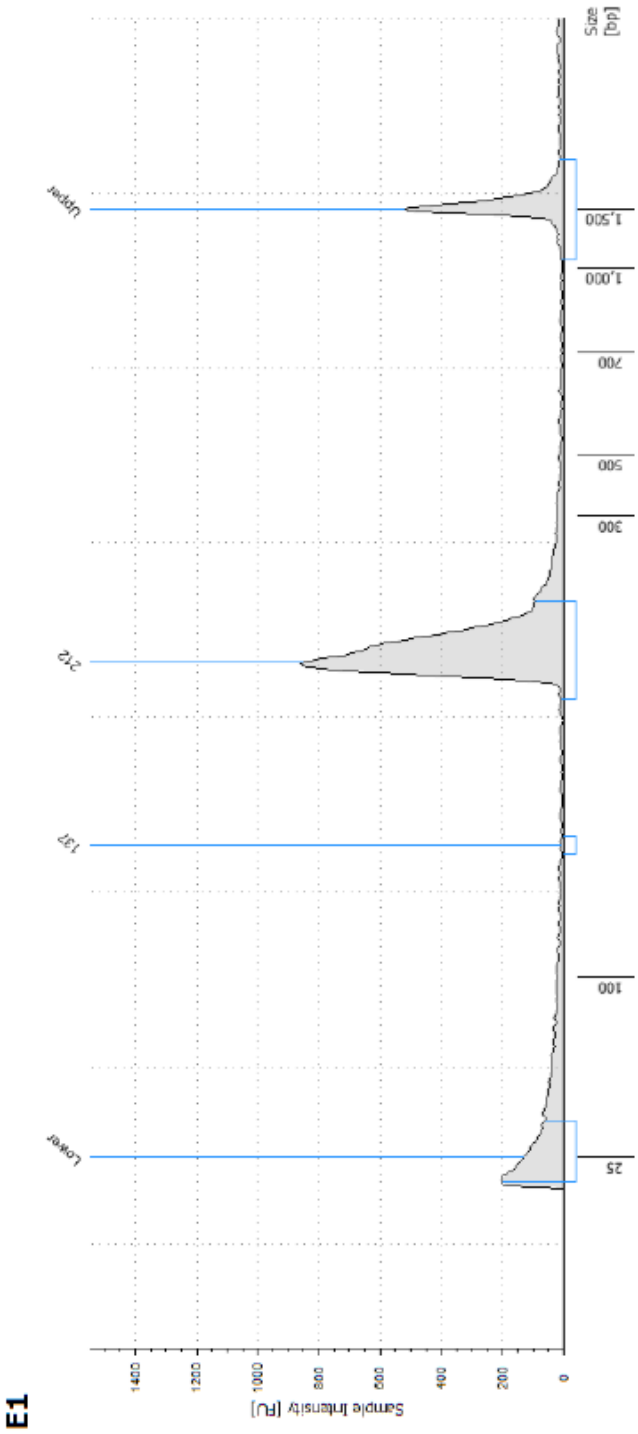
Figura 25. Grafico raffigurante i picchi relativi ai *markers upper*, *lower* e al campione rs7858819 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.



Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	445	-	27400	-		Lower Marker
191	2640	-	21300	100.00		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

Figura 26. Grafico raffigurante i picchi relativi ai *markers upper*, *lower* e al campione rs10974620 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.

