



Università degli Studi di Trieste



Sede Amministrativa: Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Fisiologia e Patologia
CENTRO INTERDIPARTIMENTALE PER LE NEUROSCIENZE
(Basic Research And Integrative Neuroscience)

Dottorato di Ricerca in:

Neuroscienze

Ciclo: XX

*Ruolo dei canali di K^+ hERG nello sviluppo neuronale e
nella fisiopatologia dell'epilessia*

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Paola Lorenzon

Supervisore: Chiar.ma Prof.ssa Laura Ballerini

Correlatore: Chiar.ma Prof.ssa Annarosa Arcangeli

Dottorando: EmanueleCilia

13 Febbraio 2008

Indice

Introduzione	pg. 0-55
<i>I canali ERG</i>	<i>pg. 11</i>
<i>Circuito Talamo-Corticale</i>	<i>pg. 31</i>
<i>L'ippocampo</i>	<i>pg. 45</i>
<i>Il Talamo</i>	<i>pg. 48</i>
<i>Epilessia</i>	<i>pg. 51</i>
Materiali e Metodi	pg. 56
Risultati	pg. 105
Discussione	pg. 136
Bibliografia	pg. 142

ERG

I canali ionici

I canali ionici sono proteine di membrana che permettono il passaggio selettivo di ioni attraverso il plasmalemma, secondo un gradiente elettrochimico e con velocità prossima a quella di diffusione in un mezzo acquoso.

I canali ionici svolgono varie funzioni in tutti i tipi cellulari, assumendo particolare importanza nel tessuto nervoso e muscolare dove sono deputati alla regolazione dell'eccitabilità cellulare. Si distinguono in base alla selettività verso molecole o ioni ed ai fattori che ne regolano l'apertura e la chiusura.

Dipendentemente dallo ione verso cui ne permettono il passaggio si distinguono in:

- canali del Na^+
- canali del K^+
- canali del Ca^{2+}
- canali del Cl^-

Tutti i canali sono formati da un complesso glicoproteico di base, costituito da una grossa proteina integrale di membrana coniugata con gruppi glicidici. In posizione centrale la struttura è formata da un poro acquoso che attraversa la membrana in tutto il suo spessore.

In molti canali la struttura che forma il poro è costituita da due o più subunità che possono essere uguali o diverse fra loro. Alcuni canali possiedono alcune subunità ausiliare (subunità β) che sono in grado di modificare le proprietà funzionali.

La selettività è determinata da interazioni chimico-fisiche che si stabiliscono fra gli ioni e i diversi residui amminoacidici costituenti la parete interna del poro acquoso e dalle dimensioni del filtro molecolare che è funzione del diametro del poro.

In base ai meccanismi che ne regolano l'apertura e la chiusura, i canali ionici possono essere distinti in:

- canali regolati da ligando
- canali regolati da fosforilazione
- canali voltaggio-dipendenti
- canali regolati da stiramento o pressione

I diversi meccanismi di apertura e chiusura si basano su modificazioni conformazionali del canale.

Proprietà dei singoli canali

Le proprietà dei canali possono essere osservate registrando l'attività di singolo canale a un potenziale di membrana fissato. Il tempo di apertura e chiusura di un canale è conosciuto come "gating". Il tempo in cui esso rimane aperto o chiuso non è costante, per questa ragione viene definito il tempo di apertura e chiusura medio. La probabilità di apertura di un canale è definita come la frazione di tempo in cui un canale è aperto. L'ampiezza della corrente che fluisce attraverso il canale è costante, se rimane costante il potenziale di membrana.

Permeabilità

Quando un canale è aperto il passaggio di ioni è permesso da un gradiente elettrochimico attraverso la membrana. Il tasso a cui essi attraversano il canale è influenzato dalla permeabilità allo ione. Il gradiente elettrochimico è regolato dalla diversa concentrazione ionica fra esterno e interno della cellula. Ci sarà un potenziale al quale la forza elettrica dello ione bilancia esattamente la forza opposta del gradiente di concentrazione. Questo potenziale conosciuto come potenziale di equilibrio degli ioni è dato dall'equazione di Nernst:

per uno ione X

$$E_x = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

dove

E_x : potenziale di membrana

R : costante dei gas ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T : temperatura assoluta (in °K)

Z : carica dello ione

F: costante di Faraday (96500 C mol^{-1})

$[X]_o / [X]_i$: concentrazione, rispettivamente, esterna e interna dello ione X

assumendo $T = 20^\circ\text{C}$ (293°K)

$$E_x = \frac{-58}{Z} \log_{10} \frac{[X]_o}{[X]_i}$$

E_x viene espresso in mV.

A concentrazioni fisiologiche di K^+ interno (140 mM) ed esterno (5mM) il valore del potenziale di equilibrio del potassio sarà uguale a -84mV. Questo valore è vicino al potenziale di riposo (-60/100 mV) di molte cellule indicando che la loro permeabilità è determinata in buona parte dai canali selettivi del potassio.

Permeabilità e selettività

Non è solo il gradiente elettrochimico a far muovere uno ione attraverso un canale aperto ma questo dipende anche dalla permeabilità del canale allo ione. Uno dei fattori discriminanti è la grandezza del poro del canale e dello ione. All'interno del poro è presente una regione che funziona da filtro selettivo, e ciò dipende dagli amminoacidi da cui è formata. Un canale selettivo per cationi avrà all'interno del filtro selettivo residui amminoacidici con carica negativa che attirano i cationi e repellono gli anioni.

Correnti di "gating"

Il processo di transizione fra lo stato di apertura e chiusura di un canale è conosciuto come "gating". Alcuni canali si aprono casualmente a tutti i potenziali di membrana; il loro gating è detto voltaggio-indipendente. Se l'apertura o la probabilità che avvenga aumenta con il cambiamento del potenziale di membrana, essi sono detti voltaggio-dipendenti.

Canali che sono aperti ad un determinato potenziale, possono essere chiusi dal cambiamento di quest'ultimo o dal legame con un ligando. L'apertura di un canale può essere soggetta a modulazione da parte di sostanze intracellulari. La transizione fra apertura e chiusura avviene mediante cambiamenti conformazionali del canale, un esempio è il recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChR); sino a quando il ligando rimane legato il canale permane nel suo stato di apertura, solo dopo dissociazione del ligando il canale si chiude. In tali canali il ligando si lega ad un sito specifico presente nel canale, il legame provoca lo spostamento di gruppi amminoacidici con conseguente variazione conformazionale che allostericamente apre il poro.

Canali voltaggio-dipendenti

Al potenziale di riposo molti canali sono chiusi, cambiando il potenziale si ha una variazione conformazionale che risulta nell'apertura del poro. L'attivazione voltaggio-dipendente in qualche caso è seguita da una variazione conformazionale verso uno stato inattivato, in cui il canale non conduce.

Il recupero dall'inattivazione avviene dopo un periodo seguito dal ritorno al potenziale di riposo; durante questo intervallo temporale il canale probabilmente subisce una variazione conformazionale che lo fa ritornare al suo stato di chiusura; depolarizzazione e iperpolarizzazione possono attivare i canali.

L'attivazione voltaggio-dipendente richiede la presenza di un sensore di voltaggio che "sentendo" il cambiamento del potenziale attraverso la membrana risulta nell'apertura del canale.

Canali del K^+ voltaggio-dipendenti

I canali del potassio sono presenti in molti tipi cellulari, sono divisi dal punto di vista strutturale in due famiglie:

- a 6 domini transmembrana
- a 2 domini transmembrana

I canali formati da 6 domini transmembrana comprendono:

- Canali del voltaggio del potassio
- Canali KCNQ
- Canali EAG
- Canali del potassio-calcio attivati (BK, IK, SK)

Questi canali sono chiusi al potenziale di riposo ma si aprono in seguito a depolarizzazione, sono coinvolti nella ripolarizzazione del potenziale d'azione e nell'eccitabilità di cellule nervose e muscolari incluso il muscolo cardiaco. Regolano altresì la trasmissione sinaptica e la secrezione delle cellule endocrine (cellule cromaffini e β del pancreas). Mutazione dei geni codificanti i primi tre tipi di canale portano a varie patologie umane come atassia, sindrome del QT lungo ed epilessie.

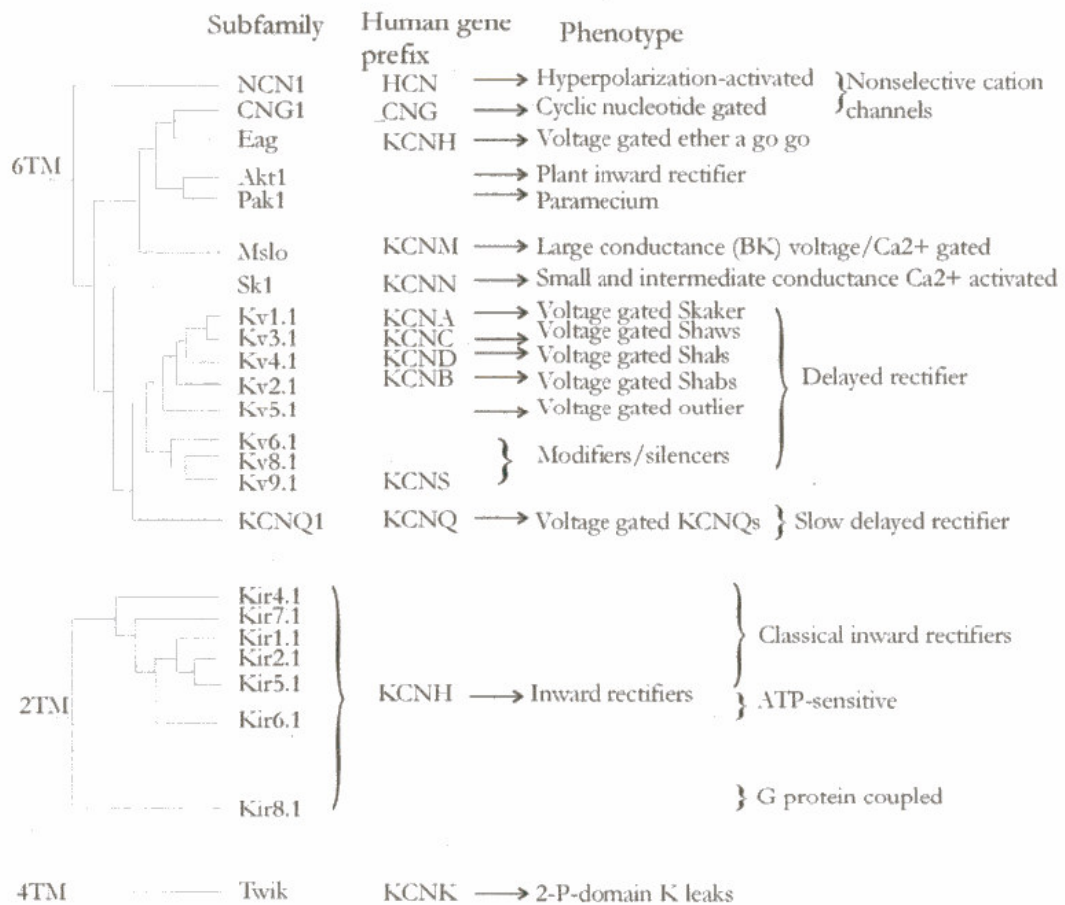


Fig. 1 Ramificazione dei canali del K⁺.

Canali Kv

I primi canali identificati provenivano dal clonaggio del gene Shaker in *Drosophila*, che causa movimenti anomali quando gli animali sono esposti a etere (Papazian et al., 1987). Dopo l'identificazione di Shaker, una nuova famiglia di canali è stata identificata da *Drosophila* le controparti di tali canali, nei mammiferi, sono note come Kv1, Kv2, Kv3 (Dolly and Parcej, 1996). Mutazioni a livello dei geni che codificano per i canali Kv, in particolare Kv_{1.1}, che si nota come espresso in numerosi neuroni (Wang et al., 1994), sono causa di atassia di tipo 1, caratterizzata da movimenti non coordinati. La mutazione è a carico di un residuo di valina (408) che si trova nella parte centrale del poro, a causa di tale mutazione l'inattivazione avviene in modo più rapido rispetto alla proteina non mutata. I canali del potassio voltaggio-dipendenti sono formati da subunità α , che possono associarsi con un numero di differenti tipi di subunità β . Quattro subunità α si associano per formare il poro del canale per il potassio, ogni subunità consiste di sei segmenti transmembrana (S1-S6), altamente conservati con residui ammino-terminale (N-terminale) e carbossi-terminale (C-terminale) di lunghezza variabile. Il segmento S4 è coinvolto nell'attivazione voltaggio-dipendente. Infatti questo dominio funge da sensore di voltaggio (Papazian, 1991), in risposta alla depolarizzazione si sposta verso l'esterno creando il cambiamento conformazionale che apre il poro e permettendo così il passaggio di corrente. Questi canali mostrano un'inattivazione lenta e una veloce. L'inattivazione veloce è dovuta alla porzione N-terminale (inattivazione di tipo N); l'inattivazione lenta è detta di tipo C perché coinvolge la zona C-terminale.

Canali KCNQ

I canali KCNQ hanno la caratteristica comune dei canali con 6 domini transmembrana; KCNQ1 è coinvolto nella ripolarizzazione del potenziale d'azione ventricolare, produce una corrente in uscita di K⁺ voltaggio-dipendente (IKs). In particolare tali canali sono espressi nel cuore, polmone, rene e placenta. Anche i canali KCNQ sono associati a patologie umane infatti mutazioni a carico di questi canali (KCNQ1) sono state trovate in una forma della sindrome del QT lungo, la forma di tipo 1 (LQT1). Sono stati clonati altri due geni appartenenti a questa famiglia, KCNQ2 e KCNQ3. Mutazioni a loro carico sono responsabili di una forma di epilessia idiopatica, conosciuta come BFNC (Benign Familial Neonatal Convulsion). Tali canali inducono una corrente (corrente M), che riveste un importante ruolo nel determinare l'eccitabilità di molti neuroni. Infatti i canali KCNQ2/KCNQ3 si attivano in seguito a depolarizzazione e la corrente che ne consegue iperpolarizza la membrana e pertanto

produce il ritorno del potenziale di membrana a valori vicini al potenziale di riposo, riducendo così l'eccitabilità neuronale. La corrente M ha le seguenti caratteristiche è inibita dall'attivazione dai recettori muscarinici dell'acetilcolina; non inattiva ed è una corrente "steady-state" a potenziale di membrana di -30mV, infine essa deattiva lentamente nella ripolarizzazione. Queste proprietà fanno sì che la corrente M abbia un impatto sensibile sull'eccitabilità neuronale, limitando la frequenza di scarica e riducendo la risposta neuronale a impulsi sinaptici.

Come detto sopra, la corrente M è inibita dall'inattivazione dei recettori muscarinici dell'acetilcolina (Browns and Adams.,1980). Quando la corrente M è "spenta" la risposta dei neuroni a impulsi sinaptici aumenta e l'eccitazione può produrre un treno di potenziali d'azione (bursts). Le popolazioni neuronali in cui è presente tale corrente è rappresentata da neuroni gangliari del simpatico e neuroni ippocampali. In questi ultimi, essa viene inibita da vari recettori, come quelli muscarinici, serotoninici e per gli oppiacei. Date tali caratteristiche non risulta sorprendente che mutazioni a loro carico siano causa di malattie di tipo epilettico come accennato sopra, infatti, a mutazioni di questi canali è associata una forma di epilessia detta BFNC. Tale patologia è caratterizzata da convulsioni neonatali che usualmente si presentano entro 3 giorni dalla nascita e mostrano remissione spontanea dopo il 3° mese di vita. Lo sviluppo neurocognitivo è normale ma è aumentato il rischio di epilessie (10-15% dei casi) nella vita adulta. In molte famiglie il gene responsabile per BFNC mappa nel cromosoma 20q13.3 ed è ereditato in maniera autosomale dominante, altro locus identificato si trova nel cromosoma 8q24.

Canali del K^+ attivati dal Ca^{2+}

Questi canali sono attivati da un aumento del calcio intracellulare. Si trovano in numerose cellule nervose di cui controllano i potenziali d'azione e ne regolano l'eccitabilità. Non ci sono evidenze su eventuali implicazioni di questi canali in patologie umane, qualche indicazione suggerisce che la piccola conduttanza di questi canali potrebbe contribuire alla distrofia miotonica.

Questi canali si distinguono in 3 tipi (BK, IK, SK), elettrofisiologicamente differenti a causa delle diverse conduttanze e della diversa sensibilità farmacologia e con differenti ruoli funzionali. Tali canali, K_{Ca} contribuiscono alla ripolarizzazione e alla AHP (*after-hyperpolarization*) delle cellule nervose.

Sono che distinguono La “*after-hyperpolarization*” è caratterizzata da due componenti: una veloce (1-2ms) ed una che si attiva più lentamente e persiste per qualche secondo. La AHP veloce regola l’intervallo fra “spikes” adiacenti, è mediata dai canali di potassio che si attivano in risposta a depolarizzazione e si chiudono appena dopo la ripolarizzazione. La componente lenta dell’AHP è mediata dai canali IK e SK, che si aprono in risposta ad un elevata concentrazione di calcio intracellulare a livello submembranario e rimangono attivi sino a che tale concentrazione persiste. Tale componente gioca un ruolo importante nel controllo della scarica cellulare e risulta importante nel fenomeno dello “*spike-frequency adaptation*” che avviene quando uno stimolo persiste. Nei neuroni corticali, i canali SK (per stimoli persistenti), rispondono all’entrata di calcio che avviene durante i potenziali di azione, la loro apertura iperpolarizza i neuroni ritardando il tasso di scarica dei potenziali di azione, innescando così il fenomeno dello “*spike-frequency adaptation*”. Tale fenomeno ha un ruolo importante nella segnalazione neuronale ed è usato come codice “frequenza-dipendente” per l’integrazione e la trasmissione dei segnali. Lo “*spike-frequency adaptation*” viene reso silente da vari neurotrasmettitori presenti nelle aree encefaliche, in conseguenza di stimolazione eccitatoria vengono rilasciate numerose monoamine fra cui noradrenalina, che fosforilando qualche subunità dei canali SK ne riduce l’attività e la corrente sI_{AHP} e conseguentemente l’ultima fase di adattamento. In conseguenza a quest’ultimo aspetto i neuroni sono resi più eccitabili essendo in grado di seguire le stimolazioni in ingresso.

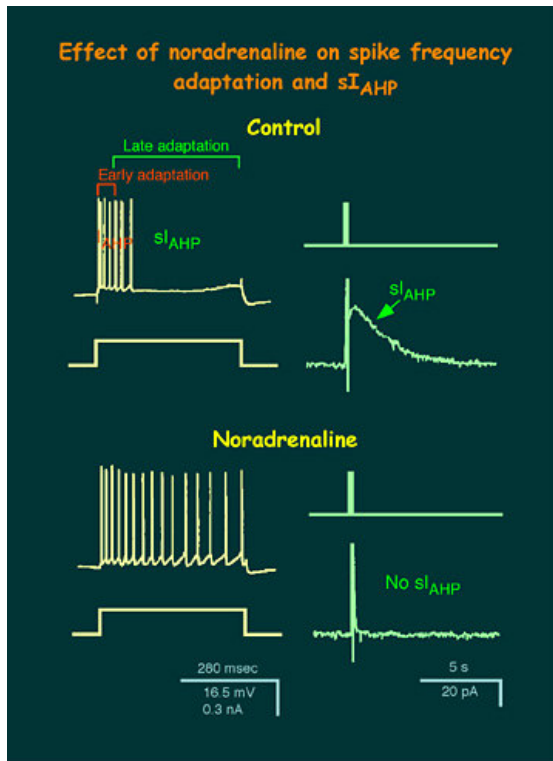


Fig. 2 “Spike frequency adaptation” (Pedarzani and Stocker., 2000)

Canali EAG

I canali EAG, ether-a-gò-gò, furono scoperti in mutanti di *Drosophila melanogaster* che, in presenza di etere, mostravano un’anomalo movimento delle zampe (Ganetsky and Wu.,1983). Il gene relativo codifica per un canale del K^+ voltaggio-dipendente distinto da *Shaker* (Warmke et al., 1991). Sono canali voltaggio-dipendenti a rettificazione in uscita (la conduttanza del canale non è costante ma aumenta con la depolarizzazione). Essi possiedono molte analogie strutturali con i canali ionici attivati da nucleotidi ciclici. Nella porzione carbossi-terminale, infatti, vi è la presenza di una regione omologa al dominio di legame per i nucleotidi ciclici (cNBD, cyclic nucleotide binding domain).

Tramite la tecnica della PCR, furono identificate tre sottofamiglie di canali note come EAG-*eag*, EAG-*elk* (EAG like K^+ channels) ed EAG-*erg* (EAG related K^+ channels) (Warmke and Ganetzky., 1994). Ciascuna famiglia a sua volta è rappresentata da più membri e da eventuali varianti di splicing, come mostrato in tab1.

Tab. I Composizione Famiglia EAG			
	<i>eag</i>	<i>erg</i>	<i>elk</i>
<i>membri</i>	<i>eag1, eag2</i>	<i>erg1, erg2, erg3</i>	<i>elk1, elk2, elk3</i>
<i>varianti di splicing</i>		<i>erg1: erg1, erg1b, erguso, erg1 buso</i>	

Struttura canali EAG

I canali EAG hanno struttura simile ai canali Shaker, sono formati da 6 domini transmembrana, con alta omologia nel segmento S4 e nel segmento P. Ciascun canale risulta costituito da un tetrametro avente 4 subunità proteiche disposte in maniera simmetrica attorno a un poro acquoso centrale che rappresenta il canale.

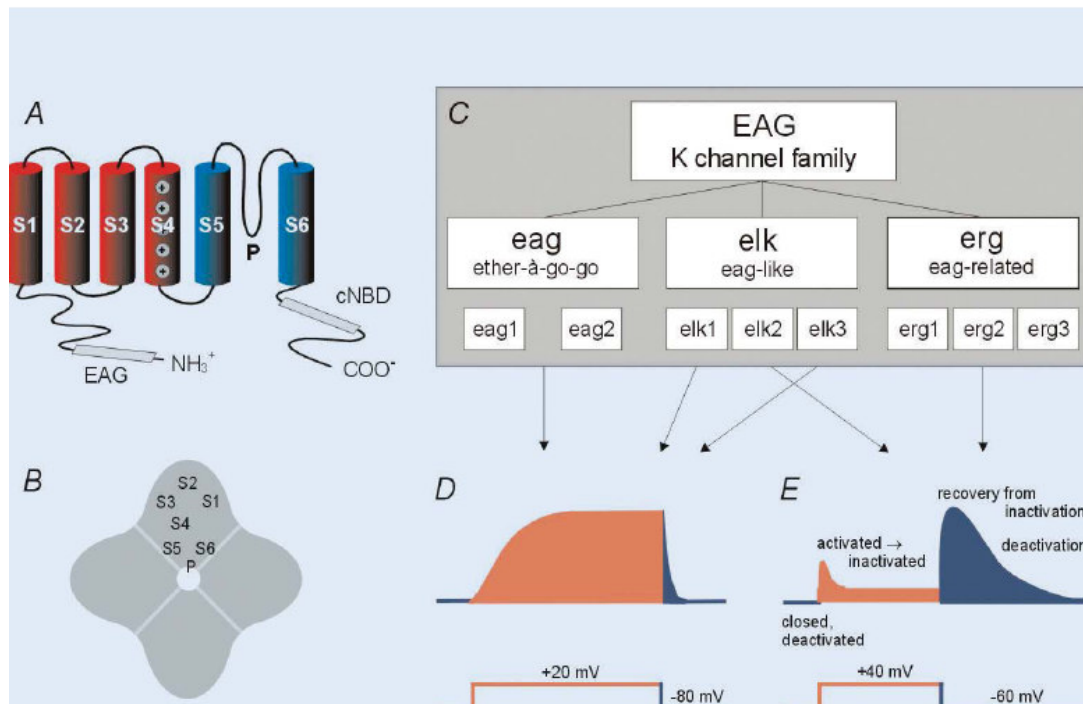


Fig. 3 *Struttura del canale hEAG (Scwarz and Bauer, 2003)*

Ciascuna subunità comprende una regione idrofobica, contenente i 6 motivi α -elica transmembranari (S1-S6) e una regione del poro denominata H5 detta anche regione P. La porzione importante per i canali voltaggio-dipendenti è rappresentata dal segmento S4 che è il sensore del voltaggio ed è responsabile della sensibilità del canale ai cambiamenti del potenziale di membrana. La regione del poro, conservata fra i membri della famiglia *eag*, è affiancata da due zone più variabili; rappresentate dai domini N- e C-terminale.

Le somiglianze strutturali con i canali Shaker, la bassa omologia con essi nel nucleo del poro idrofobico, la presenza di un dominio C-terminale intracellulare che contiene un sito di legame per i nucleotidi ciclici (cNBD), rendono le proteine codificate da *eag* una famiglia di canali del tutto nuova.

E' stato possibile caratterizzare il canale EAG, in seguito a espressione del c-DNA in oocita; oltre a presentare caratteristiche peculiari, come la rettificazione in uscita, è modulato dall'AMP ciclico e presenta caratteristiche funzionali intermedie fra quelle del gruppo Shaker (canali di K^+ voltaggio-dipendenti) e i canali attivati dai nucleotidi ciclici (Bruggemann et al., 1993).

I canali hERG

I membri della famiglia ERG

Il gene *herg* fu clonato da una "library" di c-DNA di ippocampo umano (Warmke and Ganetzky, 1994). Oltre ad *herg1*, la sottofamiglia di *erg* è costituita (uomo, ratto e topo) da altri due geni detti *erg2* ed *erg3*, clonati da encefalo di ratto (Shi et al., 1997); *erg2* codifica per un canale con caratteristiche biofisiche simili a quelle di ERG1, *erg3* codifica per un canale che genera una corrente che si discosta dalla $I_{(ERG)}$, mostrando una rettificazione in entrata meno pronunciata, dovuta ad una cinetica di attivazione e di deattivazione più rapida e ad una in attivazione più lenta; in questo modo a potenziali più depolarizzanti mostra una corrente transiente, anziché mostrarne una inattivante. Studi recenti hanno dimostrato che le subunità dei tre canali possono coassemblarsi formando eteromultimeri, questo non avviene con gli altri membri della famiglia *eag* (Wimmers et al., 2002).

Isoforme di *herg1*

Il gene *herg1* consta di 15 esoni, della lunghezza complessiva di 19 Kb e presenta un'analogia di sequenza del 49% con la famiglia dei canali *eag*, localizzati sul cromosoma 7. Sono state identificate isoforme relative a questo gene, in particolare all'estremità N-terminale (*herg1b*), C-terminale (*herg1uso*) e in entrambe (*herg1buso*).

L'isoforma detta USO è stata clonata da una "library" di c-DNA di ventricolo umano (Kupersmidt et al., 1998), rispetto ad *herg1* gli esoni "9-15" sono rimpiazzati da un singolo esone (USO) che codifica per 88 amminoacidi. Studi su cellule transfettate hanno dimostrato come questa isoforma quando espressa non sia in grado di dare canali funzionali, ma alteri le caratteristiche della $I_{(HERG)}$ quando è coespressa con la proteina "wild type".

L'altra variante di splicing, *herg1b*, clonata da una "library" di c-DNA di cuore di topo è caratterizzata da una porzione N-terminale più corta e ricca in amminoacidi basici rispetto a *herg1* (London et al., 1997). Tale porzione è codificata da un singolo esone "1b" che rimpiazza gli esoni "1-5" del gene wild type e genera una porzione N-terminale di soli 36 amminoacidi. Nella regione a monte di *herg1b* si trova un sito promotore di inizio trascrizione, vi è pertanto la possibilità che *herg1b* rappresenti un trascritto alternativo più che una variante di splicing (Lees-Miller et al., 1997). La corrente che essa produce consiste dei processi di attivazione e di deattivazione più rapidi della $I_{(HERG)}$ (Lees-Miller et al., 1997); le due isoforme proteiche ERG1 e ERG1b sembrano coassemblare nel cuore (Jones et al., 2006) ciò spiegherebbe il motivo per cui la $I_{(Kr)}$ cardiaca presenta proprietà biofisiche intermedie tra le due isoforme (London et al., 1997).



Fig.5. Varianti di splicing del gene *erg1*

hERG

La proteina hERG mostra le stesse caratteristiche strutturali dei canali EAG. In particolare, la regione N-terminale di *herg1* consiste di 390 amminoacidi ed è costituita da due domini:

- Il dominio PAS che si estende sino all'amminoacido 135, è altamente conservato tra i membri della famiglia EAG, ed è comune (sia in eucarioti che procarioti) a varie proteine con funzioni diverse come le "clock proteins" (coinvolte nella regolazione dei ritmi circadiani), proteine sensibili all'ossigeno ed allo stato redox della cellula (Taylor and Zhulin., 1999). In seguito a vari studi è stato ipotizzato che il dominio N-terminale svolga un ruolo di primaria importanza nel regolare il processo di attivazione ed inattivazione; oociti di *Xenopus* sono stati transfettati con la copia "wild type" di *herg1* e con il gene, mutato, mancante del dominio PAS: in quest'ultimo caso si è visto un notevole incremento della velocità di deattivazione del canale, che reverte quando negli stessi oociti è iniettato il dominio deleto purificato da E. Coli.
- Il dominio prossimale che comprende la regione fra il residuo 135 ed il segmento S1. Tale dominio è specifico di hERG; non è nota la sua struttura tridimensionale, mentre si hanno indicazioni sul suo significato funzionale: infatti mutazioni a livello di questa regione sono causa del cambiamento delle proprietà biofisiche del canale; la sua delezione provoca un aumento della velocità di attivazione (Viloria al., 2000).

Il segmento C-terminale porta i domini per i nucleotidi ciclici che hanno azione modulatoria, per tale motivo la famiglia *eag* nel percorso evolutivo si colloca tra i canali del potassio voltaggio-dipendenti ed i canali attivati dai nucleotidi ciclici (cAMP, cGMP); ci sono analogie fra i due tipi di canale che potrebbero giustificare una loro derivazione da una stessa superfamiglia (Jan and Jan., 1992)

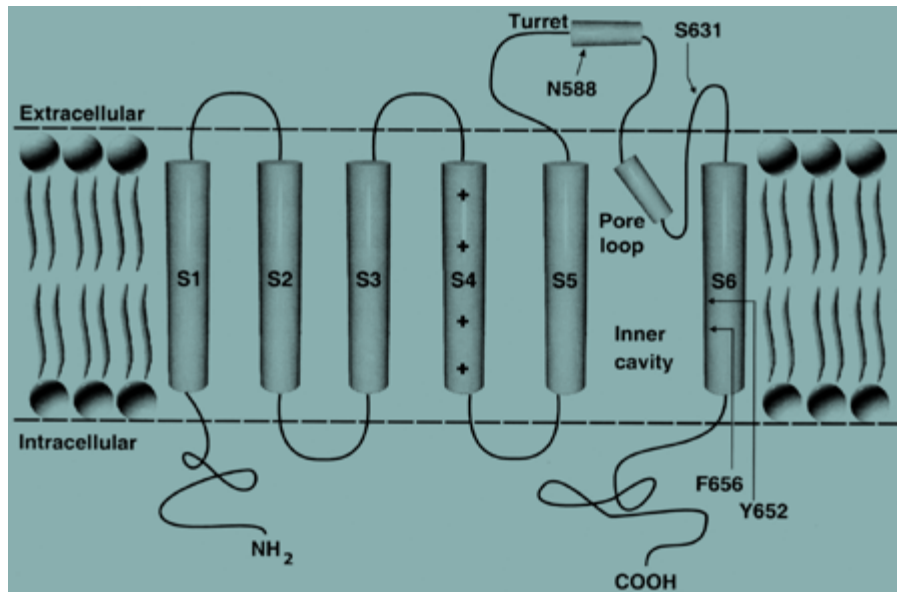
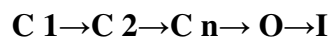


Fig. 4. *Struttura di hERG*

Caratteristiche biofisiche dei canali ERG

Pur essendo ERG strutturalmente analogo ai membri della famiglia EAG, con un grado di omologia nella regione del poro del 49% circa, esso presenta delle caratteristiche biofisiche che lo rendono peculiare rispetto agli altri canali del K⁺ a 6 domini transmembrana. Queste caratteristiche sono rappresentate normalmente da un processo di attivazione dipendente dalla concentrazione esterna di K⁺ (Sanguinetti et al., 1995) e da una forte rettificazione in entrata (forti correnti d'ingresso in corrispondenza di valori di V_m iperpolarizzati). Quest'ultimo fenomeno sembra essere legato ad un processo di rapida in attivazione. Il canale ERG presenta una cinetica complessa, che passa attraverso stadi di apertura, chiusura, in attivazione, deinattivazione, che possono essere schematizzati nel modo seguente:



Lo stato chiuso C1 si ha a valori di potenziale negativi; stimoli depolarizzanti permettono l'apertura del canale che passa dallo stato chiuso a quello aperto (C→O), attraverso variazioni conformazionali. In tali condizione il canale è regolato da un processo voltaggio-dipendente, che ne determina il passaggio dallo stato aperto ad uno inattivato diverso dallo stato chiuso (O →I); il processo inverso viene definito deinattivazione. Il canale

conduce corrente solo quando sono realizzate le condizioni di voltaggio di membrana che lo dispongono nello stato aperto-deinattivato. Il voltaggio al quale è permessa la transizione ($C \rightarrow O$) non coincide con quello che determina la transizione ($O \rightarrow I$) per cui, variando v , le percentuali dei canali nello stato aperto e inattivato variano in maniera indipendente.

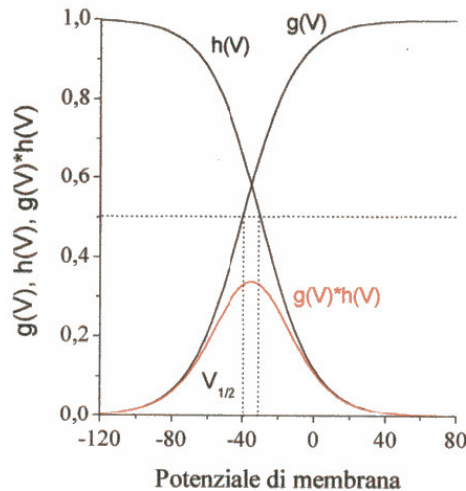


Fig. 6 Curve di attivazione e in attivazione di ERG

In fig. 6 sono rappresentate le curve di attivazione ($g(V)$) e di inattivazione ($h(V)$) voltaggio dipendenti. Depolarizzandosi il potenziale da -120 mV verso valori positivi, ($g(V)$) aumenta mentre ($h(V)$) decresce. In figura, l'area sottostante l'incrocio delle due curve rappresenta la frazione di canali che sono contemporaneamente aperti e attivi; infatti, mentre a potenziali positivi i canali sono sempre più aperti ma contemporaneamente più inattivati, a potenziali negativi i canali si trovano nello stato deinattivato, ma chiuso. A causa di queste caratteristiche, a valori negativi di potenziale il canale è chiuso ed in seguito ad uno stimolo depolarizzante cambia conformazione passando allo stato aperto. In questa situazione la corrente in uscita è esigua a causa dello stato di inattivazione che si instaura rapidamente. Con la ripolarizzazione, l'inattivazione viene rimossa ed il canale ancora aperto ($I \rightarrow O$) conduce ancora corrente, finché ritorna nello stato chiuso iniziale ($O \rightarrow C$), al termine di un processo di deattivazione, quando il potenziale di membrana raggiunge valori più negativi di -40 mV (Trudeau et al., 1995).

La rettificazione in entrata è il risultato di un meccanismo di inattivazione molto rapido che riduce la corrente in uscita evocata dalla depolarizzazione: la ripolarizzazione rimuove

l'inattivazione determinando la fase ascendente di cospicue correnti di "coda", la cui fase iniziale rispecchia il processo di deinattivazione, mentre il suo successivo decadimento è dovuto alla deattivazione.

I meccanismi di attivazione ed inattivazione di HERG sono stati analizzati anche da un punto di vista molecolare, si è visto che l'inattivazione del canale non è di tipo "N" (come avviene per i canali di tipo Shaker), in cui la porzione intracellulare N-terminale va ad occludere il poro ("ball and chain"), ma è di tipo "C" ed avviene con variazione conformazionale a livello della porzione esterna del poro (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; Yellen et al., 1994).

Caratteristiche farmacologiche dei canali ERG

E' noto che gli antiaritmici esercitano, con diversa efficienza, un effetto bloccante su ERG (Jurkiewicz et al., 1996); per tale proprietà sono utilizzati nell'identificazione della $I_{(ERG)}$ e per isolarla da altre correnti presenti in tessuto o nei diversi preparati. Tra gli inibitori di ERG vi sono gli antiaritmici di classe III, in particolare: Way123,398 (Spinelli et al., 1993), E4031 (Trudeau et al., 1995), che induce inibizione bifasica sui complessi MIRP1/HERG, dofetilide (Kiehn et al., 1996), d-sotalolo (Snyders and Chaudhary, 1996), RP58866 e il suo enantiomero attivo terikalant (Jurkiewicz et al., 1996), clofilium e il suo analogo LY97241, amiodarone (Kiehn et al., 1999). Un antiaritmico con proprietà comprese fra quelle di classe III e IV (BRL-32872) esercita azione bloccante il canale (Karle et al., 2002).

I canali HERG sono bloccati da altri farmaci come gli antistaminici (terfenadine, agenti pro-cinetici gastrointestinali (cisapride), psicofarmaci (aloperidolo, amitriptilina, tioridazina) e alcuni antimicrobici come gli antibiotici macrolidici e l'agente antimalarico halofrantine (Vandenberg et al., 2001).

Espressione del canale ERG nel sistema nervoso

Importanti studi sono stati condotti al fine di valutare il profilo di espressione dei geni *erg* nel sistema nervoso di topo e di ratto. Gli studi sono stati effettuati sia su tessuti embrionali che adulti. I dati al riguardo hanno mostrato che, nel ratto, l'm-RNA di *erg1* si esprime a livello cardiaco, neuronale (sia nel sistema nervoso centrale che nei gangli simpatici del sistema periferico) e in certi tessuti quali timo, surrene, ipofisi testicolo e retina. Gli altri

geni della sottofamiglia (*erg2*, *erg3*) sono esclusivamente espressi a livello dei tessuti neuronali (Shi et al., 1997; Saganich et al., 2001; Papa et al., 2003; Guasti et al., 2005).

Gli studi condotti da Saganich nel 2001 mediante ibridazione *in situ* (ISH), hanno rilevato, principalmente l'espressione di *r-erg1* e *r-erg3* si osserva in diverse aree del sistema nervoso di ratto adulto, mentre l'espressione di *r-erg2* è confinata alla regione del bulbo olfattivo (Tab. 2).

Tali studi, in particolare, hanno evidenziato come i geni *erg1* ed *erg3* siano abbondantemente espressi in varie zone del sistema nervoso, quali bulbi olfattivi e il talamo reticolare (dove *erg1* mostra una forte espressione nella zona dorsale). I due trascritti si ritrovano, inoltre, nella corteccia cerebrale dove, l'espressione di *erg1* è più debole rispetto all'altro trascritto *erg3*. Quest'ultimo risulta espresso abbondantemente negli strati molecolari soprattutto a livello del II e III strato di cellule con morfologia piramidale. Nel cervelletto l'espressione si trova nei neuroni di Purkinje e nei granuli dove l'espressione di *erg3* è più debole. Infine nell'ippocampo, l'espressione sembra ristretta allo strato di cellule piramidali dell'area CA1, dove è marcata la presenza di *erg1* negli interneuroni inibitori. A differenza dei risultati trovati da Saganich, i risultati ottenuti da Polvani et al. lo rilevano, oltre che nei bulbi olfattivi, anche a livello dei neuroni degli strati II e IV della corteccia cerebrale, delle Purkinje e dei neuroni inibitori del Golgi del Cb, nei nuclei pontini, nel collicolo inferiore e nel talamo.

Questi dati sono in accordo anche con quanto ottenuto dallo studio condotto da Papa et al. (2003) sull'encefalo di ratto adulto, ma in aggiunta quest'ultimi autori individuano anche una certa marcatura relativa a *m-erg2* nella regione dell'ippocampo. Inoltre, sia Polvani et al. che Papa et al. rilevano una marcatura consistente relativa a *erg3* a livello del giro dentato: tale marcatura non era invece stata rilevata da Saganich et al.

	<i>r-erg1</i>	<i>r-erg2</i>	<i>r-erg3</i>
Telencefalo			
Bulbo olfattivo			
cellule dello strato granulare	++	-	++
cellule dello strato mitrale	++	++	++
Strato periglomerulare	++	++	++
corteccia piriforme	+	-	+
nucleo anteriore olfattivo	-	-	++
tubercolo olfattivo	-	-	
corteccia cerebrale			
Strato II	+	-	+++
Strato III	+	-	+++
Strato IV	+	-	+
Strato V	+	-	++
Strato VI	+/-	-	+
interneuroni inibitori	+++	-	-
Ippocampo			
cellule piramidali			
CA 1	++	-	+++
CA 2	-	-	-
CA 3	-	-	-
Giro dentato	++	-	-
interneuroni inibitori	++	-	+/-
Septum			
Diencefalo			
gangli basali			
caudato/putanem	int	-	+/-
accubens nucleus	-	-	-
globus pallidus	+	-	-
Talamo			
nucleo genicolato mediale	++	-	++b
complesso talamico ventrale			
posteriore	++	-	+/-
DLG	++	-	+/-
nucleo talamico reticolare	+++	-	++
Abenula			
Nucleo mammillare	++	-	-
Amigdala	+	-	+
Ipotalamo	++	-	+/-



Mesencefalo			
collicolo superiore			
suG	+	-	++
inG	+	-	++
collicolo inferiore			
	+++	-	+
sostanza nera			
parte reticolata	+f	-	-
parte compatta	++	-	-
nucleo laterale leminiscus			
	+++	-	+++
nucleo tegmentale ventrale			
	+++	-	-
nucleo di Raphe			
	+++	-	++
Nucleo grigio centrale			
	+	-	+
nucleo rosso			
	+++	-	-
nucleo oculomotorio			
	+++	-	-
Hindbrain			
Cervelletto			
strato dei granuli			
	++	-	-
Strato molecolare			
	-	-	-
cellule del Purkinje			
	+++	-	++
Nuclei profondi			
	+++	-	+
nuclei pontini			
	+++	-	-
Oliva superiore			
	++	-	+
nucleo vestibolare			
	+++	-	-
nucleo cocleare dorsale			
	+++	-	-
nucleo cocleare ventrale			
	+++	-	-
nucleo facciale			
	+++	-	-
nucleo trigemino spinale			
	+++	-	+
nucleo gracile			
	+++	-	++
nucleo cuneato			
	+++	-	++
Nucleo motorio dorsale vago			
	+	-	++
nucleo reticolare a cellule giganti			
	+++	-	+/-
nucleo dell'ipoglosso			
	++	-	-
nucleo reticolare laterale			
	+++	-	++
Oliva inferiore			
	+++	-	++

Tab. 2. *Espressione di m-erg1, m-erg2, m-erg3 nel sistema nervoso di ratto.* I dati rappresentano esperimenti di IHC e NR-ISH, i segnali sono riferiti in base al livello di espressione come: +++ alto; ++ medio; + basso; +/- non rilevabile; - non presente (Saganich et al., 2001)

Nel lavoro di Polvani et al., l'espressione dei geni *erg* è stata indagata anche durante lo sviluppo embrionale di topo e comparata con quella nel topo adulto. L'espressione di *erg* è stata valutata negli stadi precoci dell'embriogenesi (ai giorni di gestazione E9.5, E11.5, E13.5), mediante esperimenti di ibridazione *in situ* (whole mount) e sia su sezioni che su embrione intero. Allo stadio E9.5 è stata rilevata l'espressione di *m-erg1* nel cuore in sviluppo, nelle vescicole encefaliche e nel midollo spinale. A questo stadio dello sviluppo sono presenti anche *m-erg2* e *m-erg3* la cui espressione si localizza solo nelle vescicole encefaliche e nel midollo spinale. A E11.5 il profilo di espressione dei tre geni rimane invariato, in questo arco temporale *m-erg1* risulta espresso a livello delle sporgenze ectodermali apicali degli abbozzi degli arti. A E13.5 l'espressione dei geni è più forte e diffusa: *m-erg1* è presente in varie aree comprese quella del ponte, nel midollo allungato, negli abbozzi del cervelletto, nel mesencefalo, nella neocortex e nel rinencefalo. L'espressione è estesa a anche al midollo spinale, ai gangli delle radici dorsali; *m-erg2* appare espresso in varie zone sovrapponibili a quelle in cui sono espressi *m-erg1* e *m-erg3*, sebbene con un più limitato tipo di distribuzione spaziale.

L'espressione di *m-erg3* è simile a quella di *m-erg1*, ed è interessante notare la sua espressione nel cuore sia a livello atriale che ventricolare. E' motivo di interesse notare come l'espressione dei tre geni sia colocalizzata negli stadi precoci di sviluppo (E9.5- E11.5) per poi differenziarsi più tardi (E13.5).

Uno studio successivo (Tab. 3), condotto utilizzando sia tecniche di immunostochimica che di ibridazione *in situ* su encefalo di topo adulto (Guasti et al., 2005), ha permesso di chiarire la distribuzione regionale delle proteine ERG (ERG1A, ERG1B, ERG2, ERG3). Inoltre, mediante ibridazione *in situ* è stata resa possibile la discriminazione fra le due isoforme di *erg1* (*1a-1b*). Le proteine ERG siano espresse in tutto il sistema nervoso con uno specifico profilo di espressione. Un risultato inaspettato è emerso da questo studio: la forte espressione dell'isoforma ERG1B della proteina ERG1. Tale espressione avviene sempre in presenza di ERG1A, a dimostrazione che le due isoforme coassemblano nel sistema nervoso (come dimostrato a livello cardiaco ed in tumori umani (Crociani et al., 2003)).

I dati di espressione nel topo adulto ricalcano quelli visti da Saganich et al.(2001) e Papa et al.(2003) nel ratto, anche se qualche differenza nel profilo di espressione risulta presente ed è probabilmente una differenza specie-relativa. Alcune differenze si trovano per le proteine ERG1 ed ERG3 nella neocortex, inoltre le due proteine mostrano alta espressione

nelle aree ippocampali. L'espressione di *m-erg2* è ristretta al bulbo olfattivo, paleocortex, ippocampo e cervelletto. La coespressione delle proteine ERG in numerose aree encefaliche potrebbe essere spiegata nella formazione di complessi eterotetramerici. L'alta espressione in ippocampo non è ancora chiara dal punto di vista funzionale dato che le popolazioni esprimenti ERG mediano vie segnalatorie eccitatorie ed inibitorie. Un ulteriore interesse è dato dalla presenza dei canali ERG nei dendriti dei neuroni piramidali, in cui la presenza di altri canali voltaggio-dipendenti del Na⁺, Ca⁺ e i Kv, le loro conduttanze sono alla base dei meccanismi della propagazione del potenziale di azione (back-propagation) e del potenziamento a lungo termine (Johnston et al., 2003).

	pan- ERG1	ERG1A	ERG1 B	ERG 2	ERG3	erg1a	erg1b
<i>Forebrain</i>							
Olfactory bulb:							
Glomerular layer	++	++	++	-	++	++	++
Mitral cell layer	+++	++	+++	++	+++	++	+++
Granular cell layer	++	++	++	-	+/-	++	++
Ant olfactory nucleus	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
Accessory olfactory bulb	++	++	++	+	++	++	++
Paleocortex:							
Piriform cortex	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
Olfactory tubercle	++	++	++	++	++	++	++
Basal ganglia							
Medial septal nucleus	++	++	++	+	++	+	++
Lateral septal nucleus	++	+	+/-	-	+	++	+
Diagonal band nucleus	++	++	++	-	++	++	++
Nucleus accumbens	+	+	+	+	+	+	+
Caudate-putamen	+	++	+	+ sp	+	++	++
Globus pallidus	+	+	+	+	++	++	++
Subthalamic nucleus	++	++	++	+	++	++	++
<i>Hippocampus:</i>							
Dentate gyrus	++	++	++	+/-	+	+++	++
Pyramidal cells CA1	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Pyramidal cells CA2	++	++	++	+/-	+++	+++	++
Pyramidal cells CA3	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
Hilar interneurons	+++	+++	+++	+/-	+++	+++	+++
Subiculum	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
Stratum radiatum	+	++ sp	++ sp	+ sp	++ sp	+	++
Stratum oriens	+	++ sp	++ sp	+ sp	++sp	+	++
Stratum Lac-Mol	+ sp	++ sp	++sp	+ sp	+ sp	+	++
Fimbria	++ sp	++ sp	++sp	+/- sp	+ sp	+ sp	+ sp
Neocortex (M1):							
L1	+	+	-	-	-	++	-
L2	++	++	++	+/-	++	++	+
L3	++	++	++	-	++	-	+
L4	+	+	+/-	-	++	-	+
L5	+++	+++	+++	++ sp	++	++	+++
L6	+	+	+	+/-	+	+	+/-
Neocortex (V1):							
L1	+	+	-	+/-	-	-	-
L2	+	++	++	+/-	++	+	++
L3	+	++	++	+/-	++	++	++
L4	+/-	+/-	+/-	+/-	++	+/-	+/-
L5	+++	+++	+++	+ sp	+++	++	++
L6	++	++	+/-	-	+	+	++
Neocortex (S1):							
L1	+	+	-	+/-	-	-	-
L2	++	++	++	+/-	++	++	++
L3	++	++	++	+/-	++	++	++
L4	++	+ sp	+/-	+/-	++	+	+/-

L3	+++	++	+++	+ sp	+++	+++	+++
L6	+	+	+/-	-	+/-	+	+/-
<i>Neocortex (insula):</i>							
L1	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
L2	++	++	++	+/-	++	++	++
L3	++	++	++	+/-	++	++	+++
L4	-	+/-	+/-	+/-	++	+/-	++
L5	++	++	+++	+ sp	++	++	+++
L6	++	+	+/-	+/-	++	++	++
<i>Neocortex (acustic):</i>							
L1	+	+	-	+/-	+/-	-	-
L2	+	++	+	+/-	++	+	+
L3	+	+	+	+/-	++	+	+
L4	+	+	-	+/-	++	+	-
L5	++	++	+	+ sp	+++	++	++
L6	++	++	-	-	-	++	++
<i>Thalamus:</i>							
Reticular nucleus	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Ventr. Post. Complex	++	+	++	+/-	++	++	++
Medial Geniculate nuclei	++	++	++	+	++	++	++
<i>Hypothalamus</i>							
Hypothalamus	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
Amygdala	++	++	++	+/-	+++	++	++
Diagonal Band n.	++	++	++	+/-	++	++	++
Habenula	++	++	++	+/-	++	++	++
<i>Midbrain, pons, medulla and spinal cord</i>							
Superior colliculus	+	+	+	+/-	+	+	+
Inferior colliculus	+	+	+	-	+	+	+
Subst. nigra pars compacta	++	++	++	+	++	++	++
Subst. nigra pars reticulata	++	++	++	+	++	++	++
Nucleus lateralis lemniscus	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Raphe nucleus	++	+	++	+	++	++	++
Central grey	++	+	+	+/-	+	+	+
Red nucleus	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Oculomotor nucleus	++	++	++	++	++	++	++
Pontine nucleus	++	++	+++	+	+++	++	+++
Superior olive	+++	++	++	+	++	++	++
<i>Vestibular nuclei</i>							
Lateral vestibular nucleus	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
Medial vestibular nucleus	++	++	++	+	+++	+++	+++
Sp. vestibular nucleus	++	++	++	+	+++	++	+++
Superior vestibular nucleus	+++	++	++	+	++	++	++
Cochlear nucleus ventral	++	++	++	+	+++	++	++
Cochlear nucleus dorsal	++	++	++	+/-	++	++	++
Facial nucleus	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
Trigeminal nucleus	++	++	+++	++	+++		
Cuneate nucleus	++	++	++	-	++	++	++
Dors. mot. nucleus vagus	++	++	+++	++	++		
Gigantocell. ret. nucleus	+++	++	+++	++	++	++	+++
Hypoglossal nucleus	++	++	+++	++	++	++	++
Lateral reticular nucleus	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
<i>Inferior olive</i>							
Inferior olive	++	++	+	++	++	++	++
Trapezoid body nucleus	+++	++	++	++	+++	++	++
<i>Spinal Cord</i>							
Spinal Cord	+++	+++	+++	++	++	ND	ND

Tab. 3. *Espressione di m-erg1, m-erg2, m-erg3 nel sistema nervoso di topo.* I dati rappresentano esperimenti di IHC e NR-ISH, i segnali sono riferiti in base al livello di espressione come: +++ alto; ++ medio; + basso; +/- non rilevabile; - non presente (Guasti et al., 2005).

Espressione di *erg* in cellule eccitabili

Omologhi dei geni *erg* sono stati identificati nell'uomo e in altre specie animali. Numerosi dati dimostrano l'elevata espressione di ERG nel cuore in tutte le specie animali studiate. Le peculiarità della corrente $I_{(HERG)}$, che la rendono simile alla corrente $I_{(K_r)}$ cardiaca, hanno portato ad ipotizzare un suo contributo ad essa (Sanguinetti et al., 1995). Nei miociti atriali e ventricolari la $I_{(K_r)}$ ha un ruolo importante nella ripolarizzazione del potenziale d'azione cardiaco e nella formazione del plateau, durante la fase di plateau in conseguenza delle proprietà di rettificazione in entrata, la I_{K_r} ha solo una piccola ampiezza. Continuando la fase di ripolarizzazione, si verifica un transiente incremento della corrente in uscita del canale ERG, dovuto al rapido recupero dall'inattivazione e al lento processo di deattivazione; sia la I_{ERG} che la $I_{(K_r)}$ (corrente cardiaca rettificatrice in entrata) ripolarizzano il potenziale d'azione (Hancox et al., 1998). In seguito ad esperimenti è stato dimostrato che farmaci bloccanti la $I_{(K_r)}$ hanno azione inibitoria anche sulla $I_{(ERG)}$, questo ha suggerito che *erg* codificasse per almeno una delle subunità che formano il canale ionico responsabile di tale corrente, assemblandosi con qualche subunità accessoria dando la $I_{(K_r)}$ nativa (Sanguinetti et al., 1996).

Studi successivi hanno portato alla identificazione di MIRP1 ("MINK-related-peptide-1") (peptide di 153AA, costituito da un solo segmento transmembrana) quale possibile subunità accessoria che coassembla con ERG e ne regola l'ampiezza della corrente (Abbott et al., 1999). Gli effetti di MIRP1 sull'attivazione, deattivazione e la risposta a variazioni esterne del K^+ , producono un andamento corrente-voltaggio (I/V) un po' diverso rispetto a quello prodotto dai canali costituiti dal solo hERG.

L'ipotesi del coinvolgimento di HERG e di subunità accessorie nella fisiologia cardiaca è rafforzata dalla dimostrazione che mutazioni puntiformi a carico di HERG e di proteine associate sono correlate ad un particolare tipo di aritmia, la "Sindrome del QT lungo tipo 2" in cui il potenziale di azione cardiaco risulta allungato. Sono state identificate anche tre mutazioni "missense" a carico del gene MIRP1, e anch'esse potrebbero avere un ruolo nell'insorgenza di tale sindrome (Abbott et al., 1999). Nel loro insieme questi dati confermano che la patologia può essere causata dall'eredità di una subunità mutata del canale, con la risultante capacità di ridotta ripolarizzazione cardiaca.

La I_{ERG} è stata caratterizzata anche in altri tipi di cellule eccitabili come cellule neuroendocrine, cellule di neuroblastoma, neuroni di Purkinje, DRG e cellule muscolari. In queste cellule la I_{ERG} partecipa alla funzione di corrente soglia, regolando l'eccitabilità

cellulare. E' stato dimostrato che la corrente ERG regola il "firing" in cellule endocrine di mammifero, modulandone la secrezione ormonale. Il primo dato, in questo senso, è stato ottenuto su cellule β -pancreatiche umane, dove la $I_{(hERG)}$ regola la secrezione di insulina (Rosati et al., 2000). Inoltre la $I_{(hERG)}$ regola l'adattamento della frequenza di "spike" in neuroni di neuroblastoma (Chiesa et al., 1997). ERG inoltre prende parte al mantenimento del potenziale di riposo in cellule della muscolatura liscia, fra cui quelle di esofago, stomaco, colon (Akbarali et al., 1999; Ohya et al., 2002; Shoeb et al., 2003). In cellule embrionali disgiunte da creste neurali di quaglia la $I_{(ERG)}$ è presente nei primi stadi di differenziamento, mentre viene sostituita da una classica corrente di K^+ in entrata. Questi dati indicano una funzione della $I_{(ERG)}$ nei primi stadi di differenziamento.

Come detto sopra, un primo lavoro volto a chiarire lo specifico ruolo di hERG nel controllo dell'eccitabilità di membrana e nella regolazione del profilo di scarica nel SNC è stato realizzato da Chiesa et al. (1997) su cellule ibride di neuroblastoma/DRG (F11) indotte a differenziare mediante prolungata esposizione all'acido retinoico (come visto da Platika et al.: 1985). Da questi studi è emerso il coinvolgimento di hERG sia nell'adattamento della frequenza dei potenziali d'azione durante prolungate depolarizzazioni di membrana (ovvero il decremento progressivo della frequenza dei potenziali d'azione), sia nella iperpolarizzazione di membrana in seguito a stimoli depolarizzanti. Infatti, in tali cellule il trattamento con WAY123,398 specifico bloccante della $I_{(ERG)}$ provoca un annullamento sia della capacità di adattamento durante prolungate depolarizzazioni, sia della iperpolarizzazione al termine degli impulsi.

La $I_{(ERG)}$ è stata inoltre caratterizzata nei neuroni di Purkinje di topo (Sacco et al., 2003). In particolare, in tale studio sono state analizzate Purkinje cerebellari sia di topo immature (stadio P5) che in età adulta. In cellule immature (P5) la $I_{(ERG)}$ non contribuisce in modo rilevabile al potenziale di riposo, non partecipando alla ripolarizzazione dei potenziali di azione, evocati da una stimolazione depolarizzante. A causa di una lenta cinetica di attivazione sono necessarie scariche ripetute per assoldare un numero di canali sufficiente che contribuiscono alla ripolarizzazione di membrana. I neuroni di Purkinje, allo stadio immaturo, scaricano con un singolo potenziale d'azione anche in risposta a lunghi stimoli depolarizzanti.

Nei neuroni adulti la $I_{(ERG)}$, ha un ruolo fondamentale nel controllo della frequenza di scarica dei potenziali di azione: infatti il suo blocco, sempre ottenuto con l'aggiunta di WAY 123,398, causa una riduzione della latenza del primo potenziale e il mancato adattamento della

frequenza di scarica. Tali dati suggeriscono che, quando questi neuroni sono depolarizzati, i canali ERG nello stato aperto inibiscano l'eccitabilità di membrana evitando, la formazione di "bursts" o di treni di potenziale (Schonerr et al., 1999).

E' stato dimostrato nei neuroni di Purkinje, come la $I_{(ERG)}$ sia in grado di influenzare la scarica dei potenziali complessi. I potenziali complessi evocati nei neuroni di Purkinje sono coinvolti nel controllo dei movimenti, il blocco della corrente ERG in presenza di Way 123,398 diminuisce la latenza del primo potenziale d'azione, aumenta la frequenza di scarica e sopprime l'adattamento di quest'ultima; tuttavia, la forma del singolo potenziale di azione non risulta modificata dimostrando come tale corrente possa contribuire all'elaborazione del segnale implicata nel controllo motorio. Il potenziale complesso è causa di un aumento della concentrazione di Ca^{+2} a livello intradendritico, che risulta indispensabile per lo stabilirsi della plasticità sinaptica a lungo termine (LTP) (Ito., 2001). La modulazione che la corrente ERG esercita sul potenziale complesso è probabilmente capace di influenzare l'induzione di tale plasticità, rendendo la $I_{(ERG)}$ un'importante fattore sia a livello di modulazione della plasticità sinaptica che nel processamento degli stimoli nervosi.

Studi più recenti hanno dimostrato l'espressione transiente di ERG in colture organotipiche embrionali ottenute da midollo spinale di ratto (Furlan and Guasti et al., 2005) In questo modello sperimentale la $I_{(ERG)}$ sembra essere coinvolta nella modulazione dell'eccitabilità degli interneuroni GABAergici (Furlan et al., 2007).

In particolare, in colture organotipiche di midollo spinale murino tutti i geni della famiglia *erg* sono risultati espressi dopo 1 e 2 settimane di colture *in vitro*. Le proteine ERG1A, ERG2 e ERG3 sono coesprese nella stessa popolazione neuronale (interneuroni GABAergici) e mostrano, durante le fasi di sviluppo, mostrano una progressiva diminuzione di espressione secondo un gradiente ventro-dorsale (Fig. 7). Le registrazioni di Patch-Clamp (fig. 8) confermano tali dati, dimostrando che tale popolazione neuronale esprime la $I_{(ERG)}$ anche se transitoriamente. Esperimenti eseguiti in colture organo tipiche di midollo spinale, hanno dimostrato che gli interneuroni ventrali con adattamento veloce e GABA_{ergici}, dopo una settimana in coltura in presenza dello specifico bloccante della I_{ERG} (E4031) mostravano un'attività di "bursts" con alta frequenza e più regolare rispetto a quella mostrata nell'attività di "firing" spontanea. Nel midollo isolato registrazioni su interneuroni GABA_{ergici} in cui si ha colocalizzazione con ERG l'attività ritmica evocata in VR (ventral root) dalla presenza di NMDA e 5-hydroxytryptamine è stabilizzata e sincronizzata in presenza del bloccante

specifico del canale. Tali effetti non sono visti dopo due settimane in coltura in coincidenza della diminuzione di espressione di *m-erg*. Almeno in un breve periodo dello sviluppo in cui l'attività eccitatoria GABA_{ergica} degli interneuroni ventrali è fondamentale nella maturazione del circuito, dipende in parte dalla I_{ERG}. Inoltre, sembra che la regolazione da parte della I_{ERG} nello sviluppo contribuisca al cambiamento funzionale degli interneuroni GABA_{ergici} da eccitatori a inibitori (Furlan et al., 2007).

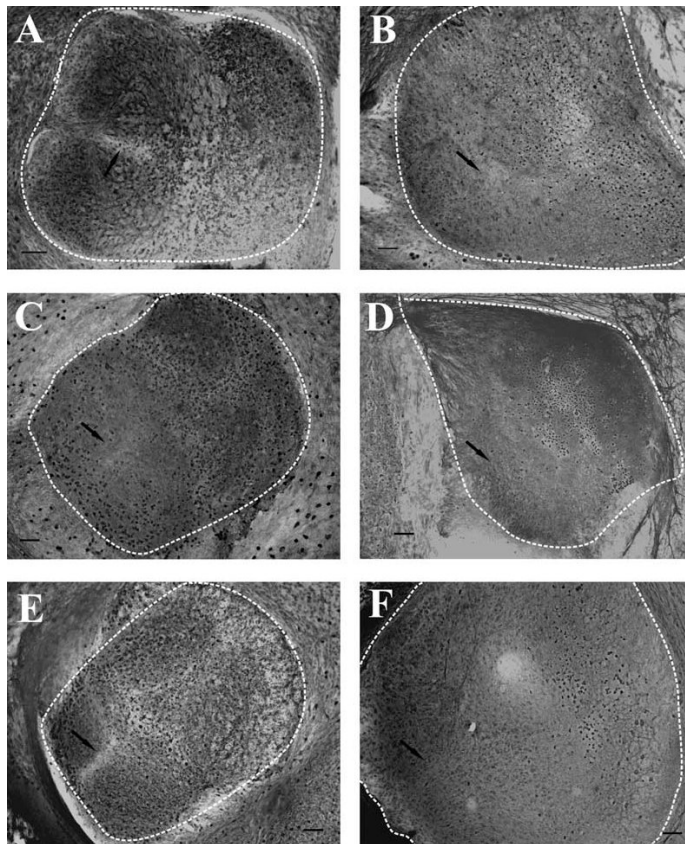


Fig. 7. *Espressione spatio-temporale delle proteine hERG in colture organotipiche embrionali murine di midollo spinale a 7 e 14 DIV. Esperimenti di immunistochemica (IHC) della distribuzione di ERG1 (A e B), ERG2 (C e D), ERG3 (E e F).*(Furlan et al.,2005)

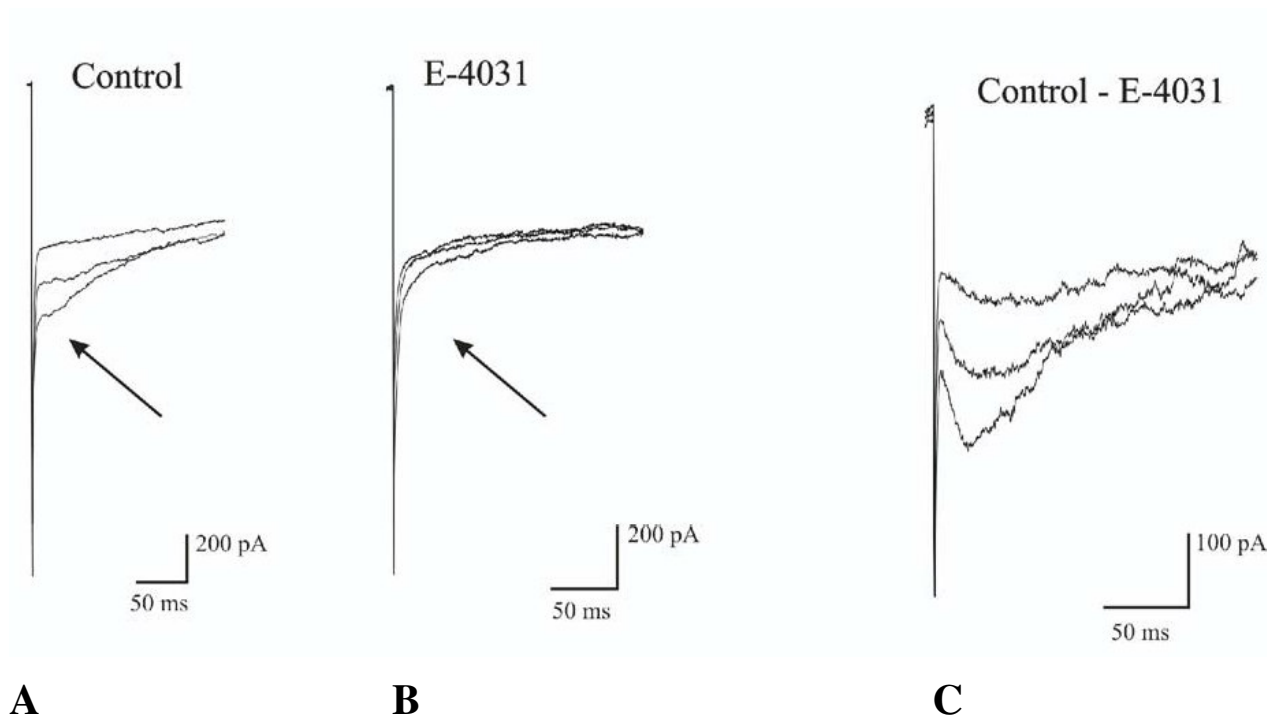


Fig. 8a. I_{ERG} in interneuroni ventrali di midollo spinale. In fig. A è mostrata la corrente registrata da una cellula di controllo, in B la stessa corrente in presenza del bloccante E-4031 e in C è mostrata la I_{ERG} data dalla sottrazione delle tracce A-B. (Furlan et al., 2007).