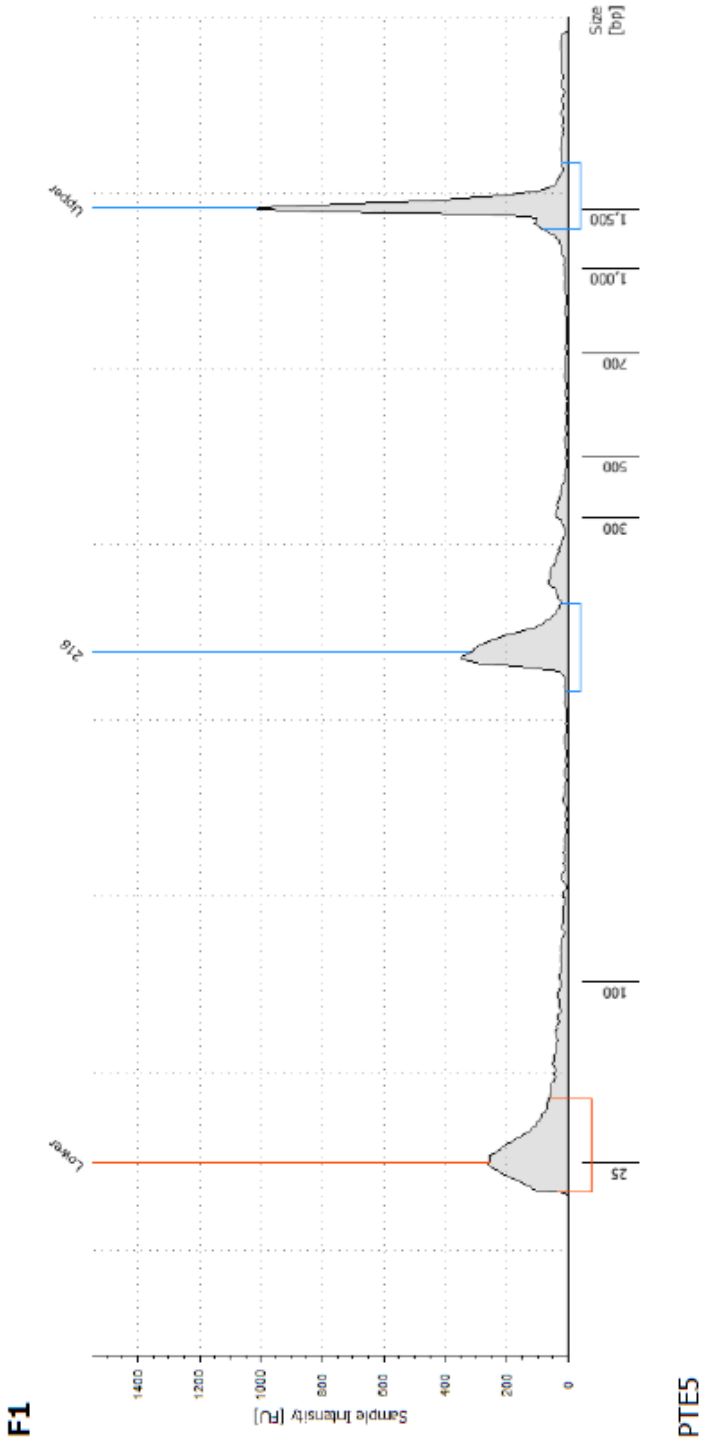


PTE4

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	468	-	28800	-		Lower Marker
137	6.77	-	76.0	0.31		
212	2160	-	15700	99.69		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

Figura 27. Grafico raffigurante i picchi relativi ai markers upper, lower e al campione rs769391 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.

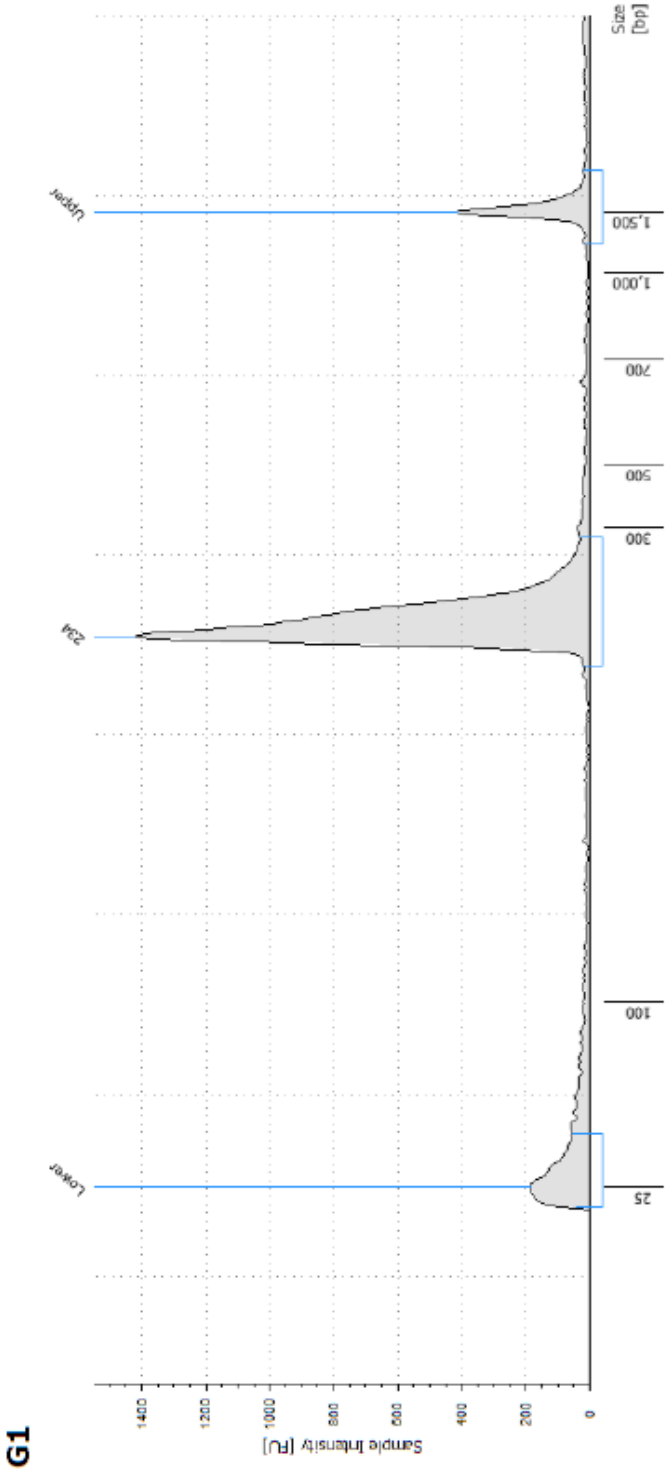


PTE5

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	546	-	33600	-		Lower Marker
218	452	-	3190	100.00		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

Figura 28. Grafico raffigurante i picchi relativi ai *markers upper*, *lower* e al campione rs3791878 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.