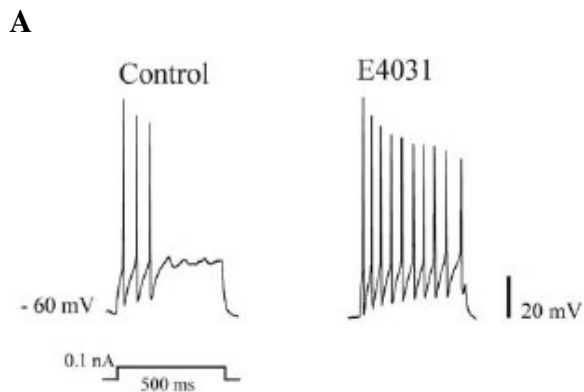


Fig. 8b. Effetto del bloccante E4031 su cellule che adattano a 7 DIV. A, registrazione in Current-clamp di un interneurone che adatta in soluzione di controllo (traccia destra) e dopo applicazione per 10 min si E4031 ($1\mu\text{M}$), (Furlan et al., 2007).

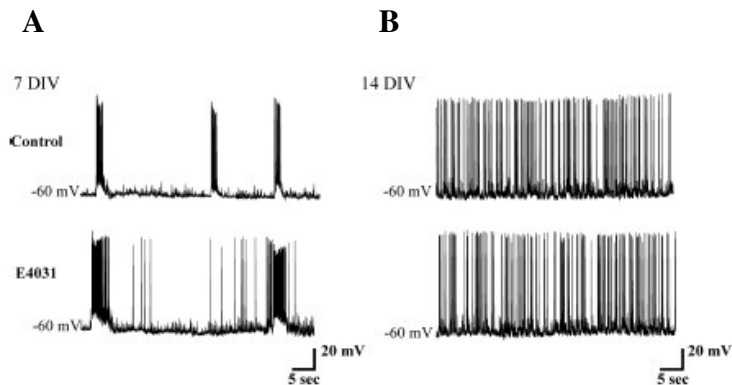


Fig. 8c. Effetto dell'E4031 sull'eccitabilità di rete di fette spinali a 7 e 14 DIV. **A**, attività di "burst" in soluzione di controllo registrata da un interneurone a 7 DIV, localizzato nell'area ventrale di una coltura organotipica di midollo spinale. Sotto, in presenza di E4031 (1 μ M), per 10 min, si osserva un'attività di "burst" prolungata ma diminuita in frequenza. **B**, attività di "firing" spontanea a 14 DIV l'applicazione di E4031 (1 μ M) per 10 min non varia la frequenza di "firing", diversamente da quanto notato in **A**, (Furlan et al., 2007).

Possibile ruolo funzionale di ERG nel sistema nervoso centrale

Nel SNC, i canali del K⁺ hanno un ruolo essenziale nel controllo dell'eccitabilità cellulare mediante la regolazione dei picchi del potenziale d'azione, della forma di tali e della frequenza di scarica. Mutazioni in alcuni geni codificanti per i canali del K⁺ generano difetti nella percezione sensoriale (Neyroud et al., 1997; Kubisch et al., 1999) e un'anormale eccitabilità cellulare, dando origine ad episodici fenomeni di atassia (Browne et al., 1994), a convulsioni familiari neonatali benigne (Biervert et al., 1998) e ad alterazioni della plasticità neuronale in generale (Patil et al., 1995).

La forte espressione dei canali ERG nelle diverse aree del SNC porta ad ipotizzare un ruolo importante nella determinazione dei meccanismi e nel controllo dell'eccitabilità a livello del sistema nervoso. Nell'ippocampo, le proteine ERG sono fortemente espresse, ma è difficile predirne la funzione essendo presenti sia nei neuroni eccitatori che inibitori. L'elevata espressione delle proteine ERG nei bulbi olfattivi, nella paleocortex e nelle strutture limbiche suggerisce inoltre un loro ruolo nell'elaborazione delle informazioni emozionali.

L'ipotalamo presenta l'espressione più intensa e selettiva di ERG1 e ciò potrebbe essere il presupposto per ipotizzare un ruolo di questo canale, e della relativa corrente, nei meccanismi neurovegetativi e neuroendocrini. Nel cervelletto l'espressione di tutte le proteine ERG a livello dei neuroni di Purkinje e nei nuclei cerebellari implica un ruolo fondamentale nel controllo del processamento dei segnali. Infatti, il blocco di ERG nelle cellule del Purkinje

produce un aumento dell'eccitabilità e riduce l'adattamento ("spike frequency adaptation") (vedi paragrafo "*Espressione di erg in cellule eccitabili*"). Infine, nel romboencefalo, tutti i nuclei maggiori mostrano diversi gradi di espressione, indicando un coinvolgimento in molte funzioni romboencefaliche, quali quelle acustiche, vestibolari e motrici (Guasti et al., 2005).

Epilessia

Nel tempo l'epilessia è stata designata con nomi più o meno immaginifici che riflettono l'atteggiamento della cultura che li ha espressi. Termini descrittivi si ritrovano nelle tavolette babilonesi e si parla di "mal caduco" nella cultura medievale o il "male sacro" della cultura greca, alludendo ad una possibile origine soprannaturale del disturbo.

"...essa non è a mio parere per nulla più divina o più sacra delle altre malattie, ma ha la stessa natura da cui le altre provengono..."

Ippocrate, V secolo a.C.

Classificazione e forme cliniche

Non tutte le epilessie sono uguali. Nell'ambito dell'epilessia si distinguono forme cliniche diverse per eziologia, presentazione clinica e prognosi. L'incidenza maggiore affligge bambini ed anziani, in molti aspetti l'epilessia rappresenta un prototipo di una malattia neurologica, in cui i sintomi sono manifestati in maniera sensoriale e motoria; è definita come sintomatologia positiva la percezione di flash o movimenti incontrollati del braccio. Funzioni rallentate, depressione, paralisi e cecità sono sintomi associati a segni negativi.

La classificazione clinica dell'epilessia viene fatta in 2 categorie:

- Parziali
- Generalizzate

Se la scarica epilettogena origina e si mantiene localizzata ad una popolazione neuronale ristretta, le crisi sono definite parziali ed hanno una fenomenologia coerente con le funzioni delle specifiche aree corticali interessate. Se la scarica inizia localmente, ma si diffonde più o meno rapidamente a vaste aree corticali, vi può essere una generalizzazione secondaria, spesso con manifestazioni convulsive.

Le crisi primitivamente generalizzate sono sostenute da una scarica epilettica che fin dall'esordio interessa contemporaneamente vaste aree corticali di entrambi gli emisferi. Molte delle crisi descritte come generalizzate (la maggior parte di tipo convulsivo), sono in realtà crisi parziali generate da una scarica locale che si diffonde così rapidamente da non permettere l'identificazione di scariche parziali iniziali. Tali epilessie sono di tipo non convulsivo (si manifestano soprattutto durante il periodo infantile) durano pochi secondi, sono associate a perdita di coscienza e paralisi, invece nelle crisi convulsive si assiste a movimenti di tipo motorio (mioclonico, tonico, clonico) o perdita del tono motorio (atonico).

Tab 1 - Classification of epileptic crises

PARTIAL	
Elementary	Versive; focal motor (with and without "marching"); somatosensory Aphasic or phonatory; visual; auditory; Olfactory; vertiginous; autonomic; Cognitive; emotional; psychosensorial
Complex	Affects only consciousness; feeling of confusion or complete loss of contact with the surrounding environment; the patient remains basically motionless. Affects conscience and simple and complex automatisms Affects consciousness with other motor signs
GENERALIZED	
Tonic	Brief, habitual hypertonus; the contraction can be highlighted only through a hectographic recording
Clonic	Massive, repeated muscular jerks
Myoclonic	Rapid and often small muscular jerks
Atonic/akinesic	Abrupt atonia involving the antigravity muscles with a postural collapse that is at times segmentary (i.e. the head drops forward).
Tonic-clonic	Tonic crisis followed by a clonic phase and always followed by prolonged torpor.
Infantile seizures	Extremely brief tonic crises (1'-2'). The hypertonus sets in less abruptly than in clonic crises
Simple absences	Loss of contact at the onset and sudden end; duration generally between 5" and 30"
Absence with mild motor signs	Loss of contact at the onset and sudden end consistent with a myoclonic, tonic component etc.
Complex absences	Often gradual onset and end (or hardly recognizable); variable duration; a motor component is often present (especially myoclonic and/or akinesic) with an irregular temporal expression.

Tab. 4a. (G. Avanzini)

Tab 2 - Classification of epileptic syndromes.

IDIOPATHIC EPILEPSIES	
With partial crises	Benign familial crises in newborn and infants Benign epilepsy in children with central and temporal peaks Epilepsy in children with occipital paroxysms Other forms of idiopathic epilepsy with partial crises
With generalized crises	Benign infantile myoclonic epilepsy Absence of epilepsy in childhood Myoclonic epilepsy in youth Absence of epilepsy in youth Generalized epilepsy with tonic and clonic crises (on waking up, stochastic)
SYMPTOMATIC/CRYPTOGENIC EPILEPSIES	
With generalized crises	"Suppression-burst" precocious infantile encephalopathy Infantile seizures (West's syndrome) Lennox-Gastaut syndrome Progressive epileptogenic encephalopathies (ceroidlipofuscinosis, sialitis, Lofora's disease, Unverricht-Lundborg disease)
With partial crises	Severe infantile myoclonic epilepsy Mesial temporal lobe epilepsy Other epilepsies defined according to their site of origin
EPILEPSY "RELATED SITUATIONS"	
	Reflex epilepsies Febrile seizures
EPILEPTIC CONDITION	
	Not age-related Age-related syndromes that appear with the epileptic condition

Tab. 4b. (G. Avanzini)

Nella classificazione delle crisi e della specifica forma di epilessia assumono un ruolo fondamentale le alterazioni elettroencefalografiche (EEG) concomitanti, diverse nelle differenti tipologie di crisi.

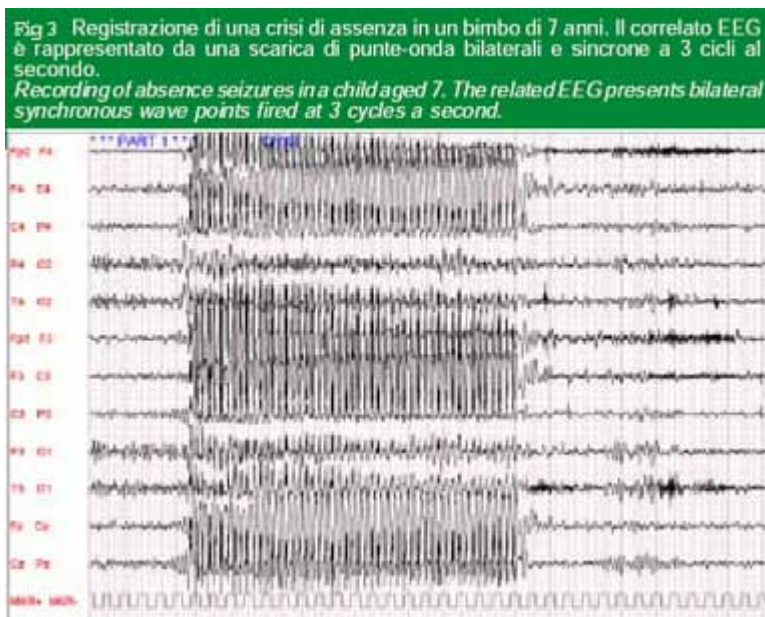


Fig. 9a. (G. Avanzini)

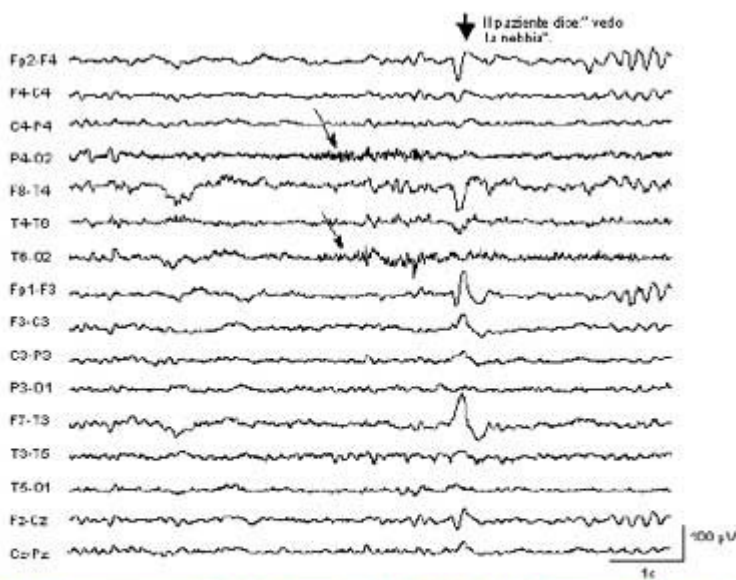


Fig 4 Registrazione di una crisi parziale elementare in un paziente di 27 anni affetto da epilessia parziale criptogenetica. Il correlato elettrico alla sensazione critica riferita dal paziente è costituito da una scarica di attività rapida in sede parieto-temporo-occipitale dx.
Recording of a partial elementary crisis in a patient aged 27 suffering from partial cryptogenic epilepsy. The graph of the critical feeling the patient reported comprises a spell of rapid activity in the right parietal, temporal, occipital site.

Fig. 9b. (G. Avanzini)

L'inquadramento diagnostico di una specifica forma di epilessia si basa sul tipo di crisi presentate dal soggetto, sulle caratteristiche del tracciato EEG, sull'età di esordio della sintomatologia sulla presenza-assenza di segni clinici e sulla familiarità; sulla base di questi fattori si definisce l'eziologia ed è possibile impostare una terapia.

Le epilessie idiopatiche sono caratterizzate da esordio legato all'età, con normale sviluppo psicomotorio e assenza di danno cerebrale. Lo studio dell'andamento dell'EEG durante la veglia e il sonno è di fondamentale importanza al fine di definire una diagnosi e, quindi la prognosi delle differenti forme.

Queste epilessie, fra cui le forme sintomatiche/criptogenetiche rappresentanti la maggioranza delle epilessie che si protraggono nel tempo, possono insorgere a qualsiasi età; le crisi possono essere momomorfe o polimorfe, la fenomenologia dipende dalla localizzazione del focolaio epilettogeno.

L'epilessia parziale è preceduta da una fenomenologia detta "aura epilettica" che causa alterazioni delle sensazioni, questa pre-epilessia è dovuta ad attività elettrica del focus epilettico che rappresenta la prima manifestazione di epilessia parziale; il periodo dopo la crisi

viene definito “postictal” in cui le proprietà neurologiche del paziente ritornano alla normalità.

Tra le forme parziali si trova l'epilessia del lobo temporale mesiale che presenta un tipico andamento bifasico, rappresentato da un singolo episodio (spesso una convulsione febbrile) seguito dopo un periodo latente più o meno prolungato (anni), da una fase cronica caratterizzata da crisi spesso resistenti al trattamento farmacologico.

Le epilessie generalizzate esordiscono nella maggior parte dei casi in età infantile, possono insorgere in assenza di fattori causali noti in pazienti precedentemente normali (criptogenetiche), o in presenza di fattori che sono causa di un danno cerebrale (sintomatiche).

Eziopatogenesi

Lo studio di modelli sperimentali di epilessia ha evidenziato la potenzialità epilettogena di alterazioni dei meccanismi di eccitabilità neuronale, che dipendono dai flussi di correnti ioniche attraverso i canali della membrana cellulare. Un enorme passo avanti è stato fatto dalla definizione della struttura molecolare dei canali e dei geni che li codificano.

Le crisi epilettiche possono verificarsi a causa di disfunzioni di popolazioni neuronali (epilessie idiopatiche), tuttavia nella maggioranza dei casi le crisi sono dovute a danni cerebrali nuovi o preesistenti (epilessie sintomatiche). Tra le cause più importanti di epilessia sintomatica vi sono le malformazioni (displasie, malformazioni vascolari), le encefalopatie fetali, infettive, posttraumatiche), i tumori primitivi o secondari del sistema nervoso.

Nelle epilessie idiopatiche è dimostrata un'origine genetica, le mutazioni responsabili sono state trovate in forme rare a trasmissione dominante, che si esprimono con convulsioni ripetute in età neonatale, con convulsioni febbrili e crisi parziali che persistono in età adulta.

Tali mutazioni sono a carico di subunità di canali ionici voltaggio-dipendenti o associati a recettori. I canali interessati da mutazione sono il recettore muscarinico in forme familiari di epilessia frontale, i canali del Na^+ in una forma di epilessia generalizzata, i canali del K^+ nelle crisi benigne neonatali familiari (BFNC) e il recettore del GABA in una sotto forma di epilessia mioclonica giovanile. Nelle forme più comuni di epilessia idiopatica non si è avuta ancora una caratterizzazione molecolare, mentre nelle epilessie sintomatiche la disfunzione epilettogena è determinata da alterazioni indotte dalla lesione su cellule nervose del tessuto circostante (nei tumori), o incluse nel tessuto patologico (nelle displasie).

Proprietà elettriche

I neuroni sono cellule eccitabili e pertanto l'epilessia risulta direttamente o indirettamente dal cambiamento dell'eccitabilità dei neuroni o di un gruppo di essi. L'attività cerebrale viene monitorata tramite registrazioni elettriche mediante l'uso di elettrodi intracellulari che registrano l'attività elettrica di singoli neuroni o con elettrodi extracellulari che registrano i potenziali di azione dei neuroni vicini.

La generazione dell'attività epilettica può essere compresa considerando due caratteristici profili elettrografici: l'epilessia parziale e quella generalizzata.

Questi due tipi di epilessia hanno differenti substrati fisiopatologici, l'attività elettrica, mutata, si origina dal focus epilettico, in esso si trova un gruppo ristretto di neuroni con aumentata eccitabilità dovuta ad alterazione delle proprietà cellulari o alterazione delle connessioni sinaptiche causate da lesioni o tumori. Dipendentemente da dove si sviluppa il focus epilettico avremo conseguenze sugli effetti motori e comportamentali. Le fasi di sviluppo dell'epilessia parziale sono arbitrariamente divise in:

- Periodo "interictal"
- Sincronizzazione elettrica
- Diffusione dell'epilessia
- Generalizzazione secondaria

Diversi fattori contribuiscono a ciascuna fase, studi sono stati indirizzati per capire come l'attività elettrica porti alla generazione di epilessia. Ciascun neurone all'interno del focus epilettico ha una risposta elettrica sincronizzata (paroxysmal depolarizing shift). Esso consiste di una improvvisa e larga depolarizzazione (50-200 ms), che instaura un treno di potenziali di azione al picco del PDS. Il PDS è seguito da una iperpolarizzazione postuma ("afterhyperpolarization"); la forma di tali potenziali è determinata da proprietà intrinseche di membrana (dovute a canali del Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), input sinaptici sia eccitatori (glutamatergici) che inibitori (GABAergici); la fase di depolarizzazione è sostenuta dall'attivazione di canali eccitatori tipo AMPA e NMDA. I recettori degli NMDA sono particolarmente adatti all'aumento dell'eccitabilità, incrementando la depolarizzazione della membrana contribuendo all'entrata di Ca^{2+} . Molti neuroni non presentano un PDS (piramidali della regione CA3), la

tipica risposta di un neurone piramidale corticale a impulsi eccitatori è un EPSP seguito da un IPSP; il PDS può essere visto come “un’esagerazione” rispetto a condizioni normali di depolarizzazione e iperpolarizzazione. La iperpolarizzazione postuma limita la durata del PDS e il suo graduale diminuire è un fattore importante nell’inizio dell’epilessia. La iperpolarizzazione postuma dipende dai canali KCa, che sono attivati dall’entrata di Ca²⁺ dovuta ai canali di Ca V-dipendenti.

Il calcio entra attraverso i canali voltaggio-dipendenti e i canali NMDA aprono i “Ca²⁺ dependent K⁺channels”. Questa sequenza alternata di depolarizzazione-iperpolarizzazione è guidata dall’attività sinaptica, molti farmaci anticonvulsanti agiscono bloccando l’eccitazione o aumentano l’inibizione, come le benzodiazepine (diazepam), agiscono aumentando l’inibizione dei recettori GABA_A e sono il trattamento standard per prolungati attacchi epilettici.

Quando la modificata attività elettrica è ristretta al focus epilettico non si hanno manifestazioni cliniche, l’attività sincronizzata dei neuroni nel focus può essere evidenziata da un EEG; durante la fase “interictal” l’attività rimane confinata al focus mediante “l’afterhyperpolarization”. Essa dipende dagli impulsi eccitatori e inibitori degli interneuroni GABAergici, c’è un bilanciamento per questo tipo di impulsi. Se tale viene meno (per fattori intrinseci ed estrinseci), avremo l’inizio e la diffusione delle crisi non essendo inibite nemmeno le cellule esterne al focus.

In condizioni normali il circuito che viene attivato, provvede ad un ambiente inibitorio; con lo sviluppo del fenomeno epilettico l’ambiente di inibizione è prevaricato, “l’afterhyperpolarization” non avviene nei singoli neuroni, permettendo a potenziali eccitatori di invadere il tessuto oltre il focus originale. Il fattore importante sembra essere la trasmissione GABAergica, continue scariche risultano nel silenziamento di questa risposta, sebbene gli interneuroni rimangono “disponibili”. Altri fattori contribuiscono alla perdita dell’inibizione come i cambiamenti cronici in strutture dendritiche e la densità dei recettori o dei canali. Prolungati potenziali di azione sono trasmessi ad altre aree cerebrali che in risposta, possono sostenere altri potenziali di azione in neuroni che retro- proiettano (back-propagation) ai neuroni del focus epilettico; le reciproche connessioni fra corteccia e talamo sono importanti a questo riguardo. E’ possibile che le proiezioni corticali colinergiche, noradrenergiche e serotoninergiche abbiano un ruolo modulatorio cruciale. Vari fattori esterni (stress fisici o stimoli sensoriali come flash di luce) possono causare l’eccitabilità di alcuni

circuiti provocando un cambiamento nei recettori NMDA e GABAergici, cambiando così in modo dipendente la frequenza e provocando una variazione dell'eccitabilità di rete.

Diffusione delle crisi epilettiche

Se l'attività del focus è intensa si ha il suo diffondersi in altre aree. La diffusione segue vie locali; nella corteccia motoria e sensoriale hanno organizzazione verticale a colonne che vanno dalla superficie piaie al limite della materia bianca. I maggiori impulsi alla corteccia provengono dal talamo sino allo strato IV; le cellule con impulsi in uscita (output-cell) si trovano nello strato V. Il talamo e la corteccia sono interconnessi da vie talamo-corticali. Le connessioni intracorticali avvengono mediante fibre corte (U), fra i sulci adiacenti e via corpo calloso, la principale connessione interemisferica; queste vie possono essere il percorso di scariche epilettiche. L'attività epilettica può diffondersi per altre vie coinvolgendo altri distretti dello stesso emisfero o attraversare il corpo calloso coinvolgendo l'emisfero controlaterale. Quando sono coinvolti entrambi gli emisferi si parla di epilessia secondaria generalizzata, si manifesta con perdita di coscienza del paziente. Il tempo di durata della propagazione epilettica risulta variabile (da pochi secondi a qualche minuto), l'inizio della propagazione ha come sua manifestazione clinica nota come "aura". All'inizio "dell'aura epilettica" in epilessia tonico-clonica i neuroni dell'area coinvolta risultano depolarizzati continuando nella scarica di potenziali di azione, non si ha iperpolarizzazione seguita da PDS.

Questo periodo, clinicamente, è correlato a contrazione muscolare (quando la via discendente eccita i neuroni motori sino al midollo spinale). Con l'evolversi del fenomeno i neuroni i neuroni ripolarizzano e appare "l'afterhyperpolarization"; questi cicli di depolarizzazione e ripolarizzazione corrispondono alla fase clonica. A questa fase segue un periodo di diminuzione dell'attività elettrica (postictal period), che può essere accompagnato da sintomatologia clinica come confusione ed emiparesi (Todd paralysis).

Canalopatie

Le canalopatie sono malattie genetiche causate da mutazioni in geni che codificano una componente strutturale di una proteina canale. La mutazione si può trovare o in una subunità, che forma parte del poro, oppure in una subunità regolatoria associata. Nell'uomo esistono numerosi esempi di canalopatie:

- Atassie episodiche (dovute a mutazioni di canali del K^+ e del Ca^{2+})

- Aritmie cardiache da QT lungo (canali del K^+ e del Na^+)
- Emicrania emiplegica (canali del Ca^{2+})
- Ipereclessia (recettore per la glicina)
- ADNFLE- Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy (recettore colinergico)
- Patologie muscolari- paralisi periodiche/miotoniche (canali del K^+ , Ca^{2+} e Cl^-)

Le canalopatie “normalmente” sono caratterizzate da manifestazioni acute e transitorie in soggetti che altrimenti appaiono normali, questa è anche una caratteristica delle epilessie idiopatiche (patologie che comportano un’alterazione nell’eccitabilità neuronale dovuta a predisposizioni congenite). I neuroni di un’area epilettogena presentano intense scariche fasiche protratte nel tempo (Matsumo et. al., 1964), dette anche variazioni depolarizzanti parossistiche (PDSs). Varie mutazioni in epilessia sono state trovate a carico di canali del sodio nell’espressione alterata dei recettori $GABA_A$ (Brooks-Kayal et al., 1998) e dei canali HCN. I canali HCN sono importanti nella regolazione del ritmo di scarica neuronale, mutazioni che provocano il cambiamento di espressione di tali canali furono trovate in soggetti affetti da “temporal lobe epilepsy” (Bender et al., 2003). In modelli animali di epilessia febbrile fu trovata una down-regolazione per HCN1 (Brewster et al., 2002; Dubè et al., 2006). Questa è associata con alterate proprietà della corrente I_h con aumentata probabilità di ripetuta attività di “firing” in risposta a impulsi iperpolarizzanti a normali frequenze fisiologiche (Che et al., 2001). Tale fenomeno è un esempio dell’instaurarsi di un possibile processo epilettico dovuto ad alterazione della proteina canale.

Epilessia generalizzata

La crisi generalizzata mostra vari disturbi dell’attività cerebrale in entrambi gli emisferi, la tipologia meglio caratterizzata nell’epilessia primaria generalizzata è quella da assenza con tipico tracciato EEG con profilo di 3Hz punta-onda, riconosciuta da Hans Berger (1933). L’epilessia da assenza inizia in maniera improvvisa e non è preceduta da “aura” e “postictal period”. Le onde-punta dell’EEG coinvolgono tutte le aree cerebrali e sono precedute e seguite da normale attività elettrica, tale profilo è comune in pazienti affetti da “childhood absence epilepsy” (CAE); è stata notata la similarità fra EEG durante le crisi da assenza e attività ritmica durante il sonno (Penfield and Jasper); essi proposero (in contrasto

con l'ipotesi dell'ipereccitabilità corticale di Gibbs) l'ipotesi centroencefalica che suggerisce come la rapida generalizzazione sia dovuta ad attività ritmica di gruppi neuronali del talamo che proiettano alla corteccia.

Entrambe le ipotesi risultano corrette; modelli animali trattati con penicillina (un debole agonista dei GABA_A) produce un tracciato di onde lente bilaterali sincronizzate (generalized penicillin epilepsy), durante tale epilessia le cellule corticali e talamiche sono sincronizzate attraverso le reciproche connessioni talamo-corticali, che contribuiscono alle onde lente come nella normale attività del sonno. Le cellule corticali sincronizzano prima delle cellule talamiche.

Registrazioni da neuroni corticali mostrano un aumento del numero di potenziali di azione durante una scarica depolarizzante (burst) che potenzia la stimolazione GABAergica che iperpolarizza la cellula dopo ogni burst. Questa attività differisce dal PDS della crisi parziale, in cui l'inibizione GABAergica è preservata.

L'attività sommativa dei "bursts" produce le punte (spike) mentre la sommativa dell'inibizione le onde (waves) del tipico tracciato dell'EEG onda-punta di un'epilessia da assenza. I neuroni che facilitano l'attività di sincronizzazione hanno canali del Ca²⁺, inattivati al normale potenziale di riposo e che si attivano a potenziali iperpolarizzati. La depolarizzazione apre i canali T (T channels) transientemente, essi contribuiscono alla generazione delle epilessie da assenza; farmaci (ethosuximide) bloccanti questo tipo di epilessia, agiscono anche su questi canali bloccandoli.

Il circuito talamico sembra ideale per la generazione di epilessie primarie generalizzate, il profilo di attività dei neuroni del Relay talamici durante il sonno suggerisce un'interazione reciproca tra questi e i neuroni GABAergici nei nuclei talamici (reticolare e perigenicolato).

Esperimenti su fette di encefalo (McCormick D.), suggeriscono che inibendo i neuroni del relay tramite neuroni GABAergici, iperpolarizzano i neuroni del relay, che rimuovono l'inattivazione dei canali del Ca²⁺ di tipo T. questa sequenza di eventi porta a un "rimbalzo" dei "bursts" dopo ogni IPSP, i potenziali di azione stimolano i neuroni GABAergici, ed i neuroni del relay stimolano i neuroni corticali, questo processo si manifesta in EEG come uno "spindle". Il blocco dei GABA_A aumenta l'IPSP dei GABA_B nei neuroni del relay portando ad un incremento dei "bursts", i canali di tipo T e i recettori GABA_B sembrano avere un ruolo importante nella generazione di un'attività simile a quella d epilessia da assenza umane.

Diverse altre influenze modulatorie possono alterare l'attività talamo-corticale e contribuire alla transizione da una normale attività ad una sincronizzata caratteristica dell'epilessia primaria generalizzata. I canali del K^+ attivati dal Ca^{2+} potrebbero avere un ruolo nell'iperpolarizzazione dei neuroni, rimuovendo l'inattivazione dei canali T, la risultante attivazione della corrente cationica (I_h) attivata dall'iperpolarizzazione nei neuroni del relay talamici può controllare la “scarica ritmica in questo circuito”.

Danni del Sistema Nervoso causati da continui attacchi epilettici

Attacchi prolungati possono causare danneggiamento delle regioni cerebrali. Il sistema nervoso è in grado di compensare stress metabolici in seguito a epilessie parziali o la transiente diminuzione in ossigeno che si sviluppa durante un'epilessia generalizzata tonico-clonica. In epilessie generalizzate la stimolazione ipotalamica porta ad una forte attivazione della risposta da stress del sistema nervoso simpatico. Inizialmente l'aumento della pressione sanguigna ed il glucosio presente nel siero compensano l'aumento della domanda metabolica, tale meccanismo fallisce per crisi prolungate. Risulta una situazione metabolica anormale in cui si verificano fenomeni di ipossia, ipotensione, acidemia e glicemia che porta ad una riduzione di energia (data da ATP e fosfocreatina) nel cervello, danneggiandolo. Crisi generalizzate ripetute senza un ritorno allo stato cosciente sono indicate come “status epilepticus”, se le crisi hanno una durata superiore ai 30 minuti possono instaurarsi danni irreversibili o lo stato di morte; le conseguenze sono meno gravi per epilessie che non sono associate ad uno stato convulsivo (parziali semplici e complesse, epilessie da assenza).

Per la bibliografia dei paragrafi sopra riportati si veda anche (Kandel et al., 2004)

Childhood absence epilepsy

Tale epilessia non porta a stati convulsivi, avviene con improvvisa perdita di coscienza ed è accompagnata nel tracciato elettroencefalografico da attività generalizzata bilaterale con “spike” di 2.5-4 Hz e lente onde di scarica (SWD). Una tipica epilessia da assenza è integrata nelle epilessie idiopatiche generalizzate (IGE). Tali epilessie insorgono in età infantile (3-8 anni), avvengono diverse volte nell'arco del giorno e non sono indotte da stimoli visivi o sensoriali, il 70% circa dei pazienti affetti mostrano remissione spontanea in età adolescenziale. Mediante studi di genetica molecolare sono state identificate mutazioni. Non si

instaurano segni neuropatologici (Panayiotopoulos C., 1997); malformazioni della neocorteccia sono state trovate post-mortem in pazienti affetti anche da epilessie generalizzate tonico-cloniche (GTCS). La CAE è determinata geneticamente con una positività nella storia familiare del 16-45%, con penetranza incompleta (Berkovic S.F., 1998). E' stata identificata una mutazione nel recettore GABA_A a livello del gene che codifica per la subunità γ_2 (GABRG 2 sul cromosoma 5). La subunità mutata può riassemblare come recettore di superficie funzionale generando un recettore alterato nel mediare le risposte; tale mutazione potrebbe ridurre l'inibizione GABA mediata fra i neuroni dei nuclei reticolari talamici (NRT), (Wallace et al., 2001), risultando in un'aumento dell'inibizione dei neuroni talamici da parte degli NRT e un complessivo aumento dell'eccitabilità della rete.

Modelli cellulari e meccanismi della rete di epilessie "punta-onda".

Un'importante profilo dell'attività oscillatoria vista in epilessia è la scarica "punta-onda", che consiste di una intensa scarica neuronale ad alta frequenza durante la fase degli "spikes" alternata a relativa quiescenza della rete neuronale durante la fase a onde lente. Il fenomeno "punta-onda" oltre che nelle IGE è visto anche in altre forme epilettiche focali e generalizzate. La scarica "punta-onda" è vista anche in CAE, essa consiste di una larga ampiezza di 200-300 μ V di lente onde negative, alternate con singole o doppie punte negative, con una diffusa distribuzione bilaterale. E' evidente che il tipico profilo punta-onda delle epilessie da assenza è in relazione o deriva dai ritmi oscillatori che si osservano durante il sonno (sleep spindles oscillations), entrambi coinvolgono la stessa rete talamo-corticale (Kellaway et al., 1985; Avoli et al., 1990). Le tipiche scariche generalizzate punta-onda sono accompagnate da diversi gradi di alterazione dello stato cosciente (Blumefeld., 2005). Una variante delle forme di IGE, l'epilessia mioclonica giovanile è caratterizzata da scariche polipunta-onda, in cui una serie di due-tre "spikes" sono alternati con onde lente alcune volte con frequenza di 3.5-5 Hz. Il fenomeno punta-onda può essere visto in epilessie sintomatiche o generalizzate secondarie come nella sindrome dell'encefalopatia epilettica di Lennox-Gastaut con profilo punta-onda atipico di 1.5-2 Hz (Theodore et al., 1987). Epilessie cloniche o fasi di epilessie tonico-cloniche generalizzate sono accompagnate nel tracciato EEG da poli-punte e onde che usualmente evolvono in un profilo decrescente con diminuzione della frequenza e dell'attività ritmica durante il corso dell'episodio. Considerando i meccanismi di rete del circuito talamo-corticale responsabili nella generazione del fenomeno epilettico, essi

coinvolgono numerose stimolazioni che raggiungono l'area talamica. I neuroni talamocorticali convogliano le informazioni attraverso sinapsi eccitatorie a neuroni piramidali corticali, principalmente quelli dello strato III-IV e V-VI; le maggiori proiezioni che dalla corteccia raggiungono il talamo consistono di proiezioni eccitatorie dallo strato VI dei neuroni piramidali corticali a neuroni talamocorticali. Interneuroni con funzione inibitoria (GABAergici) hanno sede nei nuclei reticolari talamici (nRT), essi ricevono assoni collaterali eccitatori sia da neuroni talamocorticali che corticotalamici; i neuroni GABAergici dei nRT ricevono e mandano connessioni al talamo ma non alla corteccia. Le connessioni eccitatorie e inibitorie fra neuroni talamocorticali, nRT e altri neuroni nel circuito, aumenta l'alternarsi di cicli di attività eccitatoria (punta) e inibitoria (onda) durante le oscillazioni talamocorticali (Steriade et al., 1993; McCormick et al., 2001). Durante il sonno ed epilessie punta-onda, "bursts" di attività sincronizzata punta-onda nel sistema talamocorticale causa EPSP in neuroni nRT. Tale fase eccitatoria porta a un "burst" sincronizzato dei nRT, causando IPSP nei neuroni talamocorticali che "spegne" i neuroni durante la fase di inibizione. Durante tale fase i canali del Ca^{2+} dei neuroni talamocorticali recuperano dall'inattivazione, costituendo un pool di canali disponibile. Appena i neuroni recuperano da questo IPSP, i canali del Ca^{2+} si aprono producendo potenziali che andando a stimolare i neuroni fanno sì che si instaurino, di nuovo, dei "burst" di potenziali di azione che conducono al prossimo ciclo di oscillazioni. È stato dimostrato da Kim et al che brevi "bursts" in nRT producono brevi (100 ms) IPSP mediati da recettori $GABA_A$; lunghi "bursts" di nRT producono lunghi (300 ms) IPSP mediati dai recettori $GABA_B$ (Kim et al., 1997). È ipotizzato che l'aumento nell'attività di "firing" corticale può produrre una prolungata attività di "firing" nei nRT che sono causa del cambiamento da 100 ms (mediato dai $GABA_A$) del potenziale postsinaptico inibitorio a 300 ms (mediato dai $GABA_B$), portando le oscillazioni a 3-4 Hz rispetto alle normali 10 Hz. Studi hanno supportato la precedente ipotesi dimostrando che i nRT mostrano un largo incremento dell'attività dei "bursts" rispondendo a impulsi sostenuti provenienti dall'area corticale. Questi esperimenti dimostrano come la "perturbazione" dell'attività elettrica di una regione (corteccia), possa condurre a transizione fra il normale ritmo oscillatorio ad un'altro che rappresenta il fenomeno epilettico (punta-onda) nel sistema talamo-corticale; tale meccanismo è solo uno dei tanti che può instaurarsi provocando l'insorgere della sindrome epilettica.

Modelli animali

Uno dei modelli più studiati di scarica punta-onda era il modello di epilessia generalizzata felina indotta da penicillina (FGPE). In tale modello si genera un'attività epilettica simile all'epilessia da assenza nell'uomo (3-4 Hz). In FGPE questa attività era registrata sia nella corteccia che nel talamo dimostrando come nell'uomo che entrambe le strutture sono coinvolte (Avoli et al., 1982), la rimozione del talamo, corteccia e delle interconnessioni aboliva il fenomeno epilettico, per cui la rete talamocorticale si è dimostrata importante nell'instaurare questo tipo di attività epilettica (Avoli et al., 1981; Pellegrini et al., 1979).

Studi di lesioni in ratti di Strasburgo con assenze da epilessia genetica (GAERS) dimostravano come la corteccia o il talamo isolati non erano in grado di generare variazioni di frequenza del fenomeno "punta-onda". In seguito studi in cui veniva usata bicucullina o stimolazione elettrica per indurre scariche punta-onda dimostrarono che la corteccia era in grado di generare questo tipo di attività (Timofeev et al., 1998), l'attività era simile a quella vista nella sindrome di Lennox-Gastaut con lente punta-onda di 1.5-2 Hz. La dipendenza delle scariche punta-onda della rete talamocorticale presenta variazioni dipendentemente dal modello studiato. Oltre ai modelli sopra citati (FGPE, GAERS), altri modelli animali sono stati presi in considerazione per investigare i meccanismi talamo-corticale nella generazione di epilessia da assenze (Avoli et al., 1990; Crunelli et al., 2002; McCormick et al., 2001). Studi di stimolazione del talamo mediale condotti su felini, dimostravano il reclutamento di risposte in ampie regioni della corteccia dopo stimolazioni ripetute, in cui l'ampiezza dei potenziali di azione generati aumentava con una certa frequenza (Steriade et al., 1976; Castro-Alamancos et al., 1997). Questi studi indicavano che il ritmo eccitatorio coinvolgeva progressivamente l'area talamica sino ad implicare il circuito della corteccia.

I PARTE:

EPILESSIA → ERG ?

L'ippocampo

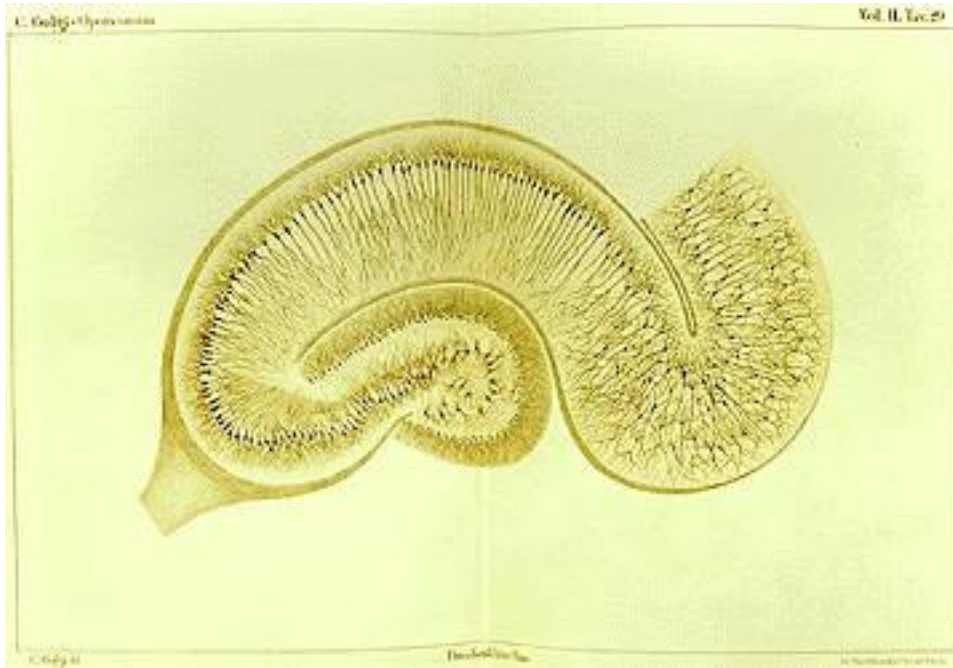


Fig. 9. Disegno di Ippocampo di C. Golgi.

L'ippocampo è un complesso di varie formazioni che si trovano sul contorno dell'ilo cerebrale, vengono distinte in ippocampo ventrale e dorsale. L'ippocampo ventrale si sviluppa nella profondità della circonvoluzione dell'ippocampo; è una formazione semicilindrica di corteccia avvolta su se stessa con struttura complessa. L'ippocampo ventrale presenta un ingrossamento nella parte anteriore mentre si assottiglia posteriormente; medialmente è affiancato dalla fimbria, una striscia bianca e appiattita che, nella parte posteriore circonda il pulvinar del talamo continuando con la gamba del fornice. La costituzione dell'ippocampo dorsale è ridotta nell'uomo è localizzato dorsalmente al corpo calloso e forma l'induseum griseum e le strie longitudinali.

Strutturalmente l'ippocampo è formato da sette strati che dalla superficie ventricolare verso la profondità sono: l'epndima, l'alveo, lo stratum oriens, lo strato piramidale, lo strato

radiato, lo strato lacunoso e lo strato molecolare. L'ependima è il proseguimento dello strato ependimale che riveste la superficie del ventricolo laterale. L'alveo è composto da uno strato di fibre sia afferenti sia efferenti. Lo stratum oriens è attraversato perpendicolarmente da fibre afferenti e efferenti, vi si trovano anche dendriti basali delle cellule piramidali e le cellule "a canestro" che svolgono azione inibitoria nei confronti delle cellule piramidali. Lo strato piramidale è formato da cellule medie e grandi, la cui base è rivolta verso lo stratum oriens e l'apice verso lo strato radiato; i neuriti originano dal polo basale e attraversando l'alveo raggiungono il fornice mentre i dendriti apicali si portano verso gli strati profondi (radiato, lacunoso, molecolare), che rappresentano le porte di ingresso degli impulsi in arrivo. Le fibre afferenti arrivano all'ippocampo da varie zone della sfera olfattiva, in particolare dal giro del cingolo, dalla corteccia piriforme e prepiriforme; riceve fibre dall'ippocampo controlaterale e dalla corteccia temporale (via temporo-ammonica). Le fibre efferenti originano dalle cellule piramidali attraverso il fornice raggiungono i corpi mammillari, da cui origina il fascio mammillo talamico di Vicq d'Azir diretto ai nuclei talamici anteriori collegati alla corteccia temporale tramite una doppia via, tale si trova anche a livello dei corpi mammillari. Nel complesso ci sarà un circuito riverberante che passa per la corteccia temporale, per l'ippocampo, per i corpi mammillari e per i nuclei talamici anteriori.

I dati funzionali indicano come l'asportazione bilaterale completa dell'ippocampo comporta perdita della memoria recente, con incapacità nell'attuazione di processi di memorizzazione. Il complesso di eventi della memorizzazione è caratterizzato dalla formazione di nuove sinapsi asso-dendritiche, è probabile che i dendriti in questione appartengono a neuroni ippocampali.

Acido Kainico

L'acido kainico è un forte agonista del glutammato, viene comunemente usato in modelli animali (ratto, topo) per mimare malattie neurologiche dell'uomo come la malattia di Huntington, l'Alzheimer. Inoltre induce crisi epilettiche a livello limbico, che in seguito evolvono in generalizzate, con perdita di neuroni piramidali (nell'area CA1-CA3) e delle afferenze circostanti l'area colpita, una conseguenza è lo sviluppo di fibre da aree adiacenti le zone lese di fibre che infiltrano tali aree come tentativo di recupero delle varie connessioni. Il Kainato legandosi ai suoi recettori provoca un aumento del glutammato extracellulare.

L'eccessiva stimolazione dovuta anche alla presenza di neurotrasmettitori eccitatori

causa una massiva attivazione dei recettori del glutammato. Questo porta ad un eccessivo incremento di Ca^{2+} intracellulare, che per il suo meccanismo segnalatorio può dopo attivare varie cascate intracellulari, portando all'attivazione di enzimi come fosfatasi, proteasi e lipasi.

La perossidazione lipidica può causare produzione di radicali liberi che danneggiano le proteine cellulari e possono condurre a morte cellulare.

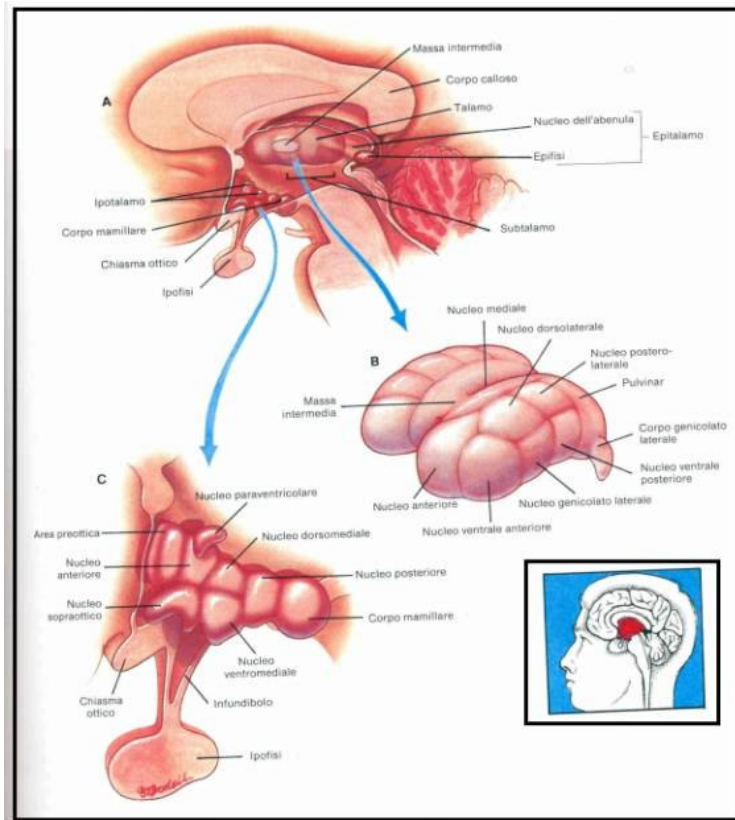
Epilessia e Ippocampo

È stato visto che stimolazioni croniche, elettriche o kainato-indotte, nel giro dentato o a livello della CA1 ippocampale porta a un'ipereccitabilità del sistema con perdita dei neuroni colpiti, a causa della grande quantità di glutammato che viene rilasciato in seguito a iperstimolazione. Nonostante ciò la perdita di neuroni è selettiva per la presenza in alcune popolazioni neuronali GABA-ergiche di fattori, come proteine che legano il calcio (parvalbumina e calbindina), che sono maggiormente sensibili all'azione esocitotossica. Il fatto che siano "tutelati" alcuni tipi di interneuroni GABA-ergici non compensa la ridotta inibizione GABA-ergica trovata in modelli animali con "TLE" (temporal lobe epilepsy). Un modello di ipereccitabilità è la stimolazione ripetuta di strutture libiche. La stimolazione inizialmente è seguita da una risposta elettrica che inizia ad essere più prolungata ed estesa in seguito a stimolazioni ripetute sino a che non si instaura una crisi generalizzata. La plasticità sinaptica che si instaura è simile a quella che avviene normalmente, che include cambiamenti a piccolo-terminale sia nell'eccitabilità sia nella morfologia incluso lo "sprouting" assonico. Il riarrangiamento delle connessioni sinaptiche è stato visto nel giro dentato di pazienti con crisi parziali e in modelli animali. Gli assoni dei granuli del giro dentato, iniziano a proliferare dopo la morte delle cellule "target" su cui proiettavano, con ri-innervazione dei dendriti dei granuli dello strato molecolare del giro dentato.

II PARTE

ERG → EPILESSIA ?

Il Talamo



Diencefalo. A Visione generale della metà destra di encefalica in sezione sagittale. B Talamo e i suoi nuclei. C Ipotalamo con i suoi nuclei e metà destra dell'ipofisi. (Sacchetti, 2000).

Il talamo è rappresentato da un ammasso di nuclei, la parte mediale è rivolta verso la cavità del 3° ventricolo dorsalmente all'ipotalamo. L'estremità anteriore prende rapporto con colonne dette del fornice, rappresentate da sostanza bianca che si porta dal tetto del 3° ventricolo ai corpi mammillari (ipotalamo), che trasportano fibre provenienti dall'ippocampo (fascio ippocampo-mammillare). La parte posteriore prende rapporto con la lamina quadrigemina e i corpi genicolati (metatalamo), la parte superiore è in rapporto con il nucleo caudato (formazione telencefalica); la parte inferiore continua con l'ipotalamo mentre la parte

laterale è coperta da uno strato di sostanza bianca (capsula interna) che lo separa dallo striato.

Il talamo è costituito da vari nuclei e dalla sostanza bianca che lo divide in diverse regioni.

Nuclei talamici

I nuclei si distinguono funzionalmente in nuclei specifici (regione anteriore, mediale e laterale) e i nuclei non specifici (nucleo reticolare, nuclei intralaminari e della linea mediana). I nuclei specifici sono si trovano intercalati nel percorso delle vie sensitive, caratterizzati da collegamenti a doppio senso con aree specifiche della corteccia cerebrale. I nuclei non specifici ricevono dalla formazione reticolare del tronco encefalico e sono caratterizzati da collegamenti talamo-corticali diffusi.

Nuclei anteriori: sono tre comprendenti un nucleo principale e due accessori, ricevono afferente dall'ippocampo con la via mammillo-talamica di Vicz d'azir e dal fornice; inviano fibre alla corteccia del cingolo si ha sempre la presenza di collegamenti a doppio senso. Il circuito rappresentato da ippocampo-fornice-corpi mammillari- talamo-cingolo è importante nei processi di memoria a breve termine.

Nuclei mediali: fra essi troviamo il nucleo dorso-mediale come il più significativo, esso riceve fibre olfattive dall'amigdala e dalla corteccia con le quali è collegato con doppia via. Le sue proiezioni lo collegano a tutte le regioni ipotalamiche è considerato il luogo di mediazione fra impulsi corticali frontali e risposte ipotalamiche di tipo emotivo-istintivo.

Nuclei laterali: il più voluminoso è il pulvinar, ricevono fibre sensitive dai nuclei ventrali del talamo e proiettano ad aree specifiche della corteccia (aree ottiche e acustiche secondarie occipitali).

Nuclei ventrali: tali nuclei sono rappresentati dall'anteriore, laterale e posteriore. Il nucleo anteriore riceve afferente dal nucleo pallido (corpo striato del telencefalo), direttamente dalla corteccia encefalica dal cervelletto e dal tronco encefalico. Esso proietta fibre alla corteccia precentrale motoria, primaria e secondaria, del lobo frontale per cui si attribuiscono funzioni motorie extrapiramidali. Svolge il ruolo di sito intermedio del sistema attivatore ascendente della corteccia cerebrale, che determina risposte elettriche sincrone (ritmiche) di ampie zone corticali. Il nucleo ventrale posteriore svolge funzioni di collegamento fra telencefalo e cervelletto, per la stabilizzazione di risposte motorie. Il nucleo ventrale posteriore

è divisibile in una porzione posterolaterale e posteromediale; è il centro talamico principale di proiezione della sensibilità somatica.

Nuclei non specifici: uno di essi è il nucleo reticolare ed è attraversato da numerosi fasci di fibre in ingresso e in uscita, ha funzioni simili a quelle del nucleo ventrale anteriore, probabilmente interviene anche in funzioni di tipo extrapiramidale.

Nuclei intralaminari: ricevono impulsi sensitivi dalla formazione reticolare del tronco, dal corpo striato e dal cervelletto; inviano fibre al corpo striato e ad altri nuclei talamici perciò sono considerati centri del sistema extrapiramidale.

Ruolo funzionale del talamo

Il ruolo fisiologico del talamo è importante perché rappresenta un centro di arresto di tutte le grandi vie sensitive mentre quelle olfattive proiettano solo le vie secondarie. Gli impulsi sensitivi sono soggetti ad una prima integrazione, nel talamo, questa integrazione arricchisce tali impulsi di contenuti emozionali (tono affettivo). I nuclei anteriori controllano la zona mammillare ipotalamica; il nucleo ventrale laterale ha un controllo sull'attività e il tono muscolare. I nuclei talamici non specifici fanno parte di un dispositivo che mantiene la corteccia ad un livello di attività elettrica necessaria per l'elaborazione degli impulsi su essa proiettati da altri sistemi corticopeti.

CIRCUITO TALAMO-CORTICALE

I Circuiti Frontali Sottocorticali

I circuiti frontali sottocorticali rappresentano un sistema di organizzazione centrale della relazione tra cervello e comportamento. Tali circuiti collegano le regioni della corteccia frontale con i gangli della base e il talamo, creando così reti che mediano l'attività motoria, movimenti oculari ed il comportamento. Un danno ai circuiti che originano nella corteccia prefrontale causa una serie di disturbi cognitivi e neuropsichiatrici.

Panoramica dei Circuiti Frontali Sottocorticali

Sono stati identificati cinque circuiti a cui è stato dato un nome in base alla loro funzione o al sito di origine. Il circuito motorio, che origina nell'area motoria supplementare, e il circuito oculomotore, che origina nei campi oculari frontali, sono relazionati alle funzioni motorie. I circuiti prefrontale dorsolaterale, laterale orbitofrontale e del cingolo anteriore sono rispettivamente associati a funzioni esecutive cognitive, alla regolazione del comportamento sociale. Il lobo orbitofrontale è diviso in una sezione mediale che riguarda il controllo dello stato interno dell'organismo, e in una sezione laterale che integra l'analisi delle caratteristiche degli oggetti con le associazioni emotive. Ogni circuito ha strutture di base uguali che comprendono il lobo frontale, lo striato, il globo pallido, la sostanza nigra e il talamo. La loro collocazione anatomica è segregata in ogni struttura del circuito; in questo modo, la corteccia dorsolaterale prefrontale proietta alla regione dorsolaterale del nucleo caudato, la regione orbitofrontale laterale proietta all'area ventrale del caudato e la corteccia cingolata anteriore connette alle regione mediali striate. Una simile organizzazione anatomica è mantenuta anche nel globo pallido e nel talamo. I circuiti originano nei lobi frontali con fibre glutaminergiche stimolanti che terminano nello striato (caudato, putamen e striato ventrale). Queste cellule striate poi proiettano fibre inibenti del GABA sia ai neuroni del globo pallido interno (connessione diretta), che ai neuroni del globo pallido esterno (connessione indiretta). Nella connessione indiretta, il globo pallido esterno proietta ai nuclei sottotalamici attraverso fibre inibenti del GABA; dai nuclei sottotalamici si passa poi al globo pallido interno/parte reticolata della sostanza nigra attraverso fibre glutaminergiche eccitanti. La connessione diretta utilizza la sostanza P con la sua proiezione del GABA al globo pallido e ai recettori di

dopamina, dove la connessione indiretta combina l'encefalina col GABA e riceve la sua influenza dopaminergica attraverso i recettori D2. Il globo pallido interno, poi proietta le fibre inibenti del GABA agli obiettivi talamici che completano il circuito inviando una finale connessione glutaminergica stimolante alle regioni corticali sede dell'origine dello stesso circuito nel lobo frontale.

Ogni circuito è chiuso; ci sono, tuttavia, elementi aperti in ogni circuito. Le connessioni reciproche tra la sorgente corticale di ogni circuito e le regioni al di fuori dello stesso modulano l'attività del circuito. Tali connessioni reciproche, così come quelle non reciproche afferenti ed efferenti, collegano regioni che condividono funzioni con ogni specifico circuito. I circuiti che mediano funzioni limbiche proiettano ad altre regioni limbiche, mentre quelli coinvolti con le funzioni esecutive interagiscono con regioni che favoriscono la cognizione. In questo modo, i circuiti integrano l'informazione che proviene da regioni anatomicamente disparate, ma funzionalmente relazionate.

Il circuito sottocorticale dorsolaterale prefrontale media le funzioni esecutive; quello sottocorticale orbitofrontale laterale media le limitazioni sociali del comportamento e le associazioni affettive; l'anatomia della porzione mediale del circuito orbitofrontale suggerisce un maggior coinvolgimento con l'umore, le emozioni e l'istinto della fame; infine, quello sottocorticale cingolato anteriore si occupa della motivazione. Disfunzioni esecutive, disinibizione ed apatia sono i rispettivi segnali comportamentali delle disfunzioni all'interno di questi circuiti. Le numerose strutture, i neurotrasmettitori, i recettori ed i modulatori coinvolti sono a favore dell'osservazione che lesioni in differenti regioni cerebrali possono avere simili effetti comportamentali e che diversi interventi farmacologici possono avere esiti simili sui disturbi comportamentali.

La conoscenza sempre più dettagliata dell'anatomia delle connessioni cerebrali è dovuta a studi condotti su primati non umani e tutta l'anatomia corticale qui descritta è estrapolata dalle aree di Walker nei primati non umani, corrispondente alle aree di Brodmann nella rappresentazione del cervello umano. Molte aree sono omologhe, ma non tutte (la corteccia orbitofrontale ne è un esempio).

Il Circuito Dorsolaterale Prefrontale

Il circuito dorsolaterale prefrontale origina nelle aree 9 e 10 di Brodmann e proietta alla porzione dorsolaterale del nucleo caudato. Da qui, una proiezione raggiunge la superficie laterale del globo pallido interno mediodorsale e la parte reticolata rostrilaterale della sostanza nigra. La via indiretta, collega il globo pallido esterno dorsale con il nucleo subtalamico laterale; alcune fibre da qui raggiungono il globo pallido interno/parte reticolata della sostanza nigra. Gli output che partono da queste due strutture terminano rispettivamente nella porzione parvocellulare del talamo ventrale anteriore e mediodorsale. Il talamo mediodorsale chiude il circuito proiettando alle aree 9 e 10 del lobo frontale dorsolaterale (origine del circuito).

Tale circuito è implicato nella cosiddetta funzione esecutiva. Tale funzione include la capacità di organizzare una risposta comportamentale per risolvere un problema complesso (ad es. apprendere nuove informazioni), generazione di programmi motori. Un danno al lobo frontale dorsolaterale o relativo alla porzione sottocorticale produce deficit nelle funzioni cognitive associate a questo circuito.

Il Circuito Orbitofrontale

Il circuito orbitofrontale deriva dalla corteccia prefrontale laterale e proietta al caudato ventro-mesiale, tale porzione proietta direttamente alla parte più centrale del globo pallido interno mediodorsale e alla parte reticolata della sostanza nigra rostromediale. Il caudato ventromesiale invia anche una connessione indiretta attraverso la parte dorsale del globo pallido esterno verso il nucleo subtalamico laterale, che poi proietta al globo pallido interno e alla parte reticolata della sostanza nigra. Dei neuroni partono dal globo pallido e della sostanza nigra per raggiungere la sezione mesiale della porzione magnocellulare del talamo ventrale anteriore così come un settore inferomesiale della parte megnocellulare del talamo mediodorsale. Il circuito poi si chiude con le proiezioni da questa regione talamica alla corteccia orbitofrontale laterale.

Il circuito orbitofrontale laterale media gli aspetti empatici, civili e sociali del comportamento; un cambiamento della personalità è il contrassegno di una disfunzione orbitofrontale. Irritabilità, labilità (rapidi cambiamenti da un umore all'altro), mancanza di tatto ed un'euforia fatua sono stati descritti in pazienti con lesioni in quest'area. Simili cambiamenti comportamentali sono presenti in pazienti con disfunzioni delle strutture sottocorticali del circuito sottocorticale orbitofrontale laterale, tra cui i pazienti affetti da corea

di Huntington (anomalie a livello del caudato) e nelle intossicazioni da manganese (lesioni del globo pallido). Il disturbo ossessivo-compulsivo, è associato ad una disfunzione metabolica nella corteccia orbitofrontale.

Il Circuito Cingolato Anteriore

Tale circuito deriva dal cingolo sopracallosale anteriore, l'input viene inviato all'area striata ventrale, che include il caudato ventromediale, il putamen ventrale, il nucleo accumbens, quest'area è chiamata "striato limbico". Le proiezioni che partono dallo striato ventrale innervano il globo pallido interno rostromediale e il pallido ventrale così come la sostanza nigra rostr dorsale. Un circuito indiretto può inoltre proiettare dallo striato ventrale al polo rostrale del globo pallido esterno. Il pallido esterno a sua volta collega al nucleo subtalamico mediale, che rimanda delle proiezioni al pallido ventrale. Il circuito cingolato anteriore si chiude con delle proiezioni dalla porzione dorsale del talamo magnocellulare mediodorsale al cingolato anteriore.

Il circuito sottocorticale cingolato anteriore media il comportamento motivazionale e l'apatia è il segnale comportamentale che indica la presenza di una disfunzione delle strutture di questo circuito. In seguito a lesioni bilaterali del cingolato anteriore si verifica il mutismo acinetico, una condizione caratterizzata da profonda disfunzione nell'inizio dei movimenti.

Connessioni dei Circuiti

L'attività all'interno di ogni circuito frontale sottocorticale è un circolo chiuso di processi neuronali dedicati a specifiche funzioni svolte dal circuito stesso. L'attività neuronale svolta nelle aree cerebrali al di fuori delle strutture di un particolare circuito può fornire importanti input ad un circuito attraverso connessioni efferenti verso la corteccia prefrontale, lo striato, il globo pallido, la sostanza nigra o il talamo. I circuiti inviano anche efferenze al di fuori, verso aree cerebrali collegate da un punto di vista funzionale, queste connessioni costituiscono l'aspetto aperto dei circuiti.

Un esame degli aspetti aperti di ogni circuito facilita la comprensione di come l'informazione elaborata in differenti regioni cerebrali possa essere integrata e sintetizzata nei processi a cascata del circuito chiuso. Gli aspetti aperti del circuito servono ad unificare diverse regioni cerebrali in sistemi funzionali rilevanti per specifici comportamenti. I circuiti frontali sottocorticali forniscono la cornice anatomica per i meccanismi effettori di questi

sistemi distribuiti. Gli elementi aperti dei circuiti sono sistematicamente collegati ad altre regioni cerebrali che mediano le stesse funzioni ed hanno le stesse origini filogenetiche. A livello sottocorticale, sono evidenti due sezioni citoarchitettoniche, queste sono più manifeste nel talamo, dove una è chiamata magnocellulare a causa dei più grandi corpi cellulari dei neuroni rispetto alle cellule più piccole delle regioni parvocellulari. I neuroni magnocellulari predominano nelle regioni filogeneticamente più antiche del talamo e partecipano a funzioni più primitive mediate dal sistema limbico, mentre le regioni parvocellulari sono comparse più recentemente nello sviluppo filogenetico e partecipano a funzioni cognitive acquisite più recentemente.

Per la bibliografia dei paragrafi sopra riportati si veda (Castano et al., 1995).

Scopo della Tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di individuare eventuali correlazioni fra i canali della famiglia ERG e la malattia epilettica. Le motivazioni che hanno spinto ad affrontare sperimentalmente questo argomento risiedono, da una parte, nel crescente coinvolgimento dei canali voltaggio-dipendenti nell'epilessia, dall'altra, dal fatto che i canali ERG sono altamente espressi nel SNC di topo, di ratto e sono in grado di controllare l'eccitabilità neuronale. Infine, la corrente portata da tali canali (I_{ERG}) ha delle caratteristiche simili a quelle della corrente M, il cui coinvolgimento in un tipo particolare di epilessia è stato ampiamente dimostrato (Schroder et al., 1998).

Studi di espressione relativi ai geni e alle proteine di questa famiglia sono stati condotti, nel nostro laboratorio, sul SNC di topo (Guasti et al., 2005). Una **prima parte** del lavoro oggetto della presente tesi ha avuto pertanto lo scopo di approfondire tali studi di espressione, applicandoli anche a colture organotipiche di midollo spinale, ottenute da topi sia in età embrionale che neonatale. Tali studi, nei quali è stata verificata l'espressione dei canali ERG sia a livello di m-RNA che di proteina, hanno evidenziato che tutti i geni (e le proteine) *erg* sono espressi in tali colture, seguendo un preciso pattern spazio-temporale (Furlan et al., 2005).

La **seconda parte** del lavoro oggetto della presente tesi si è più direttamente rivolta a cercare correlazioni fra i canali ERG e l'epilessia. In particolare, abbiamo studiato se l'induzione di epilessia sperimentale, ottenuta tramite l'inoculo, in animali da esperimento (topi) di acido Kainico e Pilocarpina fosse in grado di modulare l'espressione dei geni *erg* nell'ippocampo di topi così trattati. Il lavoro sperimentale si è articolato in due fasi: nella prima fase è stato asportato l'ippocampo di topi inoculati con farmaci epilettogeni (acido Kainico e Pilocarpina) e di topi inoculati con soluzione fisiologica (considerati topi di controllo); nella seconda fase l'ippocampo è stato tagliato (ad una distanza dal punto Bregma di 2.34 mm) e sono state asportate tre fette, su cui sono stati eseguiti esperimenti di Real Time PCR al fine di quantificare l'espressione dei geni *erg1*, *erg2* e *erg3*.

Nella **terza parte** del progetto, si è cercato di valutare un eventuale ruolo patogenetico del gene *herg3*, (*KCNQH7*) nella malattia epilettica. A tale scopo, è stata condotta un'analisi genetica in famiglie affette da epilessia idiopatica valutando eventuali mutazioni di tale gene. La nostra attenzione si è rivolta allo studio di *herg3* (*KCNH7*), perché esso risulta l'unico membro della famiglia *erg* ad essere espresso selettivamente e ad alti livelli nel SNC, senza alcuna espressione a livello cardiaco, come accade per *herg1* (*KCNH2*). Il protocollo sperimentale ha previsto la messa a punto di una metodica per l'analisi del DNA genomico mediante la tecnica della DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e successivo sequenziamento. È stato infine analizzato l'effetto di alcune delle mutazioni trovate sulle proprietà elettrofisiologiche della corrente e sulla localizzazione cellulare di tale canale. Ciò è stato effettuato tramite la produzione di costrutti portatori di singole o doppie mutazioni e la loro transfezione in cellule CHO.

Protocolli relativi a “Risultati: parte I”

NR-ISH

Per studi *in vitro* su colture organotipiche di midollo spinale sono state prodotte specifiche sonde per *m-erg1a* e *m-erg1b*, inserendo il cDNA fra i nucleotidi 754-1161 (accession number NM013568) e dai nucleotidi 272-373 (accession number AF012869) rispettivamente di *m-erg1a* e *m-erg1b*. Tali sequenze sono state inserite in pBluescript SK+ (Stratagene M Medical). Gli esperimenti di ibridazione in situ sono eseguiti in accordo con Polvani et al., 2003. Il plasmide contenente *m-erg1a* era tagliato con *SalI* e trascritto con T3 per la sonda antisenso e tagliato con *NotI* e trascritto con T7 per la sonda senso. Il plasmide contenente *m-erg1b* era tagliato con *HindIII* e trascritto con T3 per la sonda antisenso e con *NotI* e trascritto con T7 per la sonda senso.