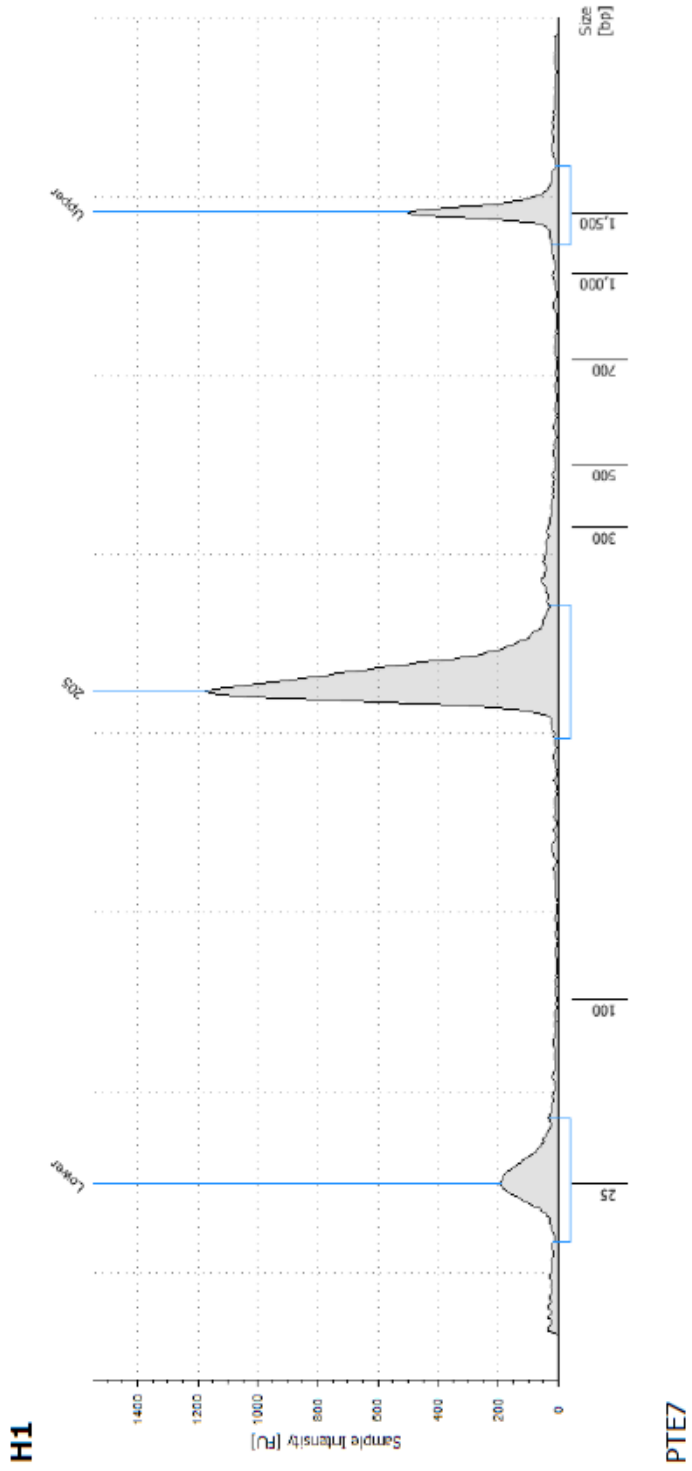


PTE6

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	731	-	45000	-		Lower Marker
234	4280	-	28200	100.00		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

Figura 29. Grafico raffigurante i picchi relativi ai *markers upper, lower* e al campione rs3828275 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.



PTE7

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/µl]	Assigned Conc. [pg/µl]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	666	-	41000	-		Lower Marker
205	2920	-	21900	100.00		
1,500	580	580	595	-		Upper Marker

Figura 30. Grafico raffigurante i picchi relativi ai *markers upper*, *lower* e al campione rs3766553 testato. Nella tabella sottostante sono riassunti i valori dei parametri analizzati dallo strumento, tra cui lunghezza dell'amplicone e quantità in pg/µl.

Gene	polimorf. (a)	GenBank/dbSNP accession	Lungh. amplicone (bp)	Lungh. amplicone (bp) TapeStation
IL-1β	G>A	rs1143634	272	226
SLC1A1	C>T	rs7858819	209	207
SLC1A1	C>G,T	rs10974620	200	191
GAD1	A>G	rs769391	227	212
GAD1	G>T	rs3791878	218	218
GAD1	C>T	rs3828275	249	234
A1AR	A>G	rs3766553	207	205

Tabella 11. Confronto tra la lunghezza attesa degli ampliconi e la lunghezza ottenuta dalla corsa elettroforetica (TapeStation).

Gene	polimorf. (a)	GenBank/dbSNP accession	Conc. (pg/µl)	Quantità nella reaz. di sequenza (µl)
IL-1β	G>A	rs1143634	1910	1
SLC1A1	C>T	rs7858819	2180	1
SLC1A1	C>G,T	rs10974620	2640	1
GAD1	A>G	rs769391	2160	1
GAD1	G>T	rs3791878	452	3
GAD1	C>T	rs3828275	4280	1
A1AR	A>G	rs3766553	2920	1

Tabella 12. Concentrazione degli ampliconi del campione di controllo e relativa quantità aggiunta nella reazione di sequenza.

Successivamente, sulla base dei risultati acquisiti dalla TapeStation, tutti gli amplificati riguardanti gli altri campioni sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Tutti i campioni analizzati hanno lunghezze riferibili a quelle del campione di riferimento e, di conseguenza, a quelle calcolate teoricamente con il disegno dei *primers*. Nella Figura 31 è riportata l'immagine di un gel di agarosio rappresentativo dei campioni esaminati.