Protocolli relativi a “Risultati: parte II”

Induzione di epilessia sperimentale in topi C57/BL6 e relativi controlli.

In questo esperimento sono stati utilizzati 20 topi di tipo C57 Black 6, di cui 15 trattati con acido kainico (30 mg/Kg) 5 con pilocarpina (150mg/Kg) come induttori di epilessia sperimentale e 10 trattati con soluzione fisiologica (0.9% di NaCl). Ciascuno dei topi veniva (sia di controllo, sia trattati) veniva inoculato per via intraperitoneale con 200 µl di soluzione, fisiologica/ kainato. Il comportamento degli animali veniva monitorato per 90 min. quindi erano sacrificati per asportarne l'encefalo dalla cavità cranica. Il comportamento sviluppato è stato rapportato allo score epilettico sulla base del modello proposto da Racine, 1972:

1. Immobilità
2. Estensione degli arti anteriori e/o della coda, postura rigida
3. Movimenti ripetitivi a scatti del corpo e della testa
4. Innalzamento del corpo e caduta
5. Innalzamenti e cadute continui nel tempo
6. convulsioni tonico-cloniche pronunciate
7. Morte

Asporto dell'ippocampo da encefalo di topo

I ferri utilizzati in questa operazione venivano preventivamente sterilizzati per evitare il danneggiamento dell'RNA. L'encefalo di topo viene successivamente isolato dalla cavità cranica e messo in una soluzione simile a quella del liquido cefalo-rachidiano (ACSF) refrigerata (4°) e ossigenata (95% O₂; 5% CO₂), della seguente composizione:

- 12.5 mM NaCl
- 0.25 mM KCl
- 0.125 mM Na₂HPO₄
- 0.26 mM NaHCO₃
- 20 mM Glucosio
- 2 mM CaCl₂
- 1 mM MgCl₂

L'encefalo in toto viene posizionato su vibratomo Leica VT1000s) e quindi tagliato in modo coronale, gli ippocampi venivano prelevati bilateralmente (avendo cura di eliminare la fimbria) da tre fette consecutive, spesse 300 µM; la prima fetta era presa con distanza da punto Bregma di 2.34 mm. Quando le fette ippocampali venivano isolate erano messe a congelare in isopentano e dopo a -80°C per evitare perdita di campione.

Estrazione RNA da ippocampo

L'estrazione di RNA viene eseguita attraverso i seguenti passaggi:

- Aggiungere al campione 1 ml di Trizol (per 50-100mg di tessuto)
- Omogeneizzare il campione fino a completa dissoluzione
- Incubare l'omogenato 5'
- Aggiungere 0.2 ml di cloroformio, agitare e incubare a RT per 2'-3'
- Centrifugare a 12000 rpm per 30' a 5°C
- Prelevare la fase superiore
- Aggiungere un volume di alcool isopropilico e incubare a RT per 10'; centrifugare a 12000 rpm per 15' a 5°C
- Eliminare il surnatante e aggiungere 1 ml di etanolo al 70% freddo, risospendere e centrifugare a 8000 rpm per 5' a 5°C.
- Eliminare il surnatante e far asciugare il pellet per 5' a 65°C
- Risospendere il pellet in 0.05 ml di H₂O RNAsi free
- Conservare a -80°C

I campioni venivano successivamente letti allo spettrofotometro (λ : 260 nm) per determinarne la concentrazione. Dopo questa fase 2.5-3 μg di RNA vengono trattati con 1 μl di DNAsi AMP-D1 SIGMA) per 15' a RT e successivamente l'azione dell'enzima è bloccata dall'aggiunta di 1 μl di stopo solution (che contiene dei Sali che bloccano l'attività enzimatica). Il campione, viene quindi portato a 70° per 10' e successivamente controllata la sua concentrazione allo spettrofotometro.

Retrotrascrizione

La retrotrascrizione viene fatta su 1 μg di RNA per ciascun campione con l'uso dell'enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Reagenti

- RNA
- Superscript II, RT SS II (Invitrogen)
- First strand buffer 5X (250 mM Tris-HCl pH: 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl_2)
- 0.1 M DTT
- H_2O sterile
- dNTP (Roche)
- Random examers(0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), (Invitrogen)

Protocollo

- Aggiungere al volume corrispondente ad 1 μg di RNA un volume di H_2O sterile in modo da ottenere un volume totale di 11 μl
- Aggiungere 2 μl di Random Examers
- Centrifugare
- Incubare 10' a 75°C nel termociclatore (mastercycler, eppendorf)
- Aggiungere 2 μl di H_2O sterile, 2 μl di first strand buffer, 1 μl di dNTP e 1 μl di RT SS II
- Incubare nel termociclatore:
 - 10' a 25°C
 - 30' a 42°C
 - 5' a 99.9°C

A questo punto avremo a disposizione il cDNA che verrà amplificato nella reazione di PCR. Real Time.

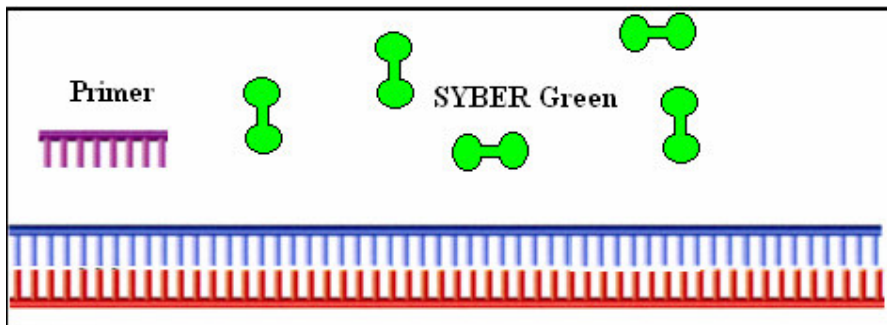
PCR Real Time

La PCR Real Time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA. A differenza della tradizionale PCR “end point”, la rtq-PCR è infatti una tecnica che consente di misurare in tempo reale la fluorescenza generata durante la reazione di amplificazione, utilizzando un termocicizzatore dotato di un opportuno dispositivo fluorimetrico. Il segnale fluorescente prodotto è proporzionale alla quantità di sequenza target e misura, quindi, la quantità della sequenza amplificata.

I metodi comuni di quantificazione includono l'uso di coloranti fluorescenti che si intercalano con il DNA a doppio-filamento (come il SYBR Green), di sonde specifiche basate su oligonucleotidi fluorofori, che diventano fluorescenti una volta ibridate con il DNA, quali i molecular beacons e le sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), di sonde “dual labeled” (come le sonde TaqMan) basate su oligonucleotidi marcati con molecole quencher.

Principi chimici del SYBR Green

Il SYBR Green è un colorante fluorescente che si intercala alla doppia elica del DNA. L'aumento della fluorescenza rilevato dallo strumento corrisponde quindi all'aumento del numero di copie dell'amplificato, ma può risentire anche della presenza di prodotti aspecifici come possono essere dimeri di primers. Nella Figura E è illustrato il principio di funzionamento della SYBR Green.



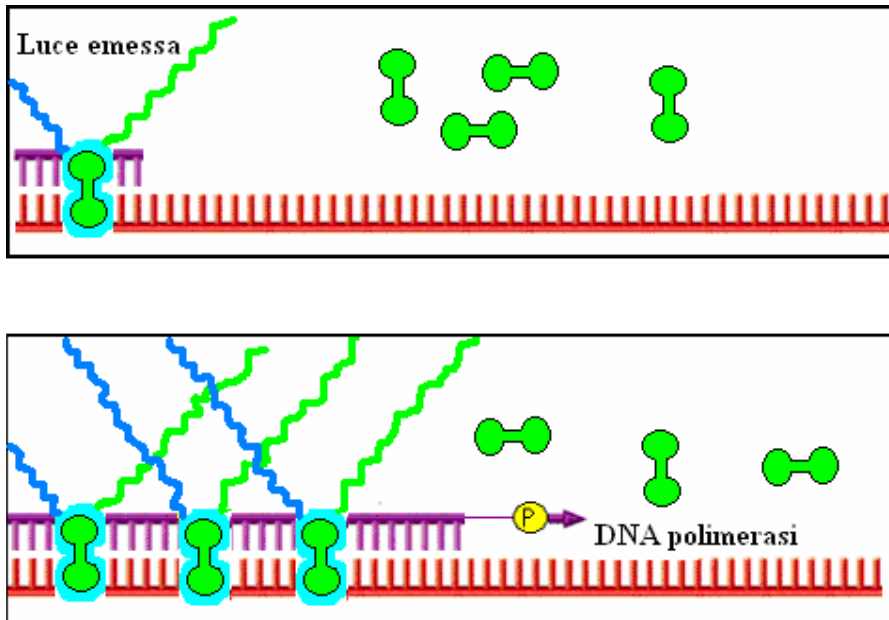


Figura E: Funzionamento del SYBR Green

Principi chimici delle sonde TaqMan

La chimica basata sull'impiego di sonde TaqMan, gode invece, di maggiore specificità. Infatti, utilizza delle sonde fluorogeniche che ibridizzano una sequenza bersaglio compresa tra le due sequenze degli oligonucleotidi primers. Ciascuna sonda è marcata con un reporter fluorescente all'estremità 5' ed un quencher all'estremità 3'. Quando la sonda è intatta la fluorescenza del reporter è soppressa dalla vicinanza del quencher. Durante la PCR, se la sequenza bersaglio è presente, la sonda ibridizza tra i due siti dei primers. L'attività esonucleasica 5'-3' della Taq DNA polimerasi degrada la sonda ibridizzata e separa i due marcatori, il reporter e il quencher. Questo permette al reporter di emettere un segnale fluorescente che può essere rilevato. Poiché viene liberata una molecola di reporter per ogni copia di DNA duplicata durante la PCR, la fluorescenza che si accumula è proporzionale in ogni momento alla quantità di prodotto di PCR specifico.

Nella figura F è illustrato il principio di funzionamento delle sonde Taq Man.

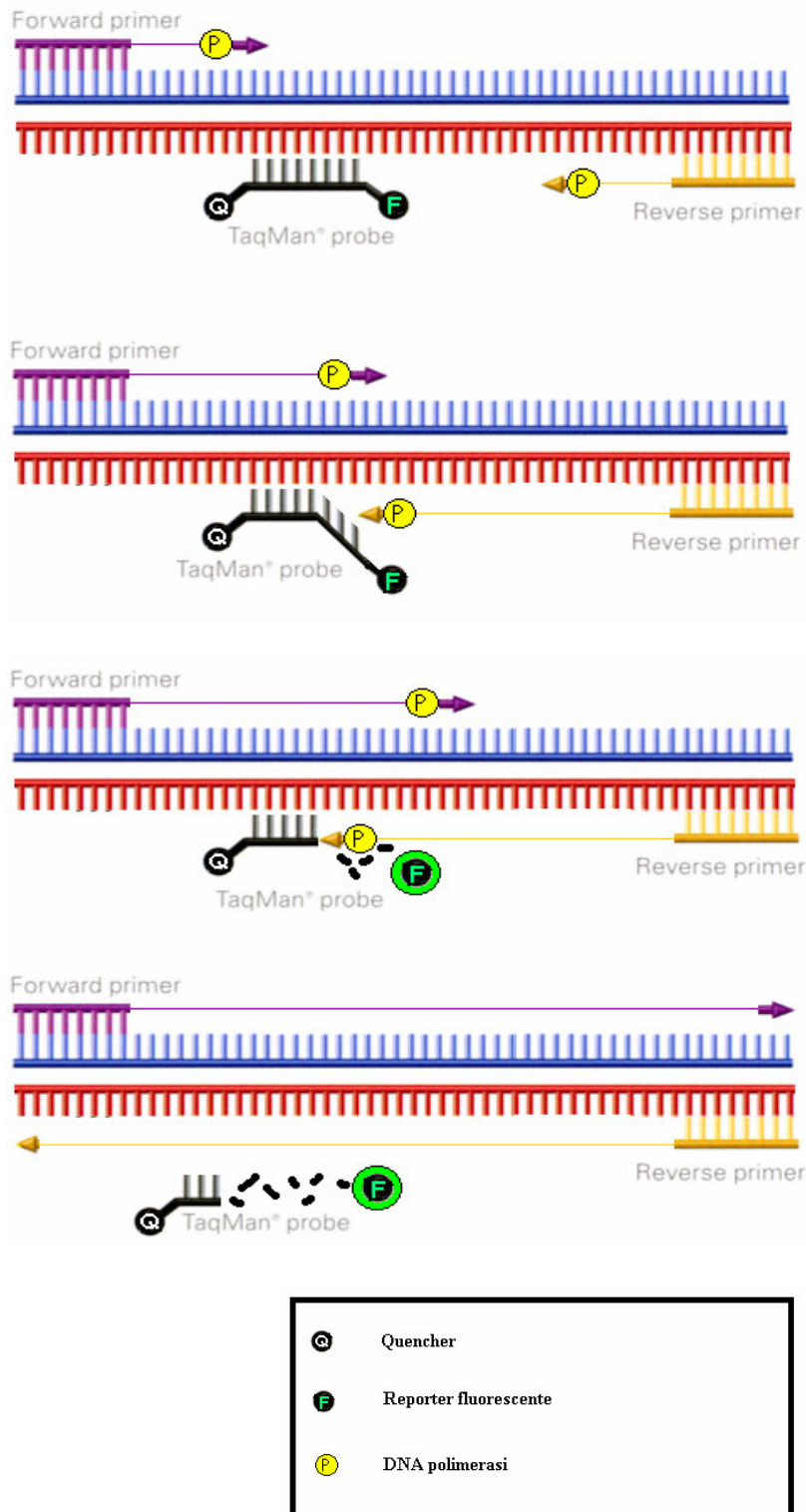


Figura F: Funzionamento della Taq DNA polimerasi.

Similmente alle reazioni di PCR, sono richiesti diversi passaggi per sviluppare un'analisi quantitativa di PCR. Questi includono:

- la produzione di templati puliti,

- il disegno di primers,
- l'ottimizzazione degli stati di reazione.

Per alcuni geni bersaglio, la scelta dei primers e le condizioni ottimizzate può essere effettuata consultando specifici database (<http://www.realtimetrprimers.org/>) o utilizzando opportuni programmi (Primer Express[®] Software for Real Time PCR).

In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione ed il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide (vedi Figura G). Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi: i dati rilevati da questa metodica sono quindi tratti dalla fase esponenziale della PCR, in cui l'efficienza di amplificazione è influenzata solo in modo minimo dalle variabili di reazione.

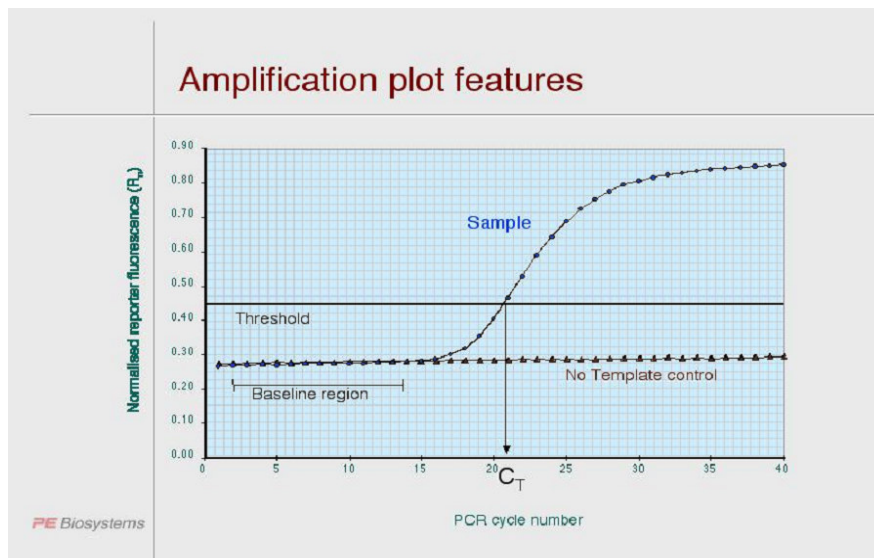


Figura G: caratteristiche della curva di amplificazione

La misura dell'intensità del segnale fluorescente, che è impiegata per la determinazione della concentrazione iniziale di DNA, è effettuata on-line durante il processo di PCR, all'interno dello strumento.

Il ciclo della PCR a partire dal quale viene rilevato un aumento significativo della fluorescenza, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è definito come ciclo soglia (C_t , vedi Figura G). Il diagramma di C_t sul DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di C_t fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR.

I prodotti di PCR possono essere quantificati generando una retta standard o essere quantificati rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. La quantificazione da PCR real-time basata su una retta standard può utilizzare DNA plasmidico o altre forme di DNA in cui la concentrazione assoluta di ciascuno standard è conosciuta. Si deve essere certi, tuttavia, che l'efficienza della PCR sia la stessa per i campioni noti e per quelli incogniti. Il metodo della quantificazione relativa è più semplice poiché richiede la quantificazione di geni di controllo o housekeeping per normalizzare l'espressione del gene studiato. Tuttavia, la selezione dei geni di controllo adatti può causare problemi poiché possono non essere espressi ugualmente in tutti i campioni incogniti. Ciò può essere risolto normalizzando le misure con un insieme di geni housekeeping per evitare tale problema di variabilità.

I vantaggi evidenti di questa tecnologia consistono nel lavorare in un sistema “chiuso” con un rischio di contaminazione molto limitato, nel ridotto lavoro manuale post PCR (non è necessario far correre i prodotti su gel d'agarosio) e nell'elevata specificità legata all'uso di sonde di ibridazione specifiche. Lo svantaggio risiede nella necessità di un elevato numero di reazioni di calibrazione e controllo, specialmente quando molti campioni devono essere quantificati.

Protocolli relativi a “Risultati: parte III”

Screening mediante rtqPCR

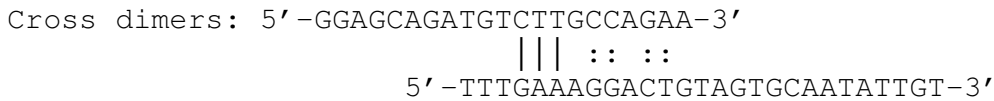
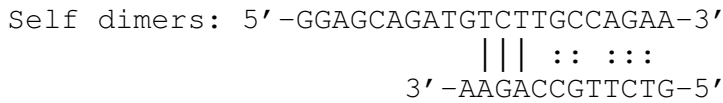
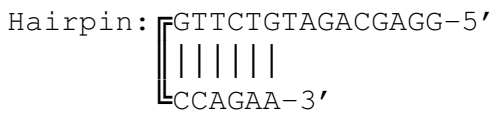
Come ulteriore screening sui campioni al fine di confermare l'effettivo KO di *m-erg3* e di valutare l'eventuale stato di eterozigosi dei restanti campioni in esame, è stata effettuata l'rtqPCR mediante l'impiego della SYBR® GREEN PCR Master Mix (*Applied Biosystem*) sul DNA estratto dai relativi cloni.

Mediante l'impiego del programma Primer Express® Software for Real Time PCR sono state disegnate tre coppie di primers specifiche per *m-erg3*. Le sequenze di tali primers, con i relativi "hairpin", "self dimers" e "cross dimers", sono le seguenti:

Prima coppia:

-*Merg3 up*: 5'-GGAGCAGATGTCTTGCCAGAA-3'

-*Merg3 down*: 5'-TTTGAAAGGACTGTAGTGCAATATTGT-3'



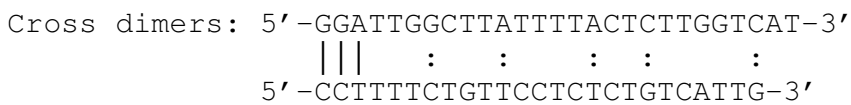
Seconda coppia:

-*Merg3 up*: 5'-GGATTGGCTTATTTTACTCTTGGTCAT-3'

-*Merg3 down*: 5'-CCTTTTCTGTTCCCTCTCTGTCATTG-3'

Hairpin: NO

Self dimers: NO



Terza coppia:

-*Merg3 up*: 5'-GCCAAAATAGCAATACACTACTTCAAA-3'

-*Merg3 down*: 5'-GATCCAAAAATCAGCAAGTCAAAA-3'

Hairpin: NO

Self dimers: NO

Cross dimers: 5'-GCCAAAATAGCAATACACTACTTCAAA-3'



Una prima rtqPCR è stata condotta allo scopo di valutare la bontà dei primers disegnati. Questa è stata effettuata in un volume finale di 12 µl su un campione controllo, una volta sottoposti a corsa elettroforetica, davano bande evidenti. La composizione della miscela di reazione è la seguente:

-6,25 µl SYBR[®] GREEN PCR Maste Mix (*Applied Biosystem*)

-Primers (vedi Tabella I)

-25 ng di campione

-H₂O a volume

Prima coppia		Seconda coppia		Terza coppia	
<i>Merg3 up</i>	<i>Merg3 down</i>	<i>Merg3 up</i>	<i>Merg3 down</i>	<i>Merg3 up</i>	<i>Merg3 down</i>
50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
50 ng	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng	100 ng
100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
100 ng	50 ng	100 ng	50 ng	100 ng	50 ng

Tabella I: Quantità di primers testate

E' stata quindi montata una piastra (96 Well Optical Reaction Plate, *Applied Biosystem*) con tutti i campioni in duplicato per ciascuna concentrazione di primers, inserendo come controllo negativo la miscela di reazione senza DNA. Una volta aliquotata la mix di reazione ed il DNA, la piastra è stata chiusa utilizzando una pellicola adesiva (Optical Adhesive Cover, *Applied Biosystem*) ed inserita nell'apposito supporto del 7500 Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystem*).

Il programma utilizzato è il seguente:

-Un ciclo 2' 50°C

-Un ciclo 10' 95°C

-40 cicli: 15'' 95°C

1' 60°C

-35 cicli: 15'' 95°C

1' 60°C, con incremento di 1°C per ciclo

La bontà dei primers è stata quindi valutata facendo la curva di melting: si tratta di un'opzione aggiuntiva del software 7500 Fast System (*Applied Biosystem*) che permette di rilevare la presenza o meno di contaminanti o di dimeri di primers nella miscela di reazione, i quali danno fluorescenza aspecifica sottoforma di picchi aggiuntivi rispetto a quello di melting.

In base alla curva di melting (vedi figura H), è stato visto che la seconda coppia di primers presentava le caratteristiche migliori e la rtqPCR effettuata con l'impiego di quest'ultima aveva la massima efficienza quando effettuata con 100 ng sia del primer up che del primer down. Ponendoci in queste condizioni, è stata quindi effettuata la rtqPCR sui campioni d'interesse, avendo cura di montare la piastra con ciascun campione in duplicato, utilizzando l'omozigote wild type come controllo positivo ed inserendo e la miscela di reazione senza il DNA come controllo negativo.

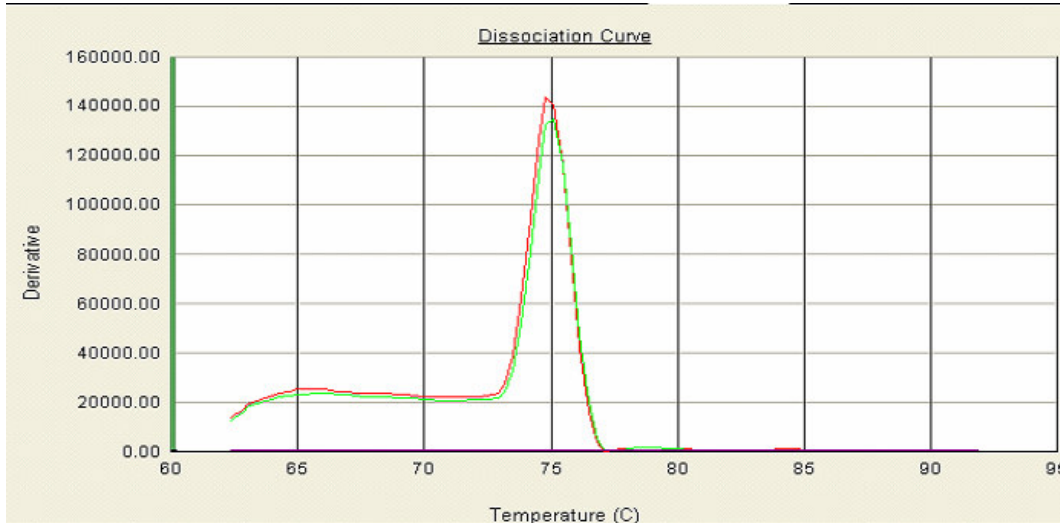


Figura H: Curva di melting relativa alla seconda coppia di primers

Estrazione DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto da una linea di linfociti B immortalizzata mediante infezione con virus di Epstein Barr (gentilmente fornitaci dal Prof. G. Basso del Dipartimento di

Oncoematologia Pediatrica dell'Università di Padova). La coltura viene mantenuta in terreno RPMI 10% FCS (Fetal Calf Serum), al 5% di CO₂ e a 37°C. Il DNA estratto da questa linea ci ha permesso di mettere a punto il protocollo di PCR, applicato a tutti i campioni analizzati.

Per eseguire l'estrazione si è utilizzato il Kit JETFLEX Genomic DNA Purification, il quale è provvisto di tutti i reagenti necessari per separare DNA ad alto peso molecolare da un'ampia varietà di campioni: sangue, midollo spinale, colture cellulari, tessuti di origine animale, tessuti vegetali, batteri (gram positivi e gram negativi) e lieviti.

I componenti del Kit sono i seguenti:

Componenti	100 prep kit (Cat.-No. 600 100)	500 prep kit (Cat.-No. 600 500)
Buffer di lisi dei globuli rossi (RBC)	33 ml	165 ml
Buffer di lisi delle cellule (CLB)	33 ml	165 ml
Buffer per la precipitazione delle proteine (PPT)	17 ml	83 ml
Buffer per dissolvere il DNA	22 ml	110 ml
Proteinasi K (20mg/ml)	2 × 21 mg	10 × 21 mg
RNase A (4 mg/ml)	4.2 mg	5 × 4.2 mg

Tutti i componenti possono essere conservati a T ambiente, eccetto gli enzimi che devono essere mantenuti a -20°C, in aliquote, per evitare numerosi cicli di congelamento e scongelamento. Quando tutti i componenti sono stati conservati a dovere, questi sono stabili per circa un anno dalla data dell'acquisto. Prima di procedere all'estrazione del DNA genomico, è opportuno eseguire la conta cellulare. A tal fine, si prende un volume noto di cellule e si utilizza la camera di Bürker. Questa possiede un reticolo costituito da 9 quadrati grandi separati l'uno dall'altro da 3 linee parallele. Ognuno dei quadrati grandi ha un lato lungo 1 mm e occupa una superficie di 1mm². Ogni quadrato grande è suddiviso in 16 quadrati minori separati l'uno dall'altro da 2 righe. Questi quadrati più piccoli hanno una superficie pari ad 1/25 di mm². L'altezza della camera, quando il coprioggetto è perfettamente aderente, è di 0.1 mm e quindi il volume del quadrato grande è pari ad 1/10 di mm³. Per il conteggio del numero delle cellule si contano almeno 3 quadrati grandi e si fa la media dei valori ottenuti. Il valore medio viene poi moltiplicato per 10 per calcolare la

concentrazione in 1 mm³ (il volume del quadrato grande è 1/10 di mm³). Infine, volendo ottenere la concentrazione/ml si moltiplica per 1000, poichè 1mL =1cm³. I procedimenti per l'estrazione del DNA sono i seguenti:

1. Si prendono 10 ml di linfociti (circa 1-2×10⁶ cellule), e si mettono in una soluzione salina bilanciata (4 ml) dentro una provetta sterile da 15 ml. Come soluzione salina abbiamo utilizzato il PBS, un tampone fosfato, la cui soluzione madre 10; è composta da: NaCl 1500 mM, NaHPO₄×7H₂O 30 mM. Essa viene diluita 1:10 in H₂O, filtrata e aliquotata in bottiglie sterili.
2. Si mette a centrifugare il tutto a 1500 rpm per 7 minuti a T ambiente per far precipitare i globuli rossi. Poi, si toglie il sovrnatante aspirandolo con una pompa a vuoto.
3. Si agita mediante vortex la provetta con il solo precipitato al fine di far staccare le cellule dalla parete, si aggiunge ancora una volta il PBS (2 ml) e si centrifuga per 8 minuti a 2000 giri (o rcf) a T ambiente.
4. Si aspira di nuovo il sovrnatante stando attenti a non toccare il precipitato e si aggiungono 3 ml di buffer CLB, spipettando bene più volte fino ad ottenere una soluzione visibilmente omogenea.
5. Si aggiungono 100 µl della soluzione RNasi (4 mg/ml) ed si incuba il tutto a 37°C per 5 min.
6. Si mettono nella provetta 1,5 ml di buffer PPT per far precipitare le proteine, si agita mediante vortex per circa 20 secondi e, di nuovo, si centrifuga a 1100 giri per 15 minuti a 4°C. Dato che le proteine non sono precipitate adeguatamente, si toglie il sovrnatante e, suddividendolo in parti approssimativamente uguali, si distribuisce in tre eppendorf da 2 ml, in modo tale da farlo centrifugare di nuovo a 1300 rpm per 8 minuti a T ambiente. Ottenuto ancora del precipitato, si prende il sovrnatante da tutte e tre le eppendorf e si trasferisce in una provetta da 13 ml.
7. A questo punto, si aggiungono 4,5 ml di isopropanolo a T ambiente, agitando più volte fino ad ottenere una soluzione omogenea ed ancora si centrifuga il tutto a 1300 rpm per 15 minuti a 4°C.
8. Si toglie subito il sovrnatante capovolgendo repentinamente la provetta e poi aspirando bene con una pipetta.

9. Si aggiungono 1,3 ml di etanolo al 70% e si centrifuga a 1300 rpm per 10 minuti a T ambiente. Infine, tolto l'etanolo accuratamente, ma senza disturbare il DNA precipitato sul fondo, si lascia aperta la provetta a T ambiente, per far evaporare tutto l'alcool.

10. Si risospende il DNA in 40 µl di Dissolving Buffer (TE) e, a questo punto, si esegue una conta allo spettrofotometro, utilizzando una lunghezza d'onda di 260 nm, per calcolarne la concentrazione. Infatti, a una data lunghezza d'onda, la quantità di energia luminosa assorbita da un dato campione è proporzionale al numero di molecole incontrate dalla radiazione (concentrazione della soluzione). Questa relazione viene convenientemente espressa dalla legge di Lambert-Beer:

$$DO_{\lambda} = K \times l \times c$$

dove DO_{λ} è la densità ottica alla lunghezza d'onda λ ; k è una costante propria della soluzione in esame; l è il cammino ottico (cioè lo strato di soluzione attraversato dal raggio luminoso); c è la concentrazione di molecole in soluzione. Dato che k e l sono sempre note, valutando la densità ottica è possibile risalire alla concentrazione della soluzione in esame.

PCR

La PCR è una tecnica utilizzata per produrre un numero estremamente grande di copie di una specifica sequenza di DNA da una miscela eterogenea. Kary Mullis, per aver messo a punto tale tecnica, ha ricevuto il Premio Nobel nel 1993. Per eseguire una PCR, è necessario disegnare due oligonucleotidi (primers) che fiancheggiano la sequenza di interesse. A tale proposito, sono fondamentali le Banche Dati elettroniche dove sono conservate tutte le informazioni sui genomi delle specie finora sequenziati.

Le tappe su cui si basa una reazione di amplificazione sono le seguenti:

1. **denaturazione** del DNA;
2. **annealing** (appaiamento dei primers al DNA);
3. **estensione** (sintesi del filamento di interesse, complementare allo stampo, da parte di una DNA-polimerasi termoresistente).

Disegno dei primers

I primers sono oligonucleotidi di 20-30 pb che mappano nella zona a monte (filamento 5'-3') e a valle (filamento 3'-5') della sequenza di interesse (primer UP e DN, rispettivamente). Nel caso del gene che abbiamo analizzato, noto come *herg3* o *kcnh7*, è stato necessario disegnare 17 coppie di primers ognuna delle quali è specifica per uno dei 16 esoni del gene di interesse. Nel disegno dei primers, abbiamo applicato alcune regole generali che hanno dovuto soddisfare sia parametri fondamentali, per avere la massima resa nella reazione di amplificazione, sia criteri necessari per l'analisi mediante DHPLC (vedi Paragrafi successivi).

1. I primers sono stati disegnati nell'introne, a distanza di circa 50 pb dall'inizio (primer UP) e dalla fine (primer DN) della sequenza dell'esone.
2. La lunghezza deve oscillare tra 20 e 30 pb.
3. Il numero di basi G e C deve essere quasi equivalente al numero di A e T.
4. Non ci devono essere sequenze in cui uno stesso nucleotide viene ripetuto più di quattro volte consecutive.
5. Non ci devono essere zone di complementarità tra i primers UP e DN o all'interno di uno stesso oligonucleotide.
6. E' opportuno che i primers terminino con G o C, oppure con doppiette o triplette di questo tipo che formano legami più stabili con il loro complementare.
7. La T di "melting" (T_M) ideale deve essere compresa tra 58°-64°C; la T_M è stata calcolata sommando 2°C per ogni legame A-T (doppio legame, richiede meno energia per formarsi) e 4°C per ogni legame G-C (triplo legame, richiede maggior energia per formarsi);
8. La T_M di un primer UP di un dato esone deve essere uguale o al più differire di 2° dalla T_M del primer DN;
9. Per l'analisi mediante DHPLC è necessario che la lunghezza della zona amplificata superi le 200 pb fino ad un massimo di 850-1000 bp. A tale proposito, nel caso dell'esone 16 (circa 870 pb), è stato necessario disegnare due coppie di primers: nella prima, il primer UP mappa nella sequenza

intronica a monte dell'esone ed il rispettivo DN nella sequenza esonica; nella seconda, l'oligonucleotide UP nella sequenza codificante l'esone, mentre il rispettivo DN nella sequenza intronica a valle dell'esone stesso.