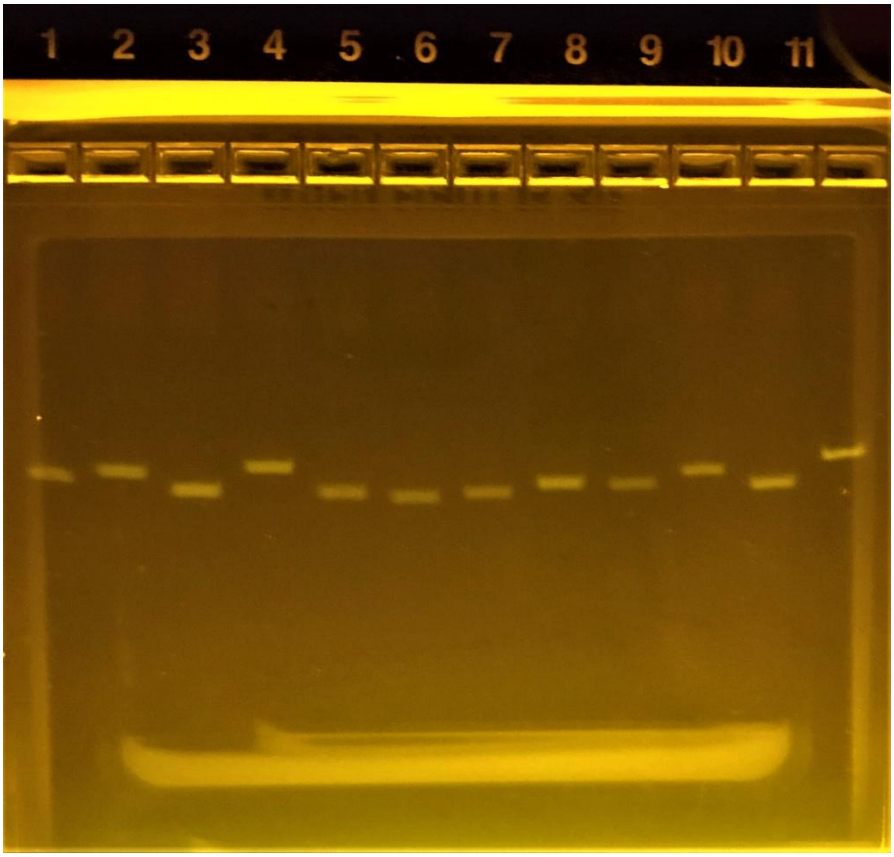


Figura 31. Gel di agarosio al 2% del campione 118-16. Nel pozzetto 7 è presente un amplicone del campione di controllo come verifica.

5.2 Analisi genetica dei polimorfismi SNPs

Come precedentemente spiegato, in questo studio sono stati analizzati sette polimorfismi a singolo nucleotide riguardanti alcuni geni coinvolti nel processo di epilettogenesi, quali: IL-1β, SLC1A1, GAD1 e ADORA1. Attraverso il software SeqScape 3, è stato possibile fare l'analisi genetica delle sequenze ottenute dal sequenziamento di Sanger e visualizzate negli elettroferogrammi del Genetic Analyzer 3130. Dopo la prima fase di allineamento degli elettroferogrammi riguardanti le sequenze *forward* e *reverse* ottenuti, con le sequenze di riferimento dei geni nel software, veniva attribuita la condizione di omozigosi o eterozigosi a seconda del picco o dei picchi corrispondenti alla posizione del polimorfismo. La presenza delle sequenze in entrambe le direzioni (*forward* e *reverse*), ha fornito un'ulteriore conferma dei corretti risultati. Nelle Figure 31 e 32 sono riportati degli esempi di elettroferogrammi a cui è stata attribuita l'omozigosi nell'uno (Figura 32) e l'eterozigosi nell'altro (Figura 33).

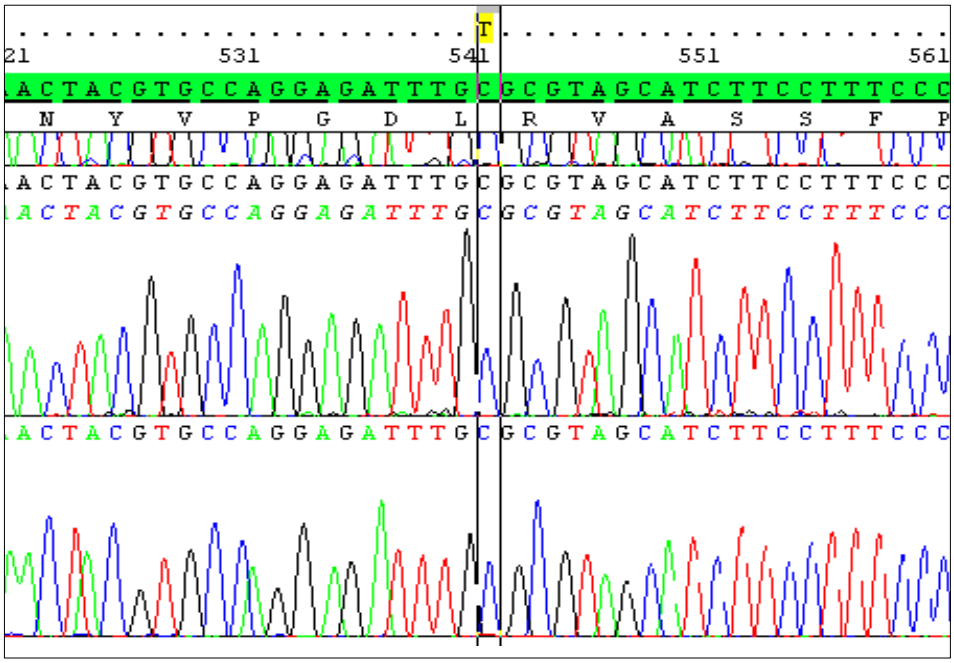


Figura 32. Elettroferogramma con condizione di omozigosi CC.

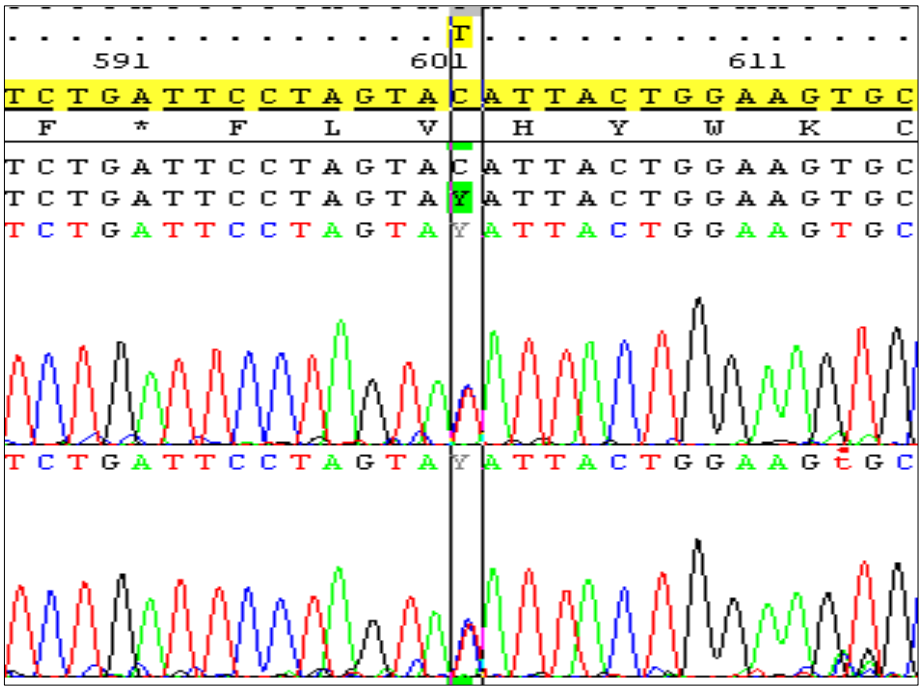


Figura 33. Elettroferogramma con condizione di eterozigosi per presenza di due picchi sovrapposti (Y = CT).

I risultati acquisiti dall'analisi delle sequenze sono riportati in Tabella 13:

- rs1143634: per la popolazione affetta da PTE, l'eterozigosi GA si presente nel 50% dei soggetti (n=3) e l'omozigosi AA per la variante polimorfica è assente. Per quanto riguarda la popolazione di controllo, è presente una condizione di eterozigosi GA nel 36,4% dei casi (n=4) ed anche qui non sono presenti omozigoti AA per la variante polimorfica.
- rs7858819: sia nei soggetti affetti da PTE (16,7%) che nella popolazione di controllo (9,1%), l'eterozigosi CT per la variante polimorfica si verifica in un solo caso, mentre è del tutto assente la condizione di omozigosi TT.
- rs10974620: considerando che questo polimorfismo presenta due varianti, si può definire una mutazione triallelica C>T/G. Tuttavia, le varianti associate alla transizione C>T sia in etero che in omozigosi non sono presenti. Nei soggetti post-traumatici, in due casi su sei (33,3%) ci sono le varianti eterozigotiche GC, ma non la variante omozigotica GG. Lo stesso vale per la popolazione di controllo, con un solo caso di eterozigosi GC (9,1%).
- rs769391: due soggetti post-traumatici (33,3%) e quattro soggetti della popolazione di controllo (36,4%) presentano la condizione di

eterozigosi GA per la variante polimorfica A>G. Nessun individuo presenta la condizione di omozigosi mutata GG.

- rs3791878: nei soggetti post-traumatici sono tre (50%) i casi di eterozigosi GT e la variante omozigotica mutata TT è assente. Nella popolazione sana, invece, c'è un solo caso con eterozigosi GT (9,1%) e due casi (18,2%) di omozigosi per la mutazione TT.
- rs3828275: la variante polimorfica eterozigotica CT è presente in due soggetti post-traumatici (50%) e in cinque campioni di controllo (45,5%). La variante omozigotica mutata TT è presente in due soggetti affetti da PTE (33,3%) e in tre soggetti della popolazione di controllo (27,3%).
- rs3766553: ci sono tre condizioni di eterozigosi GA per quanto riguarda i soggetti post-traumatici (50%) e una condizione di omozigosi per la variante mutata GG (9,1%). Nella popolazione sana ci sono tre casi di eterozigosi GA (27,3%) e tre casi di omozigosi GG (27,3%).

	IL-1β	SLC1A1		GAD1			ADORA1
	rs1143634	rs7858819	rs10974620	rs769391	rs3791878	rs3828275	rs3766553
Wilde Type	G	C	C	A	G	C	A
Variant	A	T	T/G	G	T	T	G
Campioni							
64-16	**GA**	CC	CC	**GA**	**GT**	**CT**	AA
64-17	GG	CC	CC	AA	GG	**TT**	AA
118-16	**GA**	CC	CC	AA	GG	CC	**GA**
139-14	GG	**CT**	**GC**	AA	**GT**	**CT**	**GA**
145-11	GG	CC	CC	**GA**	**GT**	CC	**GG**
20-15	**GA**	CC	**GC**	AA	GG	**TT**	**GA**
Campioni di controllo							
LF	GG	CC	CC	**GA**	GG	**CT**	**GA**
EC	**GA**	CC	CC	AA	**GT**	CC	AA
BS	GG	CC	CC	**GA**	**TT**	CC	AA
GT	GG	CC	CC	**GA**	**TT**	**CT**	**GG**
AN_CS001	**GA**	CC	CC	AA	GG	**TT**	**GG**
AN_CS030	**GA**	CC	CC	**GA**	GG	CC	**AA**
AN_CS016	GG	CC	**GC**	AA	GG	**CT**	**GG**
AN_CS005	**GA**	CC	CC	AA	GG	**TT**	**GA**
AN_CS012	GG	CC	CC	AA	GG	**CT**	**GA**
AN_CS019	GG	**CT**	CC	AA	GG	**TT**	**GA**
AN_CS037	GG	CC	CC	AA	GG	**CT**	AA

Legenda:	rischio > GA	rischio > TT	rischio > GG	rischio > a 6 mesi AA	rischio > a 6 mesi: GG	rischio > a 1 sett.: TT	rischio > entro 1 sett.: AA
							rischio > dopo la 1^a sett.: GG

Tabella 13. Risultati dell'analisi genetica degli SNPs. In carattere grassetto sono riportati i casi di eterozigosi ed omozigosi per la variante mutata dei sette polimorfismi analizzati.