10. Per il disegno dei primers abbiamo scaricato l'intera sequenza di *herg3*, che mappa sul cromosoma 2, dal sito internet: www.ensembl.org. Una volta disegnati i primers, ci siamo assicurati, mediante analisi in Banca Dati, che ognuno riconoscesse la sola sequenza di nostro interesse in modo da non avere prodotti aspecifici nella reazione di amplificazione.

Gli oligonucleotidi sono stati ordinati alla Ditta **Primm srl** (Milano), che ci ha mandato i campioni liofilizzati. Ognuno di questi è stato risospeso, sotto una cappa a flusso verticale, in H₂O sterile in modo tale da avere una soluzione madre 100µM. Inoltre, per ciascun primer abbiamo preparato una soluzione 10 µM, utilizzando 45 µl di H₂O bidistillata sterile e 5 µl di soluzione madre. Gli oligonucleotidi così preparati sono stati congelati a -20°C.

Reazione di amplificazione

Sono stati analizzati 20 campioni di DNA genomico proveniente da pazienti epilettici la cui famiglia presentava almeno due casi di epilessia. Tra questi erano presenti: _14 casi di epilessia idiopatica generalizzata, provenienti dal Laboratorio di Neurogenetica del Dr. F. Zara, Dipartimento Scienze Neurologiche e della Riabilitazione, IRCCS, Istituto Gaslini, Genova; _5 casi di epilessia rolandica, con la stessa provenienza dei precedenti _1 caso di BFNC, proveniente dal Dr. M. Tagliatela, Dipartimento di Scienze per la Salute, Università del Molise. Inoltre, sono stati analizzati 3 campioni di DNA di soggetti epilettici provenienti dall'Istituto Gaslini, in cui era stato dimostrato un linkage a livello della porzione del cromosoma 2 dove mappa il gene di nostro interesse.

Le reazioni di PCR sono state eseguite con il "Platinum PCR Supermix" (Invitrogen), a cui si sono aggiunti i primers (200nM), il DNA (100-150 ng) e, se necessario, H₂O bidistillata sterile per portare ad un volume di 50 µl totali. Per ogni campione si sono utilizzati 45 µl di miscela di reazione, 1µl di primer senso (primer UP), 1 µl di primer antisenso (primer DN) e, infine 2-3 µl di DNA (50 ng/µl).

Il programma di amplificazione prevedeva:

1 ciclo

1. 94°C per 2 minuti (tempo necessario affinché l'enzima si attivi);

35 cicli

1. 94°C per 30 secondi;
2. X°C per 1 minuto (T di annealing (T_A), variabile a seconda della coppia di oligonucleotidi utilizzata e che si ottiene sottraendo 4-6°C alla T_M dei primers).
3. 72°C per 1 minuto (è il tempo per l'estensione da parte della DNA-polimerasi;

1 ciclo

1. 72°C per 2 minuti (è il tempo di "extra"estensione, per sintetizzare tutti i filamenti complementari alle copie amplificate);

Le T_A, utilizzate negli esperimenti sono le seguenti:

Numero esone	T di amplificazione (°C)
1	62°C
2	56°C
3	58°C
4	52°C
5	60°C
6	56°C
7	56°C
8	58°C
9	56°C
10	56°C
11	58°C
12	56°C
13	60°C
14	54°C
15	54°C
16 I	54°C
16 II	54°C

Analisi su gel dei prodotti di PCR

Soluzioni utilizzate

- **Tampone TAE:** è costituito da Tris-acetato 40 mM ed EDTA 1 mM, pH 8; periodicamente si prepara una madre 50; e, al momento dell'uso, se ne diluisce una quantità adeguata.
- **Gel di agarosio:** si prepara un gel all'1% (peso/volume) di agarosio in tampone TAE 1; si scioglie la polvere al microonde (1 minuto e mezzo- 2 minuti) e poi si aggiungono 4 µl di Bromuro di Etidio per 100 ml di gel.

- **Buffer di caricamento:** è composto da Blu di Bromofenolo allo 0.25% e saccarosio al 40%.
- **Preparazione del campione per la corsa:** a 5 µl di prodotto di PCR si aggiungono 5 µl di H₂O bidistillata e 2 µl di buffer di caricamento 6.

Analizziamo i prodotti di amplificazione mediante corsa elettroforetica sugel di agarosio in buffer TAE, usando come riferimento uno standard di peso molecolare noto (2-Log DNA Ladder, New England Biolabs). Facciamo correre i campioni per circa 30 minuti sottoposti ad una corrente continua di 100 mA e a voltaggio non limitante. Le foto dei gel riportate in questa tesi sono state acquisite mediante un transilluminatore a UV collegato ad un sistema fotografico digitale ed un adeguato software (Kodak 1D LE 3.5).

DHPLC

DHPLC è l'acronimo di "Denaturing High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione Denaturante). Si definisce HPLC denaturante, in quanto l'ambiente cromatografico in cui avviene la separazione è denaturante per le condizioni chimiche e termiche impiegate. Numerosi studi hanno dimostrato che tale tecnica applicata al DNA, raggiunge una sensibilità che si avvicina molto al 100% rappresentando così uno strumento utile sia nel laboratorio di ricerca che nel laboratorio diagnostico nello studio di mutazioni note e/o nuove. Studi comparativi con la tecnica di analisi di conformazione polimorfica a singolo filamento (SSCP-Single Standard Conformation Polymorphism) (Choy *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 1999; Dobson-Stone *et al.*, 2000) e quella di elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Skopek *et al.*, 1999) hanno mostrato che la DHPLC ha una sensibilità superiore (Narayanaswami G. e Taylor P.D., 2001). Un fondamentale impulso al progresso nell'analisi del DNA con la cromatografia liquida è stato determinato dallo sviluppo di appropriate matrici e tamponi per l'analisi dei frammenti del DNA.

La tecnica della DHPLC ha un'alta efficienza e selettività che consente di caratterizzare differenti molecole in base a specifiche caratteristiche chimiche, chimicofisiche e steriche (dimensionali e strutturali). Il campione da analizzare viene introdotto in una colonna impaccata con materiale cromatografico (silice o materiali polimerici derivatizzati con prodotti chimici) ed eluito con tamponi o solventi. Il principio su cui si fonda è la differente interazione che le molecole da separare mostrano, sotto la modulazione chimica e meccanica dell'eluente (i tamponi), nei confronti

del materiale cromatografico. Il risultato è l'eluizione delle molecole secondo un ordine stabilito in funzione della qualità e della quantità di interazioni: la molecola, che è caratterizzata dal minor numero di interazioni, viene eluita più velocemente e di seguito tutte le altre molecole vengono rilasciate in base alla maggior interazione generata e subita. E' così possibile differenziare le molecole secondo un preciso criterio.

Le molecole devono quindi avere una minima differenza chimica o sterica, che il sistema cromatografico possa evidenziare ed utilizzare per generare differenti capacità di interazione. Nel caso della DHPLC, la differenza che si rivela è tra la molecola dell'homoduplex (in cui si ha una completa complementarità tra i due filamenti del DNA), che ad una certa T è ancora sotto forma di doppia elica, e quella dell'eteroduplex, (in cui la complementarità è incompleta a causa della presenza in uno dei due filamenti della mutazione) che, alla stessa T, mostra una parziale denaturazione, in corrispondenza del sito dove si è verificato un "mismatch". La densità di carica nelle regioni a doppio filamento è di due cariche negative per coppia di basi e si dimezza nelle regioni a singola elica. Quindi le molecole parzialmente denaturate hanno meno cariche negative e un tempo di ritenzione minore sulla matrice. La maggior proporzione della forma a singola elica nelle vicinanze delle basi che hanno subito un mismatch fa sì che gli eteroduplex vengano eluiti prima degli homoduplex. La scelta della T di denaturazione è un passaggio fondamentale nell'analisi del DNA con la DHPLC.

Componenti del DHPLC

Il primo strumento sviluppato per la metodica della DHPLC è stato quello della ditta Transgenomic (WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System). Anche altre ditte stanno attualmente cercando di ottimizzare strumenti per la metodica della DHPLC, anche se per adesso non danno le stesse garanzie offerte dal primo strumento. Le maggiori difficoltà sembrano provenire dallo sviluppo delle colonne.

La pompa

La pompa è responsabile della distribuzione del liquido e dei campioni alla colonna (la fase stazionaria del sistema di separazione), dove avviene la reale separazione. Sia le soluzioni (la fase mobile) che i campioni di DNA sono trasportati per mezzo del sistema della pompa. Il cammino del buffer comincia dai filtri, poi procede verso la valvola di separazione, la testa della pompa, il mixer e la valvola di iniezione. Le bottiglie A e B contengono le soluzioni usate per la separazione del DNA.

Piastra a 96 pozzetti per alloggiamento campioni a T controllata

Questa componente della DHPLC è fondamentale per mantenere i campioni ad una T costante con un intervallo che va dai 4 ai 60°C. Questo permette di refrigerare i campioni prima di caricarli, minimizzando così la perdita del campione in seguito ad evaporazione o degradazione.

La valvola di iniezione e l'Auto-campionatore

I campioni sono automaticamente introdotti all'interno della fase mobile dello strumento attraverso la siringa e una valvola di iniezione posizionata nell'Auto Campionatore. In esso, si possono inserire le piastre da 96 pozzetti eliminando così il caricamento manuale. L'Auto-campionatore usa un solo ago da iniezione programmabile, che trasferisce il materiale dal pozzetto del campione al foro di iniezione. Questo ago è accuratamente pulito dentro e fuori mediante un getto dopo ogni iniezione, per evitare contaminazioni crociate. L'Auto Campionatore è connesso ad una bottiglia che contiene la soluzione di lavaggio (H₂O e acetonitrile per HPLC) (AU._ 0.001 a 254nm).

La colonna e il forno

Una volta entrato nella fase mobile, il campione attraversa un filtro, la spirale di preriscaldamento, e poi la colonna. Tutti questi componenti sono posizionati nel forno. La risoluzione dei frammenti degli acidi nucleici è T dipendente. Le T utilizzate vengono definite con opportuni programmi e ottimizzate sulla base della sequenza specifica di ogni frammento da analizzare (vedi Paragrafi successivi). In generale, l'analisi dei campioni non avviene mai ad una T più bassa dei 40°C. Infatti, l'identificazione delle mutazioni avviene ad una T che va dai 55°C ai 70°C. La colonna è posizionata nel forno in modo tale che sia a T controllata.

Il detector

Dopo l'eluizione della colonna, i frammenti di DNA arrivano al detector dove sono analizzati dai raggi UV. Lo spettro di emissione rilevato al detector è compreso tra i 190 e i 600 nm. I dati raccolti dal detector sono mostrati in tempo reale sul monitor del computer.

Il computer

Ha il ruolo di controllare che tutti i componenti lavorino in modo adeguato. Il software di controllo dello strumento, il sistema HSM-HPLC, è all'interno dell'hard drive dello strumento. Questo controlla solo le funzioni dello strumento, ma anche mostra, raccoglie, analizza, conserva e richiama i dati.

L'interfaccia

Questo elemento trasferisce le informazioni avanti e indietro dal computer agli altri cinque componenti. L'informazione dal computer è trasportata da una linea GPIB (General Purpose Interface Board) e trasmessa attraverso l'interfaccia, dove sono acquisite dalla componente appropriata dello strumento. Inoltre, l'interfaccia fornisce al computer le informazioni di stato dei singoli componenti.

Schema di flusso del campione

Il campione viene trasportato da una corrente di flusso attraverso il sistema così da formare la fase mobile. La separazione dei frammenti di DNA in base alla dimensione è ottenuta mediante un diverso assorbimento tra i due liquidi e la matrice (fase stazionaria).

La fase liquida è guidata dalla pompa ad alta pressione al serbatoio del tampone, attraverso la colonna e il detector e poi nel serbatoio di scarto. Volumi variabili (2-10 μ l), a seconda della concentrazione del DNA, sono automaticamente prelevati dalla provetta del campione di DNA e iniettati nella fase mobile. Mentre questa fase viene eseguita nell'Auto-campionatore, la separazione dei frammenti avviene nella colonna analitica. I frammenti di DNA sono rivelati da un sistema di raggi UV ed il segnale analogico viene convertito in un valore digitale. I risultati sono rappresentati su un cromatogramma, nel quale i picchi corrispondono ai frammenti di DNA.

La fase stazionaria

Un passo fondamentale per lo sviluppo della DHPLC è stato quello di sintetizzare una speciale fase stazionaria [commercialmente disponibile grazie alla Transgenomic Inc., San Jose, CA con il nome di DNA Sep TM (Lin et al., 2001)]. La fase stazionaria della colonna è costituita da copolimeri alchilati non porosi di polistirene divinilbenzene, definiti particelle di PS-DVB, in grado di separare gli acidi nucleici mediante cromatografia liquida in fase inversa ione accoppiata (RT-IPHPLC). La colonna è impaccata con queste particelle che hanno un diametro uniforme di 2.1 ± 0.1 μ m, e determinano un'ampia superficie di 1-10 m²/g. Questa particolare fase stazionaria permette di

eseguire le analisi in un ampio spettro di pH (2-13) e di T (40-78°C), e inoltre permette la separazione in base alla dimensione dei frammenti di DNA a doppio filamento (dsDNA) con un grado di risoluzione ottenibile, in passato, solo con l'elettroforesi capillare (Huber et al., 1993, 1995; Xiao W. e Oefner P.J., 2001). Con tale fase stazionaria, si ha una minore diffusione delle molecole di DNA, una maggiore velocità di flusso e profili di gradiente molto ripidi. La separazione delle molecole di DNA è ottenuta grazie alla presenza di un eluente idro-organico che contiene ioni anfifilici, come lo ione trietilammonio, e piccoli controioni idrofilici come l'acetato. La ritenzione degli acidi nucleici nella RT-IPHPLC è molto simile a quella a scambio ionico (Oefner et al., 1994; Huber, 1998). Gli ioni di trietilammonio carichi positivamente sono assorbiti all'interfaccia tra la fase stazionaria non polare e la fase mobile idro-organica, determinando la formazione di un potenziale di superficie carico positivamente. La grandezza di tale potenziale è determinata da diversi fattori, tra i quali l'idrofobicità della fase stazionaria della colonna, la carica, l'idrofobicità e la concentrazione degli ioni accoppiati, la forza ionica, la T, la costante dielettrica della fase mobile e la concentrazione di modificatori organici. La ritenzione delle molecole di DNA a doppio filamento è regolata principalmente dalle interazioni elettrostatiche fra il potenziale di superficie positivo, generato dagli ioni trietilammonio assorbiti sulla fase stazionaria e il potenziale di superficie negativo, generato dai gruppi fosfodiesterici dissociati degli zuccheri fosfati della catena del DNA. Quindi le molecole a doppio filamento di DNA sono ritenute in base alla loro lunghezza. A differenza della cromatografia a scambio ionico, nella RTIP- HPLC, l'eluizione del DNA assorbito non è ottenuta mediante un gradiente di forza ionica, ma con un incremento della concentrazione del solvente organico (l'acetonitrile) nella fase mobile. Inoltre, i tempi di rigenerazione e l'equilibratura della colonna sono generalmente più corti nella RT-IP-HPLC e l'analisi a lungo termine non è affetta dall'accumulo di componenti poco eluite che necessitano di lavaggi con solventi (Katz et al., 1990). La costante equilibratura delle colonne garantisce la loro estrema precisione durante le fasi analitiche con tempi brevi (< 1 minuto) di riequilibratura tra due campioni consecutivi.

Principio di separazione dei frammenti per l'identificazione di mutazioni

Analisi in cieco hanno dimostrato che la DHPLC è una tecnica altamente sensibile e specifica per l'identificazione di mutazioni (O'Donovan M.C. et al., 1998). Ciò che si va a differenziare è la presenza degli heteroduplex e degli homoduplex nei campioni da analizzare. Un punto cruciale per il massimo successo di tale applicazione del DHPLC è l'identificazione della T della colonna che deve essere scelta con accuratezza per ogni prodotto di PCR da analizzare. In

studi precedenti (Jones A.C. et al., 1999; Underhill P.A. et al., 1997; O'Donovan M.C. et al 1998), la T della colonna veniva selezionata empiricamente, ma nonostante i buoni risultati ottenuti, l'approccio mostra numerosi svantaggi. In primo luogo, esso prevede il giudizio di un operatore, che determina una variabilità nell'analisi rendendo impossibile la valutazione della sensibilità tra laboratori diversi. Inoltre, alcuni frammenti di DNA hanno domini di denaturazione multipli, e questo è ignorato dalla procedura empirica di scelta della T (Jones A.C. et al., 1999). In seguito a tali considerazioni, la ditta Transgenomic ha sviluppato un nuovo software che predice le temperature ottimali di denaturazione per ogni frammento di DNA da analizzare con la DHPLC. Queste sono state studiate comparando la sensibilità del software della DHPLC con quella dell'analisi SSCP e dell'analisi di heteroduplex.

In base alla sequenza di DNA da analizzare, il software visualizza una curva in un grafico cartesiano nel quale sulle ascisse sono rappresentate le T e sulle ordinate la percentuale di DNA a doppio filamento. La curva sarà tanto più rettilinea quanto più piccolo sarà il frammento da analizzare e minori saranno i domini di denaturazione.

HERG3-Ex9 58.5°C	58.5°C	
HERG3-Ex10 56°C -0.1	56°C	-0.1
HERG3-Ex10 57.5°C	57.5°C	
HERG3-Ex10 59°C +0.2	59°C	+0.2
HERG3-Ex11 53°C -0.1	53°C	-0.1
HERG3-Ex11 55.5°C +0.1	55.5°C	+0.1
HERG3-Ex11 57°C +0.3	57°C	+0.3
HERG3-Ex12 53.5°C -0.1	53.5°C	-0.1
HERG3-Ex12 55.2°C	55.2°C	
HERG3-Ex12 57.1°C +0.3	57.1°C	+0.3
HERG3-Ex13 52.5°C -0.1	52.5°C	-0.1
HERG3-Ex13 56.4°C	56.4°C	
HERG3-Ex13 57.4°C +0.1	57.4°C	+0.1
HERG3-Ex14 57°C -0.2	57°C	-0.2
HERG3-Ex14 58.5°C -0.1	58.5°C	-0.1
HERG3-Ex14 60°C	60°C	
HERG3-Ex15 55°C -0.2	55°C	-0.2
HERG3-Ex15 57.5°C	57.5°C	
HERG3-Ex15 59.3°C	59.3°C	
HERG3-Ex16-1 51°C -0.2	51°C	-0.2
HERG3-Ex16-1 54.7°C	54.7°C	
HERG3-Ex16-1 57.8°C +0.4	57.8°C	+0.4
HERG3-Ex16-2 53.2°C -0.2	53.2°C	-0.2
HERG3-Ex16-2 55°C -0.1	55°C	-0.1
HERG3-Ex16-2 56.2°C +0.1	56.2°C	+0.1

Temperature di analisi scelte per il gene herg3

Analisi dei profili mutati tramite DHPLC

I campioni che sono risultati mutati per un esone al profilo ottenuto mediante DHPLC sono stati nuovamente amplificati, tramite PCR, L'amplificato è stato quindi fatto correre su gel di agarosio all'1% e la banda ottenuta relativa all'amplificato è stata purificata mediante il kit **MinElute**™ della QIAGEN. Il kit viene conservato a T ambiente (15-25°C). E' necessario che la lunghezza dei frammenti da purificare sia compresa tra 70pb e 4kb.

I componenti del kit sono:

- MinElute colonna "spin"
- Buffer PB (che contiene guanidina idrocloride e isopropanolo)
- Buffer QG (che contiene guanidina tiocianato)
- Buffer ERC (che contiene guanidina idrocloride e isopropanolo)
- Buffer PE (soluzione di lavaggio)
- Buffer EB (Tris-HCl pH8,0)
- Provette da 2 ml.

I passaggi che abbiamo seguito per la purificazione del DNA sono i seguenti:

1. Si taglia con il bisturi il pezzettino di gel con la banda di DNA di interesse e si mette nella provettina da 2 ml.
2. Si aggiungono quindi 450 µl di Buffer QG e si incuba il tutto a 50°C per 15 minuti, per sciogliere il gel.
3. Si aggiunge un volume di 150 µl di isopropanolo e, dopo inversione, si carica su una colonna con una resina che ha un'elevata affinità per il DNA.
4. Si centrifuga per 1 minuto a 13200 rpm.
5. Si aggiungono 500 µl di Buffer QG stando attenti a non toccare il filtro.
6. Si centrifuga ancora per 1 minuto a 13200 rpm.

7. A questo punto, si mettono 750 μ l di Buffer PE e si lascia il tutto in posizione verticale per 5 minuti.

8. Si centrifuga ancora per 1 minuto. La stessa operazione si ripete un'altra volta (senza aggiungere nessun reagente) per assicurarci che tutto il Buffer PE venga eliminato.

9. Si prende un'ependorf sterile e si eluisce il DNA dalla colonna,aggiungendo 10 μ l di Buffer EB, senza toccare il filtro.

10. Si mette di nuovo il tutto in centrifuga per 1 minuto. Per verificare la bontà della nostra purificazione si esegue di nuovo un'elettroforesi su gel di agarosio caricando 2 μ l di soluzione. Infine, i campioni sono stati inviati alla ditta **Primm** di Milano, che ha provveduto al sequenziamento utilizzando entrambi i primers usati nella PCR. In questo modo è stato possibile ottenere una sequenza completa sovrapponibile dei filamenti senso e antisenso. La presenza di un'eventuale eterozigosi è stata valutata mediante analisi del profilo "Cromas"; mentre un'eventuale omozigosi è stata verificata paragonando la sequenza ottenuta con quelle presenti nelle Banche Dati a nostra disposizione (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

Mutagenesi sito specifica

La mutagenesi mirata *in vitro* è un procedimento volto a generare cambiamenti a livello amminoacidico di un determinato gene. Tale tecnica rappresenta un insostituibile strumento per introdurre mutazioni, per studiare l'espressione di un gene e per studiare la relazione struttura-funzione a livello proteico.

La mutagenesi mirata mediante oligonucleotidi (mutagenesi sito specifica) è una tecnica che fu messa a punto nel laboratorio di Michael Smith. In questo procedimento si correggeva una mutazione nel DNA genomico di un batteriofago dopo aver ibridato il DNA mutante a un frammento di DNA complementare di tipo normale. Successivamente, si è dimostrato che un oligonucleotide sintetizzato per via chimica, ibridato al DNA genomico di un batteriofago, può dare luogo ad una mutazione specifica. Questi ed altri procedimenti per la mutagenesi mirata degli oligonucleotidi esigevano competenze specialistiche e all'inizio si potevano effettuare soltanto in pochi laboratori di ricerca. Il procedimento illustrato da Zoller e Smith rese relativamente immediato, per migliaia di laboratori di tutto il mondo, il compito di alterare specificamente e rapidamente la sequenza del DNA di un qualsiasi gene clonato. La chiave del successo ottenuto dal

protocollo elaborato da Zoller e Smith risiede nell'impiego del batteriofago M13 di *E. coli*. Divenne possibile clonare il DNA estraneo mutato, nella forma a doppio filamento con resa relativamente elevata.

Da quando è stata descritta per la prima volta, tale tecnica è stata perfezionata, semplificata ed ottimizzata. Ai fini della mutagenesi sito specifica si può infatti mettere a frutto la reazione a catena della polimerasi (PCR) sia per arricchire il gene mutato, sia per evitare il ricorso al sistema basato sul batteriofago M13. Tutto ciò rende questa metodica applicabile da un gran numero di ricercatori, per modificare in modo specifico migliaia di geni diversi (Zoller & Smith, 1982).

Nel nostro caso, a tale scopo, abbiamo utilizzato il kit di mutagenesi *QuickChange[®] XL Site-directed Mutagenesis Kit* (Stargene). Si tratta di un procedimento a quattro fasi con un'efficienza maggiore dell'80%, che permette di introdurre mutazioni puntiformi, microdelezioni o microinserzioni. Il metodo *QuickChange[®] XL* si basa sull'utilizzo della DNA polimerasi *PfuTurbo[®]* e di un termocicizzatore. La DNA polimerasi *PfuTurbo* replica entrambi i filamenti del plasmide con alta fedeltà senza quindi introdurre errori. La procedura di base utilizza un vettore a doppio filamento con l'inserto d'interesse e due primers oligonucleotidici sintetici contenenti la mutazione desiderata. I due primers oligonucleotidici, ciascuno complementare a un filamento del vettore, fungono da inneschi nella sintesi del DNA. Il prodotto della PCR viene poi trattato con DpnI. DpnI è un'endonucleasi specifica per il DNA metilato ed emimetilato e, dato che il DNA isolato da quasi tutti i ceppi di *E. coli* è metilato, permette di digerire il DNA stampo e selezionare il DNA contenente la mutazione (Figura A).

Nell'utilizzo del suddetto kit, per il disegno dei primers oligonucleotidici utilizzati per l'introduzione della mutazione, abbiamo seguito le linee guida esposte nel manuale allegato.

I primers impiegati per introdurre la mutazione nell'esone 4 di *herg3* sono:

UP: 5'-CGG AGA GCA TCT TCG GTC **AAT** GAT ATA GAA GG-3'

DN: 5'-CCT TCT ATA TCA **TTG** ACC GAA GAT GCT CTC CG-3'

I primers impiegati per introdurre la mutazione nell'esone 13 di *herg3* sono:

UP: 5'-GAA GAG AAA AAA **GGC** AGA TCC TCA TCT TTC ATC TCC TCC-3'

DN: 5'-GGA GGA GAT GAA AGA TGA GGA TCT **GCC** TTT TTT CTC TTC-3'

In rosso è indicata la mutazione introdotta e le T_m , calcolate secondo la formula presente nel manuale allegato al kit ($T_m = 81.5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$), sono 78° C, per i primers che mappano sull'esone 4, e 78,4°C, per i primers che mappano sull'esone 13.

Come vettore abbiamo utilizzato pcDNA 3.1 (+) (*Invitrogen*) (Appendice 1 di “Materiali e metodi”) in cui era già stata inserita nel nostro laboratorio la sequenza di *herg3*.

pcDNA 3.1 (+) *Invitrogen* è un vettore plasmidico della lunghezza di 5428 pb: il polilinker, affiancato dal promotore e dal sito di poliadenilazione, possiede diversi siti di restrizione fra i quali uno riconosciuto da Not I e uno da Apa I, che sono stati utilizzati per la clonazione di *herg3*; il gene per la resistenza all’ampicillina rappresenta il marcatore di selezione utilizzato per l’isolamento dei soli batteri trasformati con il plasmide ricombinante; il gene per la resistenza alla neomicina serve per selezionare le cellule eucariotiche trasfettate con lo stesso vettore; pUC ori è l’origine propria di replicazioni che funziona solo in *E. coli*.

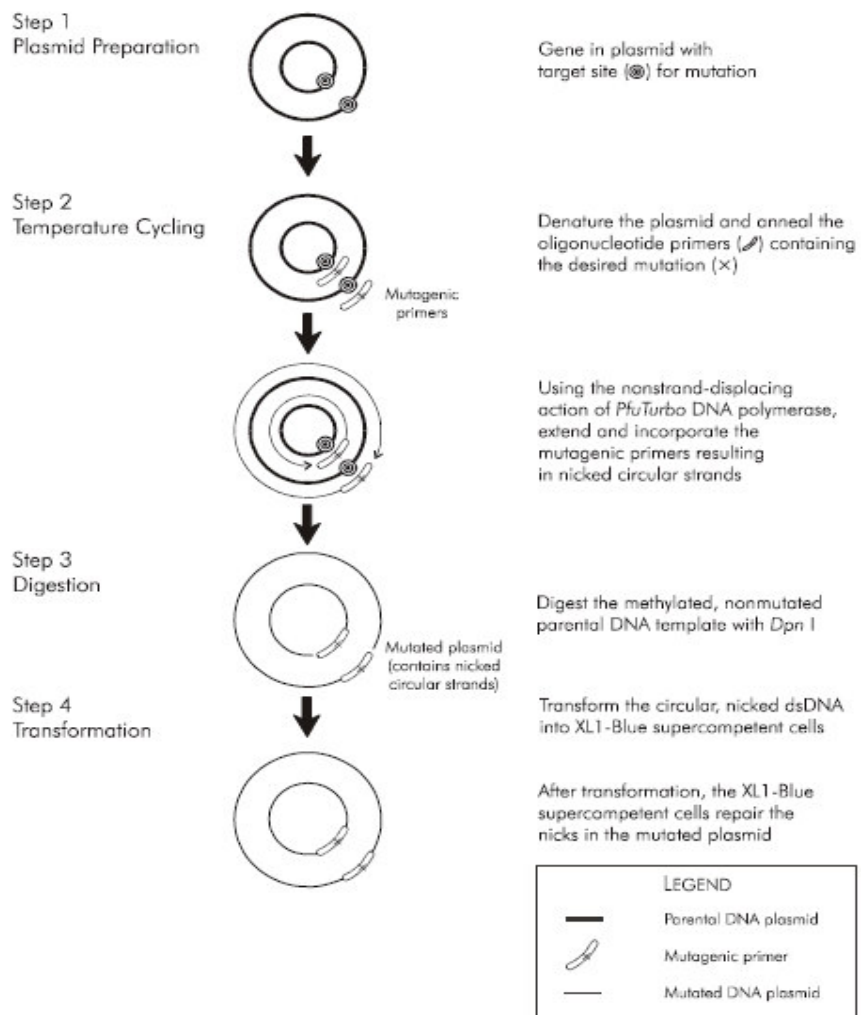


Figura A: Schema del protocollo di mutagenesi sito specifica tramite il kit Quick Change®

Trasformazione

La trasformazione è stata realizzata mediante elettroporazione: tale tecnica prevede l'utilizzo di un apparecchio, l'elettroporatore, in grado di produrre scariche elettriche ad alto voltaggio (2500 V) che rendono le pareti batteriche transitoriamente permeabili alle macromolecole di DNA.

Il mix di reazione è introdotto in un'apposita cuvetta preventivamente raffreddata in ghiaccio: vengono inoculati 50 µl di batteri appartenenti al ceppo DH5a di *Escherichia Coli*, precedentemente reso competente, e miscelati con 4 µl del prodotto di mutagenesi. La cuvetta è poi posta in ghiaccio per 1' e quindi inserita nell'elettroporatore. Una volta avvenuta la scarica si aggiungono 450 µl di terreno SOC (Tabella A) e si trasferisce il tutto in eppendorf da 1,5 ml che vengono incubate a 37° per 50' in agitazione (300 RPM). Il terreno SOC, che viene preparato a partire dal terreno SOB (Tabella A), contiene gli ioni bivalenti di Mg²⁺ che, mettendosi a ponte tra la parete batterica carica negativamente e il DNA anch'esso carico negativamente, facilitano l'ingresso del plasmide attraverso quei pori che si sono formati sulla parete in seguito alla scarica.

Successivamente, i batteri sono stati inoculati in piastre contenenti terreno Luria Bertani (LB: vedi composizione nella Tabella A) addizionato con agar (15 mg per ml di terreno LB) contenente ampicillina e incubati O/N a 37°C. Per ciascuna trasformazione si sono preparate due piastre, in cui sono state inoculate quantità diverse di batteri (100 µl e 400 µl): ciò è stato fatto ai fini di avere una maggiore probabilità di ottenere almeno una piastra con numerose colonie, ma ben isolate fra di loro e quindi facilmente identificabili e recuperabili come singoli cloni.

Il giorno successivo si sono identificate le colonie probabilmente contenenti il plasmide ricombinante. Si sono recuperate alcune di queste colonie positive e messe a crescere O/N a 37°C in agitazione (300 RPM) in 5 ml di terreno LB addizionato con ampicillina (50 mg per litro).

Il giorno successivo si è estratto il plasmide da un'aliquota (3 ml) di ciascuna coltura fatta crescere O/N, con l'utilizzo del *Promega Plasmid Mini Kit*. La restante coltura è stata congelata. I batteri vengono congelati in provette da congelamento per batteri da 1,5 ml: in ciascuna si mettono 850 µl di coltura batterica e 150 µl di glicerolo.

Per verificare quali colonie contenessero effettivamente il plasmide ricombinante si è tagliato il DNA plasmidico estratto con EcoRI. E' stato scelto questo enzima di restrizione perché taglia solo tre volte all'interno del costrutto di interesse (due volte all'interno dell'inserto *herg3* e una volta nel plasmide) dando origine a tre prodotti di diversa lunghezza e ben distinguibili tra di loro in seguito a corsa elettroforetica su gel d'agarosio: 707 pb, 1100 pb e 970 pb.

La reazione di taglio è stata effettuata in un volume totale di 25 µl e prevedeva l'utilizzo del buffer specifico per EcoRI (10X Buffer NEB U: *New England Biolabs*). La reazione di taglio aveva quindi la seguente composizione:

- 8 µl di DNA

- 2,5 µl 10X NEB U
- 1 µl di EcoRI
- 13,5 µl di H₂O

Le reazione è stata quindi incubata 2 h a 37°C e quindi sottoposta a corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1% in Buffer TAE (tris acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8.0). Come standard di riferimento è stato utilizzato lo standard "2 log DNA Ladder (0,1-10 Kb)" New England Biolabs.

Il DNA plasmidico delle colonie ricombinanti è stato quindi mandato a sequenziare alla ditta PRIMM.

Per il sequenziamento sono necessari 1 µg di DNA alla concentrazione di 0,150 µg/µl ed è poi necessario inviare la sequenza dei primers da utilizzare. Nel nostro caso:

-Per l'esone 4: 5'-CAG TCA AGT TCC CAG CTG TCC-3' (54 pb a monte della mutazione sull'esone 4 di *herg3*).

-Per l'esone 13: 5'-CAG CTT CGC ATG TCA GTG ATA TC-3' (167 pb a valle della mutazione sull'esone 13 di *herg3*).

In seguito ai risultati di sequenziamento, abbiamo posto a crescere O/N a 37°C i batteri di una delle colonie positive per poter procedere il giorno successivo all'estrazione del DNA plasmidico mediante il *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (pre-inoculo 100 µl in 5 ml di LB+amp; inoculo 100 µl di batteri in 50 ml di LB+amp).

Questo kit, eluendo il DNA per gravità e non per centrifugazione, permette di ottenere un livello di purezza del plasmide compatibile con la trasfezione in cellule eucariotiche.

Inoltre, sul costrutto plasmidico pcDNA 3.1 (+)-*herg3* mutato nell'esone 4, abbiamo fatto un secondo test di mutagenesi mirata allo scopo di introdurre la mutazione nell'esone 13, utilizzando i primers impiegati precedentemente descritti. Quindi, abbiamo proceduto allo stesso modo per la trasformazione e il sequenziamento

Nome del terreno	Composizione per litro
Terreno SOB	10 g Bacto-tryptone 5 g yeast extract 0,5 g NaCl
Terreno SOC	998 ml Terreno SOB

	1 ml MgCl ₂ 1 M 1 ml MgSO ₄ 1M
Terreno LB	10 g Bacto-tryptone 5 g Bacto-yeast extract 10 g NaCl

Tabella A: Composizione terreni

Trasfezione

Lo studio della regolazione e dell'espressione di geni eucarioti ha subito un forte impulso negli ultimi anni grazie allo sviluppo di tecniche che permettono l'introduzione degli acidi nucleici all'interno di cellule di mammifero, mediante metodiche sia fisiche che chimiche in un processo definito "trasfezione". La possibilità inoltre, di introdurre nuovi geni o modificare quelli già esistenti *in vivo*, permette la costruzione di modelli animali utili per la comprensione delle basi molecolari di malattie umane di difficile studio.

La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta trasfettato, verrà mantenuto nel citoplasma da molte cellule per un determinato periodo di tempo, in genere 2-3 giorni (trasfezione transiente) mentre, solo in pochi casi, verrà integrato nel genoma cellulare (trasfezione stabile). L'isolamento di questi ultimi tipi cellulari e della loro progenie richiede la selezione mediante un gene marcatore (come il G418: un antibiotico che agisce sugli eucarioti interferendo con la subunità ribosomiale 80 S e inibendo in tal modo la sintesi proteica) presente nel DNA esogeno, che consente alle cellule trasformate di crescere in un terreno selettivo.

Durante le 48 ore successive alla trasfezione, i geni esogeni sono soggetti a molte delle attività regolative che controllano l'espressione del materiale cromosomico della cellula. Nel periodo successivo, verranno invece progressivamente persi dalla maggior parte delle cellule per una combinazione di fenomeni di degradazione e diluizione, giacchè il DNA non integrato non è solitamente duplicato con il materiale cromosomico della cellula ospite.

L'introduzione di geni in cellule di mammifero è in generale un processo di per sé inefficiente, perchè necessita di una fonte abbondante di cellule di partenza per poter ottenere, al termine dell'esperimento, un numero utilizzabile di cellule trasfettate. E' solo grazie alla disponibilità di linee cellulari di mammifero capaci di crescere indefinitamente in coltura che gli esperimenti di trasferimento genico sono diventati una pratica comune in laboratorio.

Un metodo ideale di trasfezione di geni o macromolecole d'interesse all'interno di cellule eucariotiche dovrebbe mostrare le seguenti caratteristiche:

- a. alta efficienza di trasferimento;
- b. bassa tossicità;
- c. riproducibilità in esperimenti *in vitro* e *in vivo*.

Le varie metodiche oggi utilizzate soddisfano questi criteri, ognuna con vantaggi e limiti.

Come è ormai noto le cellule non sono in grado di captare naturalmente il DNA, in quanto durante il corso dell'evoluzione sono stati messi a punto degli artifici per impedire l'entrata di DNA esogeno (barriere fisiche quali la membrana cellulare, sistemi di difesa intracellulari rappresentati da cascate enzimatiche pronte a degradare il materiale estraneo, eccetera). Al fine quindi di aggirare le barriere naturali poste al trasferimento genico sono stati impiegati numerosi espedienti tecnici. Queste metodiche comprendono metodi chimici, fisici e lipidi cationici.

L'utilizzo dei reagenti chimici per la trasfezione è stato introdotto nel 1965 con la scoperta del DEAE-Destrano, un polimero cationico che si lega strettamente ai gruppi fosfato del DNA carichi negativamente. Queste grosse particelle contenenti il DNA aderiscono alla superficie delle cellule e vengono introdotte al loro interno mediante un processo di endocitosi. Questo metodo, sebbene tecnicamente semplice, risulta poco efficiente per molti tipi cellulari, e quindi poco affidabile per saggi di routine dell'attività biologica di una preparazione di DNA purificato.

Un'altra metodica di tipo chimico consiste nella coprecipitazione con fosfato di calcio, tecnica introdotta nel 1970 dopo la scoperta che le cellule sono in grado di captare in maniera efficiente il DNA sotto forma di un precipitato di questo sale.

Entrambi i metodi chimici descritti sono poco dispendiosi e garantiscono una moderata efficienza di trasfezione in numerosi tipi cellulari. Tuttavia, presentano alcuni svantaggi: sono infatti abbastanza tossici (soprattutto la metodica del DEAE-Destrano); sono soggetti ad un'efficienza variabile (i linfociti, che crescono in sospensione, sono particolarmente resistenti a queste procedure) e non sono adatti per esperimenti di trasferimento genico *in vivo*. Inoltre il DEAE-Destrano può essere utilizzato solo per trasfezioni transienti in cui il campione viene testato 72 ore dopo l'introduzione del DNA esogeno nelle cellule. È stato quindi necessario mettere a punto differenti metodiche in grado di assicurare efficienze di trasfezione elevate anche in tipi cellulari poco sensibili alla trasfezione con le due metodiche chimiche sopra citate.

I metodi fisici sono stati introdotti recentemente e hanno dato risultati soddisfacenti: questi sono rappresentati dalla microiniezione e dalla elettroporazione.

La microiniezione permette l'introduzione diretta di acidi nucleici (DNA o RNA) nel nucleo o nel citoplasma della cellula, attraverso l'ausilio di un elettrodo con una punta molto fine, montato su uno specifico microiniettore. Nonostante l'elevata efficienza, tale metodo non viene utilizzato spesso a causa dei costi non indifferenti dell'apparato e delle difficoltà tecniche.

Nell'elettroporazione, le cellule, poste in una soluzione contenente il DNA, sono sottoposte ad un breve impulso elettrico che produce pori transitori nelle membrane, attraverso cui il DNA esogeno può entrare. Tale tecnica richiede però un numero molto elevato di cellule di partenza, a causa dell'elevato tasso di mortalità cellulare che si osserva nel corso degli esperimenti.

La trasfezione mediata da lipidi cationici si inserisce nel campo delle tecniche chimiche di trasferimento genico. La testa cationica del composto lipidico si associa strettamente con la carica negativa dei gruppi fosfato degli acidi nucleici. I complessi lipidi/DNA-RNA si associano per poi fondersi con le membrane cellulari, e vengono così internalizzati nella cellula. Tale metodica è molto vantaggiosa per numerose ragioni: il DNA viene rilasciato efficientemente in diversi tipi cellulari, i liposomi sono semplici da utilizzare in quanto non richiedono apparati o accorgimenti particolari, e sono impiegati con successo in studi di trasferimento genico *in vivo*.

Nel nostro caso la trasfezione è stata fatta sulle cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) utilizzando il kit *LipofectamineTM Reagent* e sulla linea cellulare HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) utilizzando il kit *LipofectamineTM 2000 Invitrogen*.

Le cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) sono una linea cellulare di tipo epiteliale prodotta nel 1957 da Puck e colleghi nel Dipartimento di Biofisica dell'Università del Colorado a Denver (Puck et al.: 1958), a partire da una biopsia ovarica di un esemplare adulto di Chinese Hamster (*Cricetulus griseus*). Queste cellule hanno la necessità assoluta della presenza di prolina nel mezzo di coltura (Kao & Puck, 1968) per la mancanza del gene per la prolina sintetasi: il blocco nella biosintesi di prolina avviene nel passaggio in cui avviene la conversione dell'acido glutammico nella γ -glutammina-semialdeide.

Esistono molti subcloni commerciali utilizzabili della linea cellulare CHO (vedi Tabella B) e molti costrutti cellulari derivati dalle CHO che esprimono certe caratteristiche (Gamper et al.: 2005).

Name	Phenotype	Description	Medium
A2	Epithelial	Overproduces ornithine decarboxylase in response to polyamine deprivation	EMEM (EBSS) + 2 mM glutamine + Hamm's F12 (without putrescine) (1:1)+0.1% BSA

A2H	Epithelial	A reclone of "Clone A" established by Puck (the "H" denotes MRC Harwell)	EMEM (EBSS) + 2 mM glutamine + 1% non-essential amino acids + 10% FBS
CHO	Epithelial	A subclone of the parental CHO cell line originated by Puck in 1957	Hamm's F12 + 2 mM glutamine + 10% FBS
CHO clone 13	Fibroblast/epithelial-like		Hamm's F10 + 10% FBS
CHO clone B	Fibroblast/epithelial-like	Selected for MNNG resistance	Hamm's F10 + 10% FBS
CHO-DHFR	Epithelial-like	Subclone of the original CHO cell line (1957); the cells are dehydrofolate reductase negative	90% alpha-MEM + 10% FBS + 2 mM l-glutamine
CHO-K1	Epithelial	A subclone from the parental CHO cell line by T. T. Puck in 1957	Hamm's F12K medium with 2 mM l-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate + 10% FBS
CHO MT+	Fibroblast/epithelial-like		Hamm's F10 + 10% FBS
Pro-5	Epithelial	The cells are proline auxotrophs and must be grown in a medium that contains proline (40 mg/L)	Alpha minimum essential medium with ribonucleosides and deoxyribonucleosides + 10% FBS
RP-CHOK1	Epithelial	Derived from the parent line CHO-KI and is resistant to ionising radiation and UV irradiation	Hamm's F12 + 2 mM glutamine + 10% FBS
CHO-protein free	Epithelial	The cells have been adapted for growth in sigma CHO protein free medium (C5467)	Sigma CHO-protein free medium + 2 mM glutamine
UV41, UV20, UV2, UV42, UV135	Fibroblast	Derivatives of the CHO-K1 cell line, UV-sensitive mutants of CHO	Alpha minimum essential medium with ribonucleosides and deoxyribonucleosides + 10% FBS

Tabella B: Subcloni commerciali utilizzabili della linea cellulare CHO

Le cellule CHO da noi utilizzate sono cellule che crescono in adesione adattate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% siero FCS (Fetal Calf Serum), 1:500 glutammina, a 37°C, in una atmosfera 5% CO₂, 95% ossigeno.

La linea cellulare HEK293 è stata prodotta trasformando una coltura di normali cellule umane embrionali di rene con l'adenovirus umano 5 nel laboratorio di Frank Graham nel 1970 (Graham et al.: 1977). Analisi successive hanno dimostrato che la trasformazione era avvenuta grazie

all'inserzione di un inserto di 4,5 Kb derivato dal braccio sinistro del genoma virale (Louis et al.: 1997). Come qualsiasi altra linea cellulare trasformata sperimentalmente, le cellule HEK non sono un modello attendibile di cellule normali, di cellule tumorali o di qualsiasi altro tipo cellulare che costituisca l'oggetto fondamentale di una ricerca. Tuttavia, sono cellule con cui è particolarmente facile lavorare, facilmente coltivabili e trasfettabili, e che possono quindi essere impiegate in tutti quegli esperimenti in cui il comportamento stesso delle cellule non interessa.

Le HEK sono cellule in adesione coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 10% siero FCS (Fetal Calf Serum), 4 mM glutammina, a 37°C, in una atmosfera al 5% di CO₂, al 95% di ossigeno.

Per effettuare la trasfezione le cellule devono essere diluite 24 h prima, in modo da essere nella fase esponenziale della curva di crescita; al momento della trasfezione, devono presentare una confluenza dell' 80% e non presentare aggregati che altrimenti potrebbero ostacolare la corretta diffusione a tutte le cellule dei complessi lipofectamine-DNA.

Sulle CHO sono state effettuate 4 trasfezioni:

- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* wild type
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* mutato nell'esone 4
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* mutato nell'esone 13
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* mutato negli esoni 4 e 13.

In ogni caso, la trasfezione è stata effettuata su piastre petri da 35 mm in terreno Opti-MEM[®] senza siero, a 5 h dalla trasfezione è stato cambiato il terreno e sostituito con il loro abituale terreno con siero.

Sulle cellule HEK293 sono state effettuate 5 trasfezioni:

- una con l'utilizzo del plasmide pcDNA 3.1 (+) vuoto
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* wild type
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* mutato nell'esone 4
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* mutato nell'esone 13
- una con l'utilizzo del costrutto pcDNA 3.1 (+) + *herg3* mutato negli esoni 4 e 13.

In ogni caso, la trasfezione è stata effettuata su piastre petri da 35 mm; a 24 h dalla trasfezione è stato cambiato il terreno in modo da eliminare le lipofectamine che alla lunga potevano risultare tossiche per le cellule.

Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica immunoistochimica, che consente di individuare antigeni tissutali e cellulari, ponendoli a contatto con i loro specifici anticorpi coniugati con un marcatore fluorescente, come la fluoresceina o altre sostanze analoghe. La fluorescenza si basa sul principio per il quale in un atomo colpito da una radiazione ultravioletta, un elettrone dello strato esterno si eccita. L'elettrone, ritornando al suo stato fondamentale, emette un fotone. L'energia e quindi la frequenza emessa, è minore di quella assorbita perché parte dell'energia è dispersa sottoforma di calore. Una reazione che sfrutta l'immunofluorescenza può essere rilevata tramite specifici apparecchi come il microscopio a fluorescenza e il citofluorimetro a flusso.

La fluorescenza può essere di due tipi:

- fluorescenza primaria: è il substrato stesso ad essere fluorescente; negli organismi, soprattutto piante e invertebrati, ci sono molte molecole che risultano fluorescenti se eccitate dai raggi ultravioletti;

- fluorescenza secondaria: la fluorescenza è indotta da sostanze, dette fluorocromi, che legati ad un determinato substrato emettono fluorescenza.

Nel secondo caso, esistono due metodiche fondamentali per andare a rilevare la presenza di uno specifico antigene:

- la tecnica diretta: è il metodo più semplice per localizzare un antigene e si basa sull'utilizzo un anticorpo diretto specificamente contro di esso, coniugato con un marcatore che ne permetta l'identificazione come un fluorocromo, un enzima o una sostanza elettrolitica.

- la tecnica indiretta, che prevede invece l'utilizzo di un anticorpo primario non marcato diretto contro l'antigene d'interesse e di un anticorpo secondario marcato diretto contro la porzione costante dell'anticorpo primario.

Nel nostro caso è stata impiegata la tecnica indiretta per valutare, mediante osservazione al microscopio a fluorescenza, la localizzazione di hERG3 sulle linee cellulari trasfettate di CHO, utilizzando la linea cellulare non trasfettata come controllo negativo. Inoltre, sulle stesse cellule è

stata utilizzata anche la tecnica diretta per rilevare la localizzazione dell'integrina $\beta 1$. L'analisi per valutare l'espressione in membrana di hERG3 wt e dei vari costrutti presenti è stata effettuata utilizzando il Software ImageJ.

Reagenti

- Fibronectina alla concentrazione di 0,415 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- DMEM senza siero con glutammina diluita 4 mM
- DMEM, 10% siero, glutammina 4 mM, G418 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- PBS 1X (per un litro di PBS 10X: 80 g NaCl; 2g KCl; 14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2g KH_2PO_4).
- Formaldeide al 4% in PBS 1X (PFA)
- Soluzione di glicina 100 mM in PBS 1X
- Triton X-100 0,1% in PBS 1X (T-PBS)
- NGS (Normal Goat Serum *Sigma*) 3% in T-PBS
- Anticorpo primario anti-hERG3
- Anticorpo primario anti- $\beta 1$ rodaminato (*Chemicon*)
- Anticorpo secondario anti-rabbit fluoresceinato (*Chemicon*)
- Etanolo
- Mowiol, montante permanente per i campioni in immunofluorescenza (2,3 g di Mowiol 4-88 in 6 ml di DDW; aggiungere 12 ml di Tris HCl (0,2 M pH 8,5), 6 g di glicerolo; scaldare a 50°C per 10'; centrifugare a 5000 g per 15'; aliquotare e conservare a -20°C; centrifugare prima dell'uso).

Protocollo utilizzato

Fase 1

Tutti i passaggi della fase 1 devono essere effettuati sotto cappa a flusso verticale e le soluzioni utilizzate devono essere sterili per evitare eventuali contaminazioni.

- Flambare i vetrini e riporli nelle piastre petri da 35 mm: 3-4 per piastra. Per l'immunofluorescenza le cellule devono essere infatti adese su vetro per evitare l'autofluorescenza della plastica.
- Diluire la fibronectina nel DMEM, senza siero con glutammina 4 mM, fino ad una concentrazione finale di 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Questa soluzione permette di realizzare un coating sui vetrini che facilita l'adesione delle cellule. Alternativamente, si può

impiegare collagene, polilissina o qualsiasi altro adesivo che non interferisca con l'esperimento.

- Ricoprire ciascuno vetrino con 50 µl della soluzione di coating.
- Incubare i vetrini per 2 h a temperatura ambiente.
- Aspirare la soluzione di coating.
- Lavare 2 volte con PBS 1X.
- Piastrare le cellule nelle piastrine contenenti i vetrini.
- Incubare per 24-48 h a 37° C 4% CO₂.

Fase 2

Da questo momento in poi si possono effettuare tutti i passaggi fuori dalla cappa a flusso laminare perché non c'è più il rischio delle contaminazioni.

- Effettuare 2 lavaggi con PBS 1X per togliere il terreno.
- Fissare con paraformaldeide al 4% in PBS 1X (PFA). La fissazione ha lo scopo di preservare il campione e mantenerne inalterata la morfologia, di impedire la solubilizzazione dell'antigene e di proteggere il campione dai danni osmotici. La PFA in particolare, come altri fissativi aldeidici (glutaraldeide), determina cross-linking delle proteine, formando ponti idrossi-metilenici tra i gruppi amminici. Questo, se da una parte può ridurre l'antigenicità del campione, dall'altra garantisce il mantenimento in sede anche di piccole proteine.
- Incubare 10' a temperatura ambiente.
- Aspirare la PFA.
- Lavare 3 volte con PBS 1X.
- Lavare 10' con la soluzione di glicina 100 mM in leggera agitazione: questo passaggio si fa per ridurre l'auto-fluorescenza indotta dalle aldeidi nel campione.
- Lavare con PBS 1X 2 volte per 5' in leggera agitazione.
- Permeabilizzare le cellule con Triton X-100 0,1% in PBS (T-PBS) per 10'. Questo passaggio viene eseguito per le proteine citoplasmatiche.
- Lavare con T-PBS 2 volte per 5' in leggera agitazione.
- Saturazione dei siti di legame aspecifici con NGS 3% in T-PBS per 10'. Questo passaggio permette, mediante l'utilizzo di una soluzione proteica inerte, di saturare i siti carichi e di evitare l'eventuale adsorbimento dell'anticorpo primario.
- Aspirare la soluzione.
- Lavare con T-PBS 2 volte per 5' in leggera agitazione.
- Trasferire i vetrini su appositi supporti.

- Mettere 50 µl per vetrino di soluzione contenente l'anticorpo primario anti-β1 rodaminato diluito 1:200 e l'anticorpo primario anti-hERG3 a due diluizioni diverse per ciascuna tipologia cellulare presente: 1:200, 1:400. La diluizione degli anticorpi viene fatta in T-PBS 3% NGS.
- Incubare O/N a 4°C.

Fase 3

- Eliminare gli anticorpi primari sgocciolando il vetrino.
- Rimettere i vetrini in piastrine diverse.
- Lavare con T-PBS 3 volte per 5' in leggera agitazione.
- Trasferire nuovamente i vetrini sugli appositi supporti.
- Mettere 50 µl per vetrino di anticorpo secondario anti-rabbit fluoresceinato diluito 1:200 nella soluzione di ibridazione.
- Riporre al buio e incubare 45' a temperatura ambiente.
- Rimettere i vetrini nelle piastrine.
- Lavare con T-PBS 5 volte per 5' in leggera agitazione.
- Lavare i vetrini portaoggetti con Etanolo.
- Montare i vetrini con il Mowiol.
- Lasciar asciugare a temperatura ambiente al buio O/N.
- Conservare poi a 4°C al buio ed osservare con il microscopio a fluorescenza

Studi elettrofisiologici

La tecnica del patch-clamp fu messa a punto nel 1976 da Erwin Neher e da Bert Sakmann su fibre muscolari scheletriche e successivamente perfezionata e applicata a numerosi tipi di cellule, nervose e non. Tale tecnica consente la registrazione di correnti di singoli canali ionici mediante l'utilizzo di una micropipetta riempita di una soluzione salina simile a quella dei liquidi extracellulari. La pipetta viene posta a stretto contatto con la membrana cellulare sulla quale viene esercitata una leggera suzione: si ottiene in tal modo un'aderenza tale che la resistenza fra l'interno e l'esterno della pipetta diventa elevatissima, riducendo notevolmente il rumore elettronico di fondo. La corrente che passa attraverso i canali ionici che stanno nel tratto di membrana immediatamente sottostante al microelettrodo viene misurata in un apposito circuito elettronico connesso con l'elettrodo metallico immerso nella soluzione di elettroliti presente nella micropipetta.

La configurazione per il patch-clamp appena descritta corrisponde a quella "cell-attached", nella quale la parte esterna della membrana viene a contatto con il fluido dentro la pipetta. Se si isola la porzione della membrana, passiamo alla configurazione "inside-out", nella quale lo strato interno della membrana viene a contatto con il liquido di perfusione. Se invece si aumenta il grado

di suzione della micropipetta sulla membrana, passiamo alla configurazione “whole-cell”, in cui, dal momento che si viene a creare una continuità fra le due, la soluzione della pipetta entra direttamente dentro la cellula. Infine, se sulla membrana si applica una tensione ancora maggiore, si ottiene la configurazione “outside out”, nella quale le due estremità di membrana si rilegano rivolgendo alla pipetta il lato interno. A seconda del tipo di indagine elettrofisiologia condotta, viene scelta una di queste quattro configurazioni. Nel nostro caso, gli studi elettrofisiologici sono stati condotti in configurazione “whole cell”.

L'utilizzo di una linea cellulare come sistema d'espressione da impiegare in studi elettrofisiologici di canali ionici richiede alcuni criteri di base quali:

1. omogeneità delle dimensioni, della forma e di altre proprietà cellulari intrinseche;
2. buona efficienza di espressione;
3. accessibilità per l'introduzione delle pipette da patch;
4. basso background (deboli correnti ioniche endogene);
5. capacità di sopravvivere durante gli esperimenti di patch clamp.

Attualmente, le linee cellulari più popolari che posseggono molte delle caratteristiche sopra menzionate sono le cellule HEK293, COS e CHO (Nikita et al. 2005).

Nel nostro caso abbiamo utilizzato le cellule HEK293 trasfettate come sopra descritto e gli studi elettrofisiologici sono stati condotti in collaborazione con il laboratorio del Professor Enzo Wanke del Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'Università Milano-Bicocca.

Durante gli esperimenti di patch-clamp le cellule sono state mantenute in una soluzione esterna standard NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, Hepes-NaOH 10 mM, D-glucosio 5 mM., a pH 7.40.

Durante le specifiche indagini elettrofisiologiche, le cellule sono state perfuse con una soluzione ad alta concentrazione di K⁺ ([K⁺]₀=40 mM), in cui il NaCl era stato sostituito con una quantità equimolare di KCl. La pipetta conteneva invece una soluzione interna K⁺-aspartato 130 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA-KOH 10 mM, HEPES HOH 10 mM, una [Ca²⁺]_i nominale ~50 nM, a pH 7.30. Immediatamente prima degli esperimenti, un'appropriata quantità di tossine in H₂O opportunamente scelte in modo da isolare la corrente relativa ad hERG sono state disciolte nella soluzione extracellulare. Nel caso poi in cui fosse presente una corrente contaminante di K⁺, veniva utilizzato lo specifico bloccante di ERG, WAY123,398 (Spinelli et al.: 1993), ad una concentrazione 2 μM e la traccia risultante è sottratta dalle tracce di controllo in modo da ottenere la corrente WAY123,398-sensibile.

Le correnti ERG sono state sempre analizzate in condizioni di relativamente alta $[K^+]_0$ (40 mM), dal momento che a tal fine queste corrispondono alle condizioni ottimali di registrazione. Le correnti sono state registrate a temperatura ambiente mediante l'utilizzo della Multi Clamp 700A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), come descritto precedentemente da Oliveira et al. (2004). La resistenza fra l'interno e l'esterno della pipetta durante gli esperimenti era approssimativamente tra 1,5 e 2,2 M Ω .

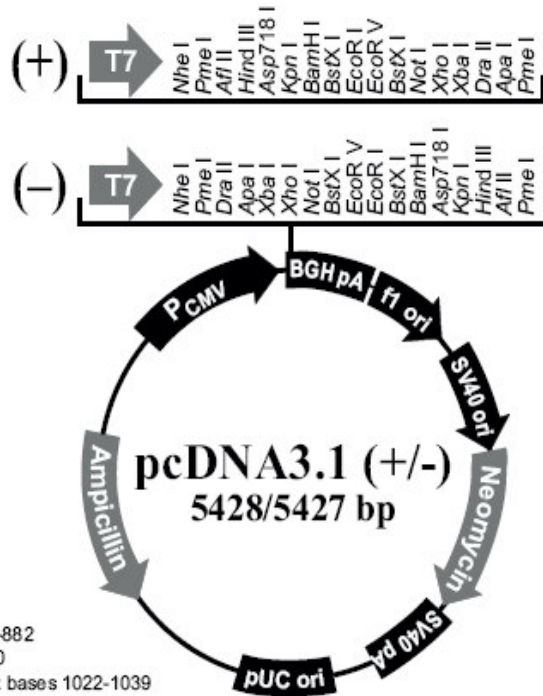
Durante l'acquisizione e l'analisi dei dati sono stati impiegati come software pClamp 8.2 (Molecular Devices) e Origin 7 (OriginLab Corp., Northampton, MA).

Il protocollo di attivazione utilizzato è il seguente:

- potenziale di holding, -70 mV,
- steps depolarizzanti, da -80 a +20 mV (Δ , 10 mV) della durata di 7,5 s.
- potenziale di test, -120 mV per 250 ms.

Le curve di attivazione allo stato stazionario sono state ottenute graficando i picchi delle correnti registrati a -120 mV (normalizzati al picco massimo) e riferiti ai potenziali degli step depolarizzanti, come riportato precedentemente da Schönherr et al. (1999).

Appendice 1: pcDNA 3.1 (+/-)

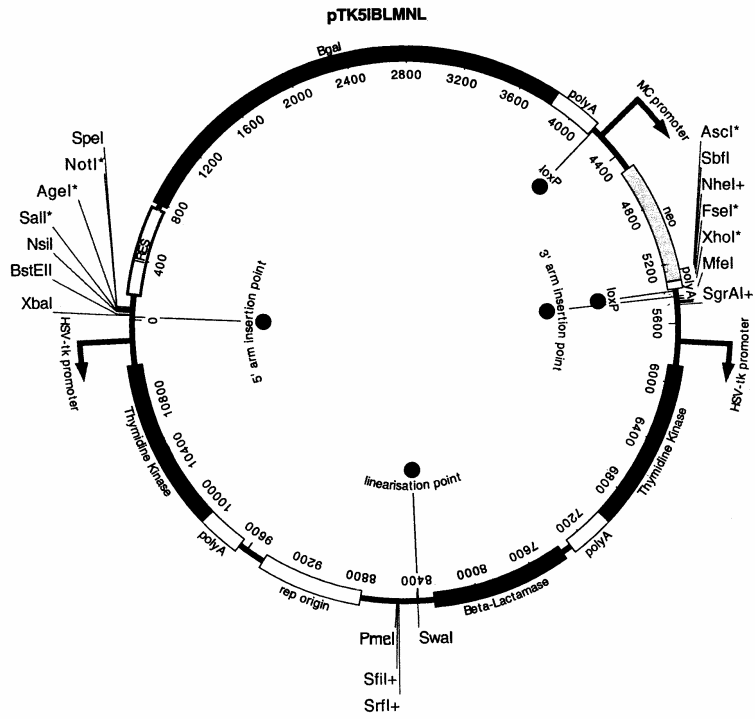


Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

- CMV promoter: bases 232-819
- T7 promoter/priming site: bases 863-882
- Multiple cloning site: bases 895-1010
- pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
- BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252
- f1 origin: bases 1298-1726
- SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074
- Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930
- SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234
- pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)
- Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)
- ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)
- Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)
- bla* promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

Appendix 2: pTK51BLMNL

pTK5IBLMNL Cut Site Map



Risultati

PARTE I:

Espressione di *erg* nel midollo spinale e distribuzione spazio-temporale di neuroni ERG-positivi durante lo sviluppo *in vitro*.

Esperimenti precedenti, condotti su colture organotipiche embrionali murine a 7 e 14 DIV (vedi Fig. 7 “Introduzione”) tramite tecnica di IHC avevano indicato che una popolazione neuronale, presente nel midollo spinale embrionale e molto simile per forma e dimensione, (probabilmente interneuroni), esprimeva tre proteine della famiglia ERG: ERG1A, ERG2 ed ERG3. Da tali esperimenti era stato evidenziato inoltre come l’espressione di tutte e tre le proteine ERG seguisse un gradiente di distribuzione spazio-temporale. Tali risultati sono apparsi parzialmente in contrasto con quelli ottenuti tramite esperimenti di RPA, effettuati nelle stesse colture e che evidenziavano una più marcata diminuzione di espressione dei geni *m-erg* a 14 DIV rispetto a quella vista tramite gli esperimenti di IHC. Per chiarire questo punto sono stati pertanto eseguiti esperimenti di ibridizzazione *in situ* non radioattiva (NR-ISH), i cui risultati, relativi a *m-erg1a* sono riportati in fig 5 . Tali esperimenti, hanno confermato i dati di espressione ottenuti tramite IHC: a 7 DIV il segnale è presente in tutto il preparato (Fig. 5A), mentre a 14 DIV il segnale è localizzato prevalentemente nella parte dorsale del preparato (Fig. 5B). Nessun segnale specifico risulta invece presente, quando lo stesso preparato viene incubato con la sonda “senso”, sia a 7 che a 14 DIV (Fig. 5 a’-b’). Lo stesso esperimento eseguito con la sonda antisenso per *m-erg1b* non ha dato nessun segnale rilevabile, confermando che neuroni del midollo spinale in età embrionale esprimono *m-erg1a* e non *m-erg1b*. Tali risultati conducono alla seguente conclusione: in età embrionale durante lo sviluppo, in neuroni del midollo spinale si osserva una diminuzione e una ridistribuzione spaziale dei canali ERG sia a livello di m-RNA , sia a livello proteico.

Tali risultati sono stati inseriti in una pubblicazione: Furlan et al., 2005.

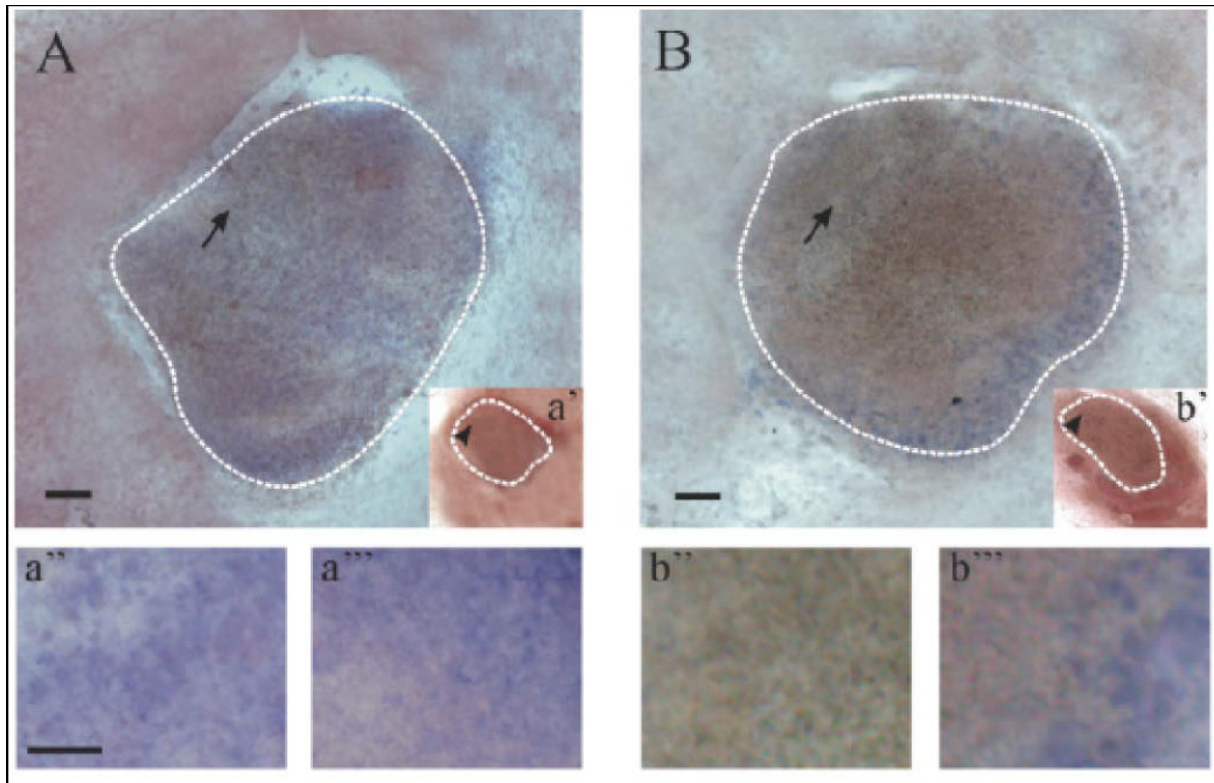


Figura 5: (A,B) Analisi di ibridizzazione in situ (*NR-ISH*) della distribuzione del gene *m-ERG1a* in colture organotipiche di midollo spinale a 7 *DIV* (A ed a') e 14 *DIV* (B e b'), dopo trattamento con la sonda *m-ERG1a* antisenso (A e B) e senso (a' e b'). Immagini ingrandite delle regioni ventrale (a'' e b'') e dorsale (a''' e b''') delle colture a 7 *DIV* (a'' e a''') e 14 *DIV* (b'' e b'''). (Furlan et al. 2005)

Parte II:

Effetto di scariche epilettiche indotte da acido Kainico (e Pilocarpina) nella espressione dei geni *erg* nell'ippocampo di topo

Abbiamo quindi intrapreso uno studio, volto a valutare se uno stimolo epilettico fosse in grado di modulare l'espressione dei geni *erg*. In particolare, abbiamo utilizzato un modello animale "classico" rappresentato da topi C57BL/6 trattati con acido Kainico. In tale modello, il trattamento con acido Kainico induce crisi epilettiche, che iniziano con il coinvolgimento dei neuroni piramidali della zona CA3 dell'ippocampo. Man mano che il "valore soglia" è oltrepassato la scarica si propaga attraverso le altre aree ippocampali (CA2, CA1, Ilo), per coinvolgere infine il sistema limbico, diventando così generalizzata. Utilizzando questo modello sperimentale abbiamo valutato il livello di espressione dei geni *erg* a livello dell'ippocampo murino. Il nostro studio si è incentrato soprattutto sui geni *erg1* e *erg3* per la loro prevalente espressione a livello dell'ippocampo; in particolare *erg3*, a differenza degli altri due membri della famiglia, è specifico del SNC, ivi presentando alti livelli di espressione.