Capitolo sesto

DISCUSSIONE

In attesa dell'approvazione dello studio di ricerca con una popolazione più ampia da parte del comitato etico, l'analisi ha preso in esame sei campioni ematici prelevati da soggetti con epilessia, sviluppata in seguito ad un trauma cranico, con sopravvivenza di massimo 6 mesi.

Per quanto riguarda il polimorfismo rs1143634 nel gene IL-1β, coerentemente con gli studi precedenti [21], si può confermare che gli individui con genotipo AA sono quasi del tutto assenti e che il genotipo maggiormente a rischio per lo sviluppo di PTE è GA (50%). IL-1β, prodotto nel sistema nervoso centrale e periferico, negli individui sani si presenta con livelli di espressione molto bassi e favorevoli ai processi fisiologici come la formazione della memoria e il controllo del sonno. Tuttavia, nei soggetti affetti da PTE, c'è un aumento di espressione di IL-1β con conseguente associazione a morte neuronale precoce ed eccito tossicità [21]. Dunque, l'associazione del polimorfismo con l'aumentata espressione di IL-1β, suggerisce che una variazione genetica possa influenzare l'espressione ed il trasposto della molecola stessa nell'organismo.

Per quanto riguarda le variazioni genetiche nell'espressione dei trasportatori neuronali del glutammato, sembrano esserci associazioni con lo sviluppo di

crisi epilettiche. Non rimane ancora chiaro però, se queste variazioni genetiche si possano associare allo sviluppo di epilessia post traumatica. EAAT3 viene espresso dai neuroni glutaminergici e GABA-ergici nella corteccia, ippocampo, cerebello, gangli della base [27]. L'espressione regionale di EAAT3 (gene SLC1A1), media il trasporto delle riserve di glutammato per la conseguente produzione del neurotrasmettitore GABA. Pertanto, una funzione interrotta o una ridotta espressione di EAAT3, potrebbe ridurre le riserve antiossidanti, interferire sulla produzione di GABA e di conseguenza incrementare il tono eccitatorio facilitando l'epiletogenesi [27]. Tuttavia, l'analisi genetica svolta in questo studio, in linea con la ricerca di Ritter A. C. et al. [27], non ha evidenziato risultati significativi, in quanto nessun soggetto esaminato presentava il genotipo associato ad un potenziale marcatore di epilessia post traumatica.

Relativamente alla variabilità genetica associata al gene GAD1, Shaun D. D. et al. [26] suddividono i tre polimorfismi analizzati in base al rischio di sviluppare l'epilessia post traumatica entro la prima settimana e entro i primi sei mesi dal TBI. In particolare, rispettivamente per gli SNPs rs769391 e rs3791878, i soggetti con genotipo AA e GG hanno un rischio aumentato di sviluppare PTE entro sei mesi dal trauma cranico, mentre per il polimorfismo rs3828275 il genotipo a rischio di PTE entro la prima settimana dal trauma è

TT. L'esito delle analisi genetiche svolte in questo studio concorda con la ricerca di Shaun D. D. et al., in quanto il 66,7% dei casi presenta il genotipo a rischio AA, il 50% il genotipo a rischio GG e il 33,3% il genotipo a rischio TT. È noto che la proteina GAD può legarsi alle vescicole sinaptiche per mezzo della heat-shock protein 70 come proteina di ancoraggio e che questo legame è pensato per facilitare un'efficiente processo di sintesi e *packaging* del neurotrasmettitore GABA [32]. Di conseguenza, una o più variazioni genetiche a carico di questa proteina potrebbero influenzare la produzione e il *packaging* del GABA e partecipare al processo di epilettogenesi [26] [32].

Per GAD1, le associazioni con l'epilessia post traumatica precoce (entro la prima sett.) potrebbero essere dovute alla modulazione GABAergica dell'eccitotossicità acuta che si verifica intensamente nella prima settimana dopo il TBI. La suscettibilità genetica sub-acuta (prima sett.-sei mesi), invece, potrebbe riflettere la continua evoluzione dei processi di riparazione cellulare, comprese le modificazioni epigenetiche che si vengono a creare a causa di un TBI.

Per quanto riguarda il polimorfismo associato al gene ADORA1, dallo studio di Wagner A. K. et al. risulta che la condizione di omozigosi in AA aumenta il rischio di PTE entro la prima settimana dal trauma cranico e per GG aumenta il rischio a sei mesi, mentre gli eterozigoti GA, il fatto di avete un solo allele

mutato potrebbe essere considerato come un elemento di protezione contro lo sviluppo di PTE [32]. In questo studio, le analisi del polimorfismo rs3766553 non sembrano riportare risultati significativi per il genotipo “di protezione” GA, in quanto il 50% dei casi presenta l’eterozigosi, ma ha comunque sviluppato l’epilessia. Si è visto che la formazione di cicatrici gliali è implicata nello sviluppo di crisi epilettiche non traumatiche, perché compromettono la sintesi di adenosina attraverso una maggior produzione astrocitaria di adenosin-chinasi [32]. Le cicatrici gliali si verificano comunemente dopo un TBI e possono giocare un ruolo fondamentale nella suscettibilità alle crisi convulsive mediate dal recettore A1AR, attraverso la disponibilità di adenosina. L'A1AR può essere sottoposto a dimerizzazione ed eteromerizzazione per modulare la neurotrasmissione

e la variazione genetica nel gene ADORA1, rappresentato dal polimorfismo rs3766553, può influenzare la suscettibilità al PTE [32].

L’analisi effettuata contempla una casistica troppo ridotta per poter dire se i polimorfismi a singolo nucleotide presi in esame possano predisporre allo sviluppo di epilessia post traumatica. Studi futuri su una popolazione più ampia, con l’allestimento di PCR in *multiplex*, che riducono tempi e costi di esecuzione, potrebbero far luce non solo sul ruolo degli SNPs in singolo come *markers* genetici, ma anche sulla possibile multifattorialità degli stessi e

quindi sull'associazione di modificazioni genetiche multiple con l'aumentato rischio di sviluppare l'epilessia in seguito ad un trauma cranico.

BIBLIOGRAFIA

1. Scrimieri Rosalba. *Immagini dell'epilessia fra mito e scienza,* Psychfenia - VII (10): 171-190, 2004).
2. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. *ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy*, Epilepsia, 55(4):475-482, 2014.
3. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*, Epilepsia, 2005;46(4):470-2.
4. Zara F. *Genetics of the epilepsies and laboratory techniques*, Gior Neuropsich Età Evol 2006;26:24-36.
5. Lega Italiana Contro l'Epilessia (LICE), *Guida alle epilessie*, 2018.
6. Qian C, Lopponen P, Tetri S, Huhtakangas J, Juvela S, Turtiainen HM, et al. *Immediate, early and late seizures after primary intracerebral hemorrhage. Epilepsy Res 2014;108:732–9*.
7. Lowenstein DH. *Epilepsy after head injury: an overview,* Epilepsia 2009;50(Suppl. 2):4–9.

8. Oscar C González, Giri P Krishnan, Igor Timofeev, Maxim Bazhenov, *Ionic and synaptic mechanisms of seizure generation and epileptogenesis*, Neurobiol Dis. 2019; 28;130:104485.
9. Łukawski K, Andres-Mach M, Czuczwar M, Łuszczki JJ, Kruszyński K, Czuczwar SJ. *Mechanism of epileptogenesis and preclinical approach to antiepileptogenic therapies*, Pharmacol Rep. 2018; 70(2):284-293.
10. Kan Ding, Puneet K Gupta, and Ramon Diaz-Arrastia. *Epilepsy after Traumatic Brain Injury* – Chapter 14, 2016.
11. Ellen R Bennett, Karin Reuter-Rice, and Daniel T Laskowitz. *Genetic Influences in Traumatic Brain Injury* - Chapter 9, 2016.
12. Cotter D, Kelso A, Neligan A. *Genetic biomarkers of posttraumatic epilepsy: A systematic review,* Seizure. 2017;46:53-58.
13. Agoston DV, Shutes-David A, Peskind ER. *Biofluid biomarkers of traumatic brain injury*, Brain Inj. 2017;31(9):1195-1203.
14. McAllister TW. *Genetic factors modulating outcome after neuro trauma*, PM R. 2010;2(12 Suppl 2):S241-52.
15. Davidson J, Cusimano MD, Bendena WG. *Post-Traumatic Brain Injury: Genetic Susceptibility to Outcome*, Neuroscientist. 2015;21(4):424-41.

16. Shastry BS. *SNPs: impact on gene function and phenotype*, Methods Mol Biol. 2009;578:3-22.

17. Komar AA. *Silent SNPs: impact on gene function and phenotype*, Pharmacogenomics. 2007 Aug;8(8):1075-80.

18. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. *Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway*, Sci Signal. 2010 Jan 19;3(105):cm2.

19. Eder C. *Mechanisms of interleukin-1beta release*, Immunobiology. 2009;214(7):543-53.

20. Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI. *Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons*, J Neurotrauma. 2005;22(8):885-95.

21. Diamond ML, Ritter AC, Failla MD, Boles JA, Conley YP, Kochanek PM, Wagner AK. *IL-1β associations with posttraumatic epilepsy development: A genetics and biomarker cohort study*, Epilepsia. 2015;56(7):991-1001.

22. Ravizza T, Lucas SM, Balosso S, Bernardino L, Ku G, Noé F, Malva J, Randle JC, Allan S, Vezzani A. *Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy*, Epilepsia. 2006;47(7):1160-8.

23. Erik M. Jorgensen. *GABA*, WormBook. 2005; 31:1-13.

24. Treiman DM. *GABAergic mechanisms in epilepsy*, Epilepsia. 2001;42 Suppl 3:8-12.

25. Mainprize T, Shuaib A, Ijaz S, Kanthan R, Miyashita H, Kalra J. *GABA concentrations in the striatum following repetitive cerebral ischemia*, Neurochem Res. 1995;20(8):957-61.

26. Shaun D. Darrah, Miller MA, Ren D, Hoh NZ, Scanlon JM, Conley YP, Wagner AK. *Genetic Variability in Glutamic Acid Decarboxylase Genes: Associations with Post-traumatic Seizures after Severe TBI*, Epilepsy Res. 2013;103(2-3):180-94.

27. Anne C Ritter, Kammerer CM, Brooks MM, Conley YP, Wagner AK. *Genetic Variation in Neuronal Glutamate Transport Genes and Associations with Post-Traumatic Seizure*, Epilepsia. 2016;57(6):984-93.

28. Zou H, Brayer SW, Hurwitz M, Niyonkuru C, Fowler LE, Wagner AK. *Neuroprotective, neuroplastic, and neurobehavioral effects of daily treatment with levetiracetam in experimental traumatic brain injury*, Neurorehabil Neural Repair. 2013;27(9):878-88.

29. Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, Coulter DA, Rothstein JD. *A neuronal glutamate transporter contributes to*

neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy, J Neurosci. 2002;1;22(15):6372-9.

30. Bianchi MG, Bardelli D, Chiu M, Bussolati O. *Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease*, Cell Mol Life Sci. 2014;71(11):2001-15.
31. Blauwendraat C, Nalls MA, Federoff M, Pletnikova O, Ding J, Letson C, Geiger JT, Gibbs JR, Hernandez DG, Troncoso JC, Simón-Sánchez J, Scholz SW; International Parkinson's Disease Genomics Consortium. *ADORA1 mutations are not a common cause of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*, Mov Disord. 2017;32(2):298-299.
32. Wagner AK, Miller MA, Scanlon J, Ren D, Kochanek PM, Conley YP. *Adenosine A1 Receptor Gene Variants Associated with Posttraumatic Seizures after Severe TBI*, Epilepsy Res. 2010;90(3):259-72.
33. Schmidt AL, Anderson LM. *Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues*, Biol Rev Camb Philos Soc. 2006;81(4):531-43.
34. Tagliabracci A, Alessandrini F, Mazzarini L, Onofri V, Onori N, Turchi C. *Introduzione alla genetica forense*, Springer-Verlag Italia 2010.
35. Brookes AJ. *The essence of SNPs*, Gene. 1999 Jul 8;234(2):177-86.

36. Shastry BS. *SNPs: impact on gene function and phenotype*, Methods Mol Biol. 2009;578:3-22.

37. 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.

38. Babenko VN, Chadaeva IV, Orlov YL. *Genomic landscape of CpG rich elements in human*, BMC Evol Biol. 2017;17(Suppl 1):19.

39. Weiner MP, Hudson TJ. *Introduction to SNPs: discovery of markers for disease*, Biotechniques. 2002 Jun;Suppl:4-7, 10, 12-3.

40. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Ainscough R et al.; International Human Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome*, Nature. 2001;409(6822):860-921.

41. Medina J, Perron H. *DNA sequences from mobile genetic elements, a hidden half of the human genome*, Med Sci (Paris). 2017;33(2):151-158.

42. Roux KH. *Optimization and troubleshooting in PCR*, Cold Spring Harb Protoc. 2009;2009(4):pdb.ip66.

43. McInerney P1, Adams P2, Hadi MZ. *Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase*, Mol Biol Int. 2014;2014:287430.

44. Paul N, Shum J, Le T. *Hot start PCR*, Methods Mol Biol. 2010;630:301-18.

45. Green MR, Sambrook J. *Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR)*, Cold Spring Harb Protoc. 2018;2018(5):pdb.prot095125.

46. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. *Overview of Next Generation Sequencing Technologies*, Curr Protoc Mol Biol. 2018;122(1):e59.

47. Møller RS, Dahl HA, Helbig I. *The contribution of next generation sequencing to epilepsy genetics*, Expert Rev Mol Diagn. 2015;15(12):1531-8.

48. Aneja S, Sharma S. *Newer anti-epileptic drugs*, Indian Pediatr. 2013;50(11):1033-40.

49. Yee JY, Nurjono M, Teo SR, Lee TS, Lee J. *GAD1 Gene Expression in Blood of Patients with First-Episode Psychosis*, PLoS One. 2017 Jan 25;12(1):e0170805.

50. Bruxel EM, Akutagava-Martins GC, Salatino-Oliveira A, Genro JP, Zeni CP, Polanczyk GV, Chazan R, Schmitz M, Rohde LA, Hutz MH. *GAD1 gene polymorphisms are associated with hyperactivity in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder*, Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2016;171(8):1099-1104.

51. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/TapeStation.

52. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

53. Bocek P. *Electrophoresis: past, present and future. Editorials*, Electrophoresis. 2009 Jun;30 Suppl 1:S1.

54. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*, J Vis Exp. 2012 Apr 20;(62). pii: 3923.

55. Voytas D. *Agarose gel electrophoresis*, Curr Protoc Immunol. 2001;Chapter 10:Unit 10.4.

56. Koontz L. *Agarose gel electrophoresis*, Methods Enzymol. 2013;529:35-45.

57. Borst P. *Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started*, IUBMB Life. 2005;57(11):745-7.

58. Robert F, Bouilloux JP, Denoroy L. *Capillary electrophoresis: principle and applications*, Ann Biol Clin (Paris). 1991;49(3):137-48.

59. Estrada-Rivadeneyra D. *Sanger sequencing*, FEBS J. 2017;284(24):4174.

60. Verma M, Kulshrestha S, Puri A. *Genome Sequencing*, Methods Mol Biol. 2017;1525:3-33.

61. 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.

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

63. Krnajski Z, Geering S, Steadman S. *Performance verification of the Maxwell 16 Instrument and DNA IQ Reference Sample Kit for automated DNA extraction of known reference samples*, Forensic Sci Med Pathol. 2007;3(4):264-9.

64. http://www.endotoxin.cz/dokumenty/maxwell_clinical_brochure1_201206211517516.pdf.

RINGRAZIAMENTI

Concludo questo lavoro ringraziando tutti coloro che mi hanno accompagnato in questo cammino.

Innanzitutto vorrei ringraziare il mio relatore Dott. Mauro Pesaresi e la mia correlatrice Dott.ssa Chiara Turchi che hanno seguito pazientemente e con professionalità lo sviluppo del lavoro e mi hanno sempre equipaggiata dei loro preziosi suggerimenti.

Un altro ringraziamento speciale va al Dott. Valerio Onofri, alla Dott.ssa Federica Alessandrini e a tutto il personale della SOD di Medicina Legale dell'azienda Ospedaliero - Universitaria "Ospedali Riuniti Umberto I - G.M. Lancisi - G. Salesi" di Ancona per avermi fornito il supporto tecnico e morale durante tutto il periodo di tirocinio.

Alla Dott.ssa Filomena Melchionda un ringraziamento super-speciale per avermi dato tutta la sua disponibilità, pazienza e trasmesso la passione per questo lavoro.