Le crisi epilettiche venivano indotte con Kainato inoculato in peritoneo, e il comportamento degli animali trattati veniva monitorato nei 90 min. seguenti all'iniezione. Un gruppo di animali è stato trattato con Pilocarpina, un'altro farmaco che induce epilessia. Tale esperimento si è reso necessario per verificare se le variazioni di espressione da noi trovate fossero dovute all'azione specifica del Kainato di per sè e la modulazione avveniva ad opera delle crisi epilettiche. Topi di controllo venivano iniettati con soluzione fisiologica e monitorati nello stesso modo. Mentre i topi di controllo non mostravano alcuna crisi, nei topi trattati con Kainato e/o Pilocarpina, si notavano segni di natura "epilettica". Tali segni erano rappresentati da: movimenti non coordinati della testa e postura rigida degli arti, in alcuni animali si notava irrigidimento della coda e la loro intensità aumentava in funzione del tempo. Adottando la scala di score proposta da Racine et al., 1972, gli animali trattati raggiungevano uno score medio, equivalente al 3°-4° stadio (fig. A).

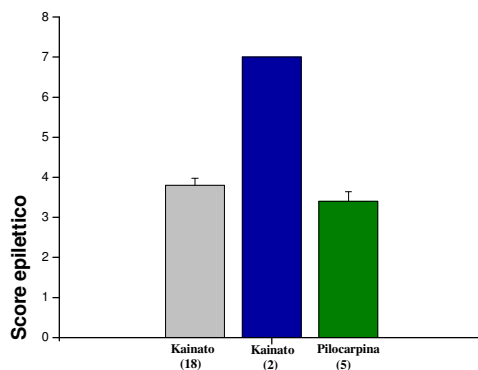


Fig. A. Score epilettico di topi (C57BL/6) trattati con Kainato (grigio-blu) e Pilocarpina (verde), in blu i topi all'ultimo stadio dello score, fra parentesi il numero di animali utilizzati.

Al fine di valutare l'eventuale variazione di espressione dei geni *m-erg*, gli animali iniettati sono stati sacrificati, l'ippocampo è stato recuperato e tagliato in fette di 300 µm di spessore (come indicato in "Materiali e Metodi"). Su tali fette di ippocampo è stata fatta l'estrazione di RNA, che successivamente è stato retrotrascritto a cDNA. La valutazione dell'espressione dei geni *erg* è stata fatta tramite Real Time PCR, utilizzando la metodica Taqman.

Gli animali (di età compresa fra 8-9 settimane) sono stati divisi in quattro esperimenti e gli inoculi venivano fatti separatamente ad ogni singolo gruppo (formato da 3-5 animali); per ogni esperimento i topi di controllo e quelli trattati con i farmaci epilettogeni (acido kainico e/o Pilocarpina) venivano monitorati contemporaneamente. Parte degli esperimenti sono stati così condotti (in collaborazione con il Prof. Filippo Tempia, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Torino).

campioni	CT erg1	CT 18s	dCT	media controllo	ddCT	2exp-ddCT	media	dev st	2 exp-dCT
Hv1	27,756	12,035	15,721	15,599	0	1	1	0	1,8514E-05
Hv2	30,415	14,479	15,936						1,5951E-05
Hv3	26,625	11,489	15,136						2,7772E-05
Hv4	26,683	11,058	15,625						1,9788E-05
Hv5	26,316	10,739	15,577						2,0458E-05
Hk1	27,265	11,151	16,114		0,515	0,699793	1,511997	1,11305	1,4099E-05
Hk2	32,24	17,994	14,246		-1,353	2,554428			5,1467E-05
Hk3	27,042	10,921	16,121		0,522	0,696406			1,4031E-05
Hk4	27,954	11,872	16,082		0,483	0,715488			1,4416E-05
Hk5	27,584	13,518	14,066		-1,533	2,89387			5,8306E-05
Hp1	26,382	10,249	16,133		0,534	0,690637	1,028427	0,277797	1,3915E-05
Hp2	27,628	12,024	15,604		0,005	0,99654			2,0078E-05
Hp3	27,059	11,208	15,851		0,252	0,839731			1,6919E-05
Hp4	26,309	11,132	15,177		-0,422	1,339784			2,6994E-05
Hp5	27,674	12,426	15,248		-0,351	1,275444			2,5698E-05

Hv6	25,925	20,34	5,585	5,438	0	1	1	0	0,02083
Hv7	27,797	22,233	5,564						0,021138
Hv8	26,512	20,338	6,174						0,01385
Hv9	26,825	22,396	4,429						0,04642
Hk6	27,685	23,72	3,965		11,634	3178,213	1387,193		0,012268
Hk7	26,945	20,596	6,349		-9,25	608,874			6,02E-03
Hk8	26,598	19,221	7,377		-8,222	298,5854			1,72E-02
Hk9	26,653	20,79	5,863		-9,736	852,7624			4,02E-02
Hk10	27,139	22,504	4,635		10,964	1997,528			
Hv10	23,075	16,2	6,875	6,93	0	1	1	0	8,52E-03
Hv11	23,865	15,9	7,965						4,00E-03
Hv12	23,455	16,1	7,355						6,11E-03
Hv13	22,635	17,1	5,535						2,16E-02
Hk11	22,97	16,51	6,46		-0,47	1,385	1,06	0,23	1,13E-02
Hk12	23,25	16,05	7,2		0,27	0,829			6,80E-03
Hk13	23,275	16,28	6,995		0,065	0,955			7,80E-03
Hk14	23,045	16,23	6,815		-0,115	1,0829			8,80E-03
Hv14	32,41	19,385	13,025	12,82	0	1	1	0	1,20E-04
Hv15	30,78	19,995	10,785						5,67E-04
Hv16	34,135	19,475	14,66						3,86E-05
Hk15	34,75	19,125	15,625		2,805	0,14309	0,44	0,45	1,97E-05
Hk16	32,645	20,08	12,565		-0,255	1,1933			1,65E-04
Hk17	34,64	18,84	15,8		2,98	0,12674			1,75E-05
Hk18	33,73	20,025	13,705		0,885	0,5414			7,48E-05
Hk19	34,2	19,01	15,19		2,37	0,1934			2,68E-05

Tab. II.A. Dati degli esperimenti di Real Time dei campioni di ippocampo testati. Sono rappresentati i valori relativi ai Ct del gene *erg1* e la variazione di questi rispetto al gene housekeeping (*s18*) ed ai controlli. Gli animali sono trattati con soluzione fisiologica (Hv), con Kainato (Hk) e con Pilocarpina (Hp). Il valore relativo alla quantità amplificata è dato da 2EXP-dCT.

campione	CT <i>erg2</i>	CT 18s	dCT	media controllo	ddCT	2exp-ddCT	media	dev st	2 exp-dCT
Hv14	28,22	15,39	12,83	12,37	0	1	1	0	0,000137

Hv15	27,25	15,68	11,57						0,0003289
Hv16	28,65	15,94	12,71						0,0001492
Hk15	27,33	15,98	11,35		-1,02	2,027	1,62	1,06	0,000383
Hk16	30,11	16,93	13,18		0,81	0,57			0,000107
Hk17	26,71	15,57	11,14		-1,23	2,34			0,000443
Hk18	29,01	15,4	13,61		1,24	0,423			7,99E-05
Hk19	27,15	16,24	10,91		-1,46	2,75			0,000519
			--						

Tab.IIB. *Dati degli esperimenti di Real Time dei campioni di ippocampo testati.* Sono rappresentati i valori relativi ai Ct del gene *erg2* e la variazione di questi rispetto al gene housekeeping (*s18*) ed ai controlli. Gli animali sono trattati con soluzione fisiologica (Hv), con Kainato (Hk) e con Pilocarpina (Hp). Il valore relativo alla quantità amplificata è dato da 2EXP-dCT.

campione	CT erg3	CT 18s	dCT	media controllo	ddCT	2exp-ddCT	media	dev st	2 exp-dCT
			--						
Hv1	27,498	12,035	15,463	15,3594	0	1	1	0	2,21E-05
Hv2	30,641	14,479	16,162						1,36E-05
Hv3	26,825	11,489	15,336						2,41E-05
Hv4	26,272	11,058	15,214						2,63E-05
Hv5	25,361	10,739	14,622						3,96E-05
Hk1	26,6	11,151	15,449		15,449	0,939	1,55	0,976	2,23E-05
Hk2	32,283	17,994	14,289		14,289	2,1			4,99E-05
Hk3	26,395	10,921	15,474		15,474	0,923			2,19E-05
Hk4	27,572	11,872	15,7		15,7	0,789			1,87E-05
Hk5	27,282	13,518	13,764		13,764	3,02			7,18E-05
Hp1	25,622	10,249	15,373		15,373	0,99	0,968	0,159	2,27E-05
Hp2	27,504	12,024	15,48		15,48	0,919			2,35E-05
Hp3	26,948	11,208	15,74		15,74	0,768			2,18E-05
Hp4	26,217	11,132	15,085		15,085	1,209			1,82E-05
Hp5	27,851	12,426	15,425		15,425	0,955			2,87E-05

Hv6	25,96	15,73	10,23	10,08	0	1	1	0	0,000833
Hv7	26,45	15,93	10,52						0,000681
Hv8	25,68	16,19	9,49						0,00139
Hk6	24,78	16,46	8,32		-1,76	3,38	4,03	3,92	0,00312
Hk7	27,32	17	10,32		0,24	0,84			0,000782
Hk8	24,08	16,16	7,92		-2,16	4,47			0,00412
Hk9	26	15,9	10,1		0,02	0,98			0,000911
Hk10	23,61	16,92	6,69		-3,39	10,48			0,00968
Hv10	25,16	16,56	8,6	8,72	0	1	1	0	2,57E-03
Hv11	26,32	16,1	10,22						8,38E-04
Hv12	25,6	16,53	9,07						1,86E-03
Hv13	24,5	17,5	7						7,81E-03
Hk11	25,595	16,525	9,07		0,35	0,784584	0,57	0,16	0,00186
Hk12	26,1	16,175	9,925		1,205	0,433			0,00102
Hk13	25,87	16,43	9,44		0,72	0,607			0,00144
Hk14	26,405	16,525	9,88		1,16	0,447513			0,00106
Hv14	18,44	14,47	3,97	4,5	0	1	1	0	6,38E-02
Hv15	18,3925	14,41	3,9825						6,32E-02
Hv16	20,125	14,55	5,575						2,09E-02
Hk15	19,6	15,935	3,665		-0,835	1,78	1,67	0,52	7,88E-02
Hk16	18,175	14,595	3,58		-0,92	1,89			8,36E-02
Hk17	19,615	15,09	4,525		0,025	0,98			4,34E-02
Hk18	17,975	14,705	3,27		-1,23	2,34			1,03E-01
Hk19	18,84	14,775	4,065		-0,43	1,35			5,97E-02

Tab. IIC. *Dati degli esperimenti di Real Time dei campioni di ippocampo testati.* Sono rappresentati i valori relativi ai Ct del gene *erg3* e la variazione di questi rispetto al gene housekeeping (*s18*) ed ai controlli. Gli animali sono trattati con soluzione fisiologica (Hv), con Kainato (Hk) e con Pilocarpina (Hp). Il valore relativo alla quantità amplificata è dato da 2EXP-dCT.

I dati mostrati nelle precedenti tabelle (II A-C), si riferiscono ai valori di espressione ottenuti tramite Real Time PCR dei campioni trattati con soluzione fisiologica, acido Kainico e Pilocarpina. Sono mostrati i valori dei cicli (CT) relativi ai geni *erg*, i valori dei cicli per il gene housekeeping (*s18*) usato come riferimento interno essendo ubiquitariamente espresso. I valori dei cicli soglia dei due geni sono stati sottratti e la differenza di questi ultimi (dCT) è stata calcolata. Un'altro parametro è stato preso in considerazione in sede di analisi e cioè 2EXP-dCT. Tale parametro dà una stima della quantità dei trascritti presenti; tale valore infatti è rappresentato dall'incremento esponenziale dei trascritti in oggetto man mano che la reazione di PCR procede.

Campioni	CT erg1	CT 18s	dCT	2 exp-dCT	test t v vs K	K vs V
Hv	27,2 ± 3,32	16,8 ± 3,9	10,4 ± 4,5	0,0089 ± 0,013		
Hk	28,4 ± 4,07	3,7 ± 17,6	10,8 ± 4,6	0,00616 ± 0,01	0,51 ± 0,17	1,04 ± 0,14
Hp	27 ± 0,65	11,4 ± 0,84	15,6 ± 0,4	2,07E-5 ± 5,6E-6	0,945	1,5
	CT erg2	CT 18s	dCT	2 exp-dCT	test t v vs K	K vs V
Hv	28,04 ± 0,7	15,6 ± 0,27	12,37 ± 0,7	2,05E-4 ± 1,07E-4		
Hk	28,06 ± 1,4	16 ± 0,6	12,04 ± 1,25	3,06E-4 ± 2E-4	0,387	0,97 ± 0,1
	CT erg3	CT 18s	dCT	2 exp-dCT	test t v vs K	K vs V
Hv	24,8 ± 3,37	14,5 ± 2,19	10,4 ± 4,2	0,011 ± 0,022		
Hk	24,4 ± 3,86	15,2 ± 2	9,2 ± 4,2	0,02 ± 0,034	0,25+0,07	0,94 ± 0,13
Hp	26,8 ± 0,9	11,4 ± 0,84	15,4 ± 0,23	2,3E-5 ± 3,8E-6	0,652954	1,48

Tab. IID. Valori medi dei campioni analizzati con Real Time PCR. In tabella sono rappresentati i valori medi (e dev. st.) relativi ai cicli (CT) dei controlli (Hv) e dei trattati con acido Kainico (Hk) e Pilocarpina (Hp). Sono riportati per tutti i campioni il grado di espressione dei geni *erg* dei campioni trattati rispetto ai controlli e il valore della probabilità riferita al test di student (test t).

Nella tabella IID, sono rappresentati i valori mediati con relativa deviazione standard di tutti i parametri presi in esame. I valori medi dei campioni (rappresentati dal dCT) sono rapportati al valore medio dei controlli, come indice di valutazione di espressione (K vs V). Mediante il calcolo di matrici abbiamo ottenuto la probabilità (test t v vs K) relativa al test di student (test t).

campioni	CT erg1	CT 18s	dCT	2exp-dCT	K vs V
CA1					
Hv	26,8 ± 0,55	16,1 ± 0,1	10,6 ± 0,24	6,4E-4 ± 9,6E-5	0,97
Hk	26,6 ± 0,19	16,3 ± 0,07	10,3 ± 0,3	8E-4+1,7E-4	
G.R.					
Hv	26,7 ± 0,24	16,7 ± 0,2	10,8+0,14	5,4E-4 ± 5,5 E-5	0,93
Hk	26,4 ± 0,25	17 ± 0,20	9,38 ± 0,45	0,0016 ± 4,3 E-4	
campioni	CT erg3	CT 18s	dCT	2exp-dCT	K vs V
CA1					
Hv	25,7 ± 0,36	16,1 ± 0,2	9,5 ± 0,26	4,5 ± 2,27	0,98
Hk	25,6 ± 0,54	16,3 ± 0,1	9,3 ± 0,44	0,0018 ± 0,001	
G.R.					
Hv	28,2 ± 0,36	16,4 ± 0,27	11,7 ± 0,45	3E-4 ± 2,28E-4	1
Hk	28,7 ± 0,6	17 ± 0,35	11,7 ± 0,5	3,4E-4 ± 1,83	

Tab. III. Valori di espressione medi ottenuti tramite Real Time PCR. In tabella sono riportati i valori di espressione (e dev. st) medi nelle aree di ippocampo considerate (CA1 e giro Dentato) relativi ai campioni totali. Inoltre, è mostrata l'espressione dei trattati rispetto ai controlli.

Dopo aver valutato i livelli di espressione su fette di ippocampo in toto, l'espressione di *m-erg1* ed *m-erg3* è stata determinata in aree specifiche dell'ippocampo, corrispondenti ai siti in cui primariamente iniziano le scariche epilettiche (CA3, CA1 giro dentato). In questi esperimenti le singole aree di interesse sono state prelevate e il livello di espressione di *m-erg1* e *m-erg3* è stato valutato come negli esperimenti precedenti. Ci siamo focalizzati nella regione del giro dentato per la presenza di interneuroni ilari ad azione inibitoria che risultano altamente positivi per i geni considerati. Nella tabella III sono mostrati i risultati di tali esperimenti.

Dall'analisi dei dati sopra riportati si deduce che in modelli sperimentali in cui crisi epilettiche erano indotte dall'uso di farmaci quali acido Kainico e Pilocarpina, nessuno dei tre geni della famiglia *erg* risulta modulato a livello di ippocampo o all'interno di specifiche aree testate (CA1, Giro Dentato),

Parte III:

Valutazione del ruolo patogenetico del gene *herg3*, (*KCNQH7*) nella malattia epilettica

La seconda parte del progetto ricerca la presenza di eventuali mutazioni *herg*-specifiche mediante analisi genomica di famiglie in cui sono presenti casi di sindrome epilettica. Dal punto di

vista sperimentale questa tesi ha richiesto la messa a punto di un protocollo per l'analisi della sequenza esonica del gene *herg3* (l'unico ad essere presente e abbondantemente espresso nel CNS), mai considerato in studi di questo tipo. In Fig. 1, è mostrata la sequenza dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione, che ha preceduto l'analisi mediante DHPLC eseguita in collaborazione con la Dott.ssa G. Pepe del Centro Trombosi di Careggi.

La scelta delle zone più adatte ai nostri scopi ha richiesto la consultazione delle Banche Dati genomiche a disposizione. E' fondamentale la valutazione della specificità delle sequenze scelte e l'esclusione, a questo livello, della presenza di siti di splicing alternativo (v. Materiali e Metodi). In Fig. 2, è indicata la PCR eseguita sul DNA genomico di un campione controllo, utilizzando le coppie di oligonucleotidi evidenziate in Fig.1. Sono state scelte 3 temperature per ciascun esone, sulla base della T_m di ciascun primer. L'amplificazione non mostra evidenti prodotti aspecifici ed una resa sufficiente per i successivi esperimenti.

L'amplificato più concentrato è stato impiegato per tarare lo strumento di DHPLC e per valutare le condizioni ottimali per l'analisi di ciascun esone. In Fig. 3, sono mostrati i grafici relativi a 3 tipici protocolli sperimentali, eseguiti su tutti i 16 esoni del gene in esame.


```

CCTTCTTCCAGATT CATCCCTAAGCACNTAGGLATGTTGGTCTTCATAGGCATGTT
TCATATCCCTGTCTTCCAGGGAAATATCATTTTGTACTATTTACTCCAGCATCAATGTA
AGTGTCTTTTAAATGCTGTTTTCCCTTTTCTATTTAAGTGTCTCTACCTGAGCTGAGG
TCACAAAGTACCATTTATATGCAAAAGTACTGTATATTTTCTAAATTAAGCTGTAAAG
TAAACTGAGCAGTTAGGATGTAAATATACTAAGAACTTTTGGTTCCAAATGTAAAC
TGCCAGCATCTCACGGCACCTTATTTTTATTTTTATTTTTTAAATCACATGCAATGTTAG
GAACTCCAAATTCCTTGCATGAGACTCCCTATTTACTGCTTTTACTAAACCAATGACTT
CCTTATGAAATGCTTCCACGCAATAAGAAAACCAAGGATAAACTGTTCCATGATGC
AACTCAATTCAGATGATCCTCAACTCAT
gggaattccagggggataaagggaacttagtaactttggcacaagattgaggtcttct
gtatcaagatgttcaagttaattaegtctcatctccacactgggaagaaaaatacaaa
gtttgagttgtaaacctctgacagtataggaagccatatacaaaaactaaacataggcca
acagtaatgagaacaagggtcttctatttaaaattatgtcacaattgcaatttaaaaa
catctaaagtatttccactggcacatttccatagaaggcttaaaaacaaatttctctcat
tttgetttttctggaggcggggatgggtgggtctccttaagtactgctaaactgtga
ttaacacaaactgatataccacagcttcttctgtgattcaattttaaagcaatcctgagcg
gacatacagcctgggcaacatggcaaaaccccaactctacaaaaatggttaaaaattag
caggggtgtggttaattcaaac.....

```

Fig.1. Grafico che illustra la posizione genomica degli oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di amplificazione. In azzurro, sono mostrati i primers UP relativi a ciascun esone ed in successione, in rosa, i primers DOWN impiegati nella stessa reazione. Ogni oligonucleotide dista circa 50 basi dall’inizio (primer UP) o dalla fine (primer DOWN) dell’esone corrispondente. Causa della lunghezza della sua sequenza (870 pb), l’esone 16 ha richiesto una reazione di amplificazione con due diverse coppie di primers.

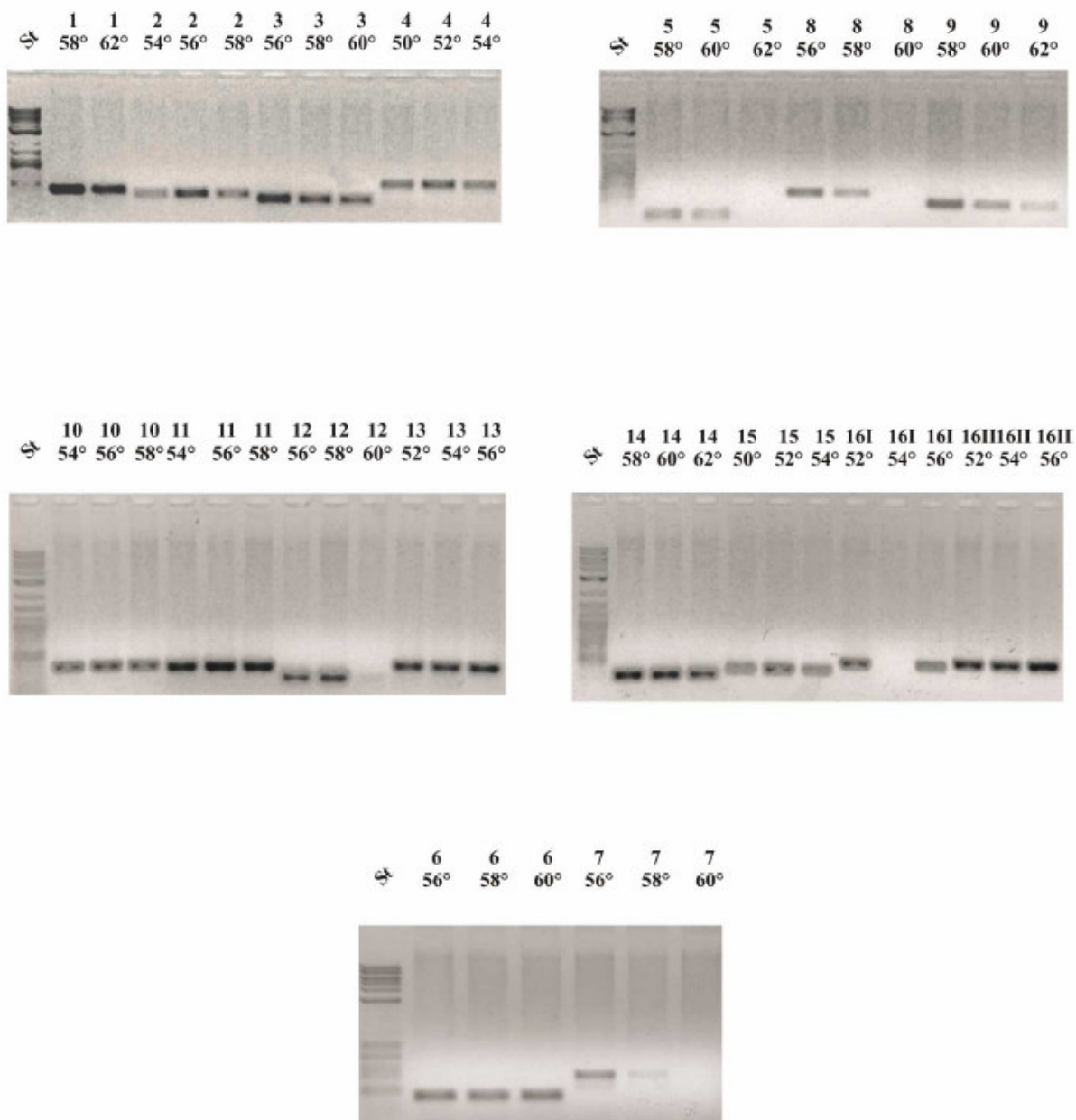
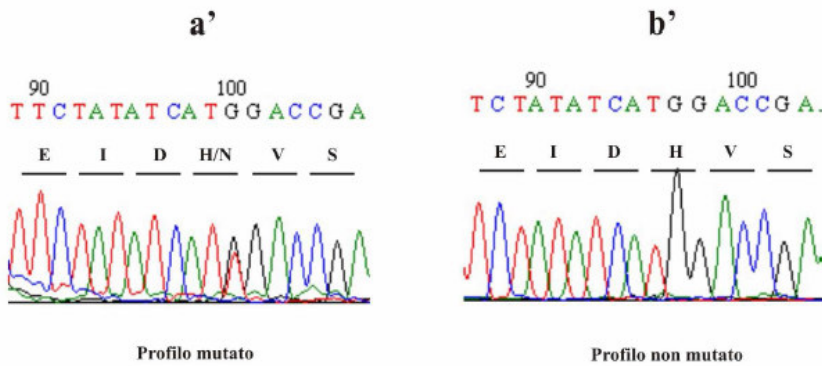
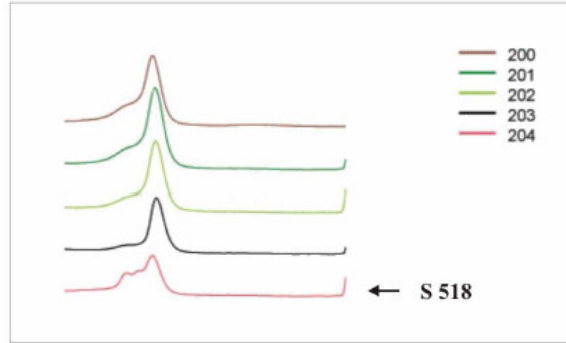


Fig.2. PCR relativa ai 16 esoni del gene *herg3* eseguita con i primers indicati in Fig.1. I campioni mostrati non presentano prodotti aspecifici (che potrebbero compromettere la successiva analisi mediante DHPLC). Inoltre, ogni esone presenta una T ottimale, alla quale si ottiene una buona concentrazione di amplificato.

A



B

IRRASSVHDI	Homo sapiens
IRRASSVHDI	Rattus norvegicus
IRRASSVHDI	Mus muris
MRRASSVHEI	Fugu rubripes
IRRASSVHDI	Gallus gallus
IRRASSVHDI	Canis familiaris
IRRASSVHDI	Bos taurus

Fig.4. Profilo della mutazione relativa all'esone 4 di *herg3*. In A, è riportato il risultato dell'esperimento di DHPLC. La traccia in rosa è relativa al campione S518 appartenente alla famiglia 204. Le curve in alto, mostrano altri pazienti analizzati, ma privi della mutazione in questione. In a' e b' sono indicate le **sequenze antisense** dei frammenti mutato e normale, rispettivamente. In B, è indicata la traduzione proteica della sequenza interessata dalla mutazione.

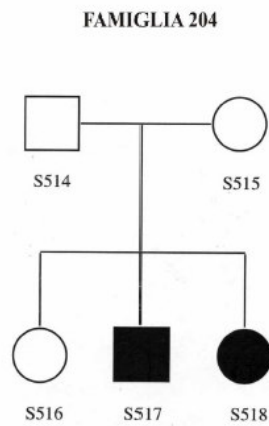
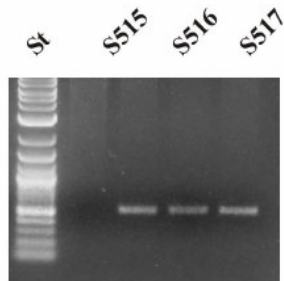
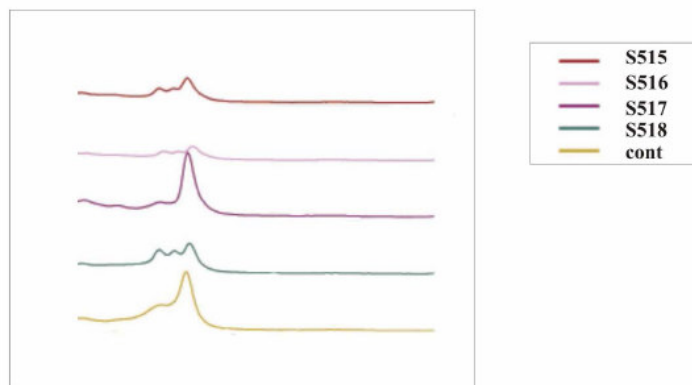
A**B****C**

Fig.5. *Analisi dell'esone 4 del gene herg3 nella famiglia 204.* In A, è indicato l'albero genealogico della famiglia a cui appartiene il paziente S518. In B, sono mostrati gli amplificati dei familiari esaminati mediate DHPLC. Nel pannello C sono riportate le tracce ottenute dall'analisi cromatografica di questi campioni.

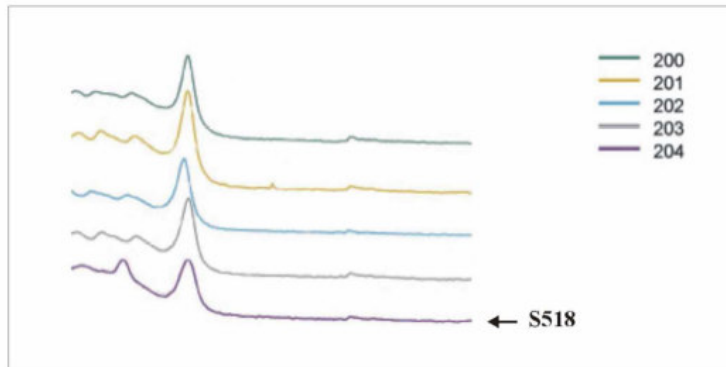
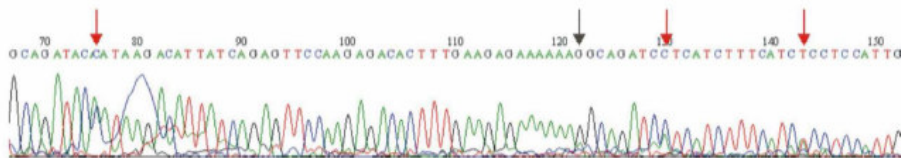
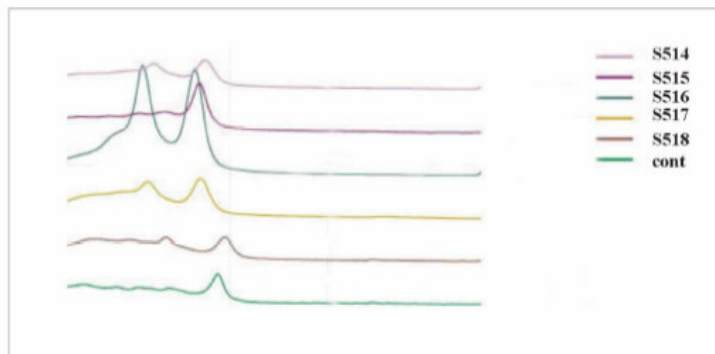
A**B****C**

Fig.6. Profilo della mutazione relativa all'esone 13 del gene *herg3*. In A, è riportato il profilo del campione S518 ottenuto mediante DHPLC (traccia in viola). Le curve in alto rappresentano le curve relative ad altri pazienti analizzati, ma privi della mutazione in questione. In B, è mostrata la sequenza del frammento mutato. Si evidenziano 4 sospette eterozigosi: la freccia in nero indica la sostituzione a→g comune ai componenti mutati della famiglia, i cui profili sono riportati in C.

Dall'analisi dei tracciati di DHPLC, sono stati identificati 3 profili mutati nelle sequenze relative agli esoni 4 (dominio N-terminale della proteina), 6 (regione comprendente la prima porzione transmembrana) e 13 (porzione C-terminale). Ognuno di questi è stato ritrovato in un singolo paziente e, sia il primo che il terzo, sono stati individuati nello stesso campione. In Fig. 4, sono

riportati i risultati relativi all'esone 4, ottenuti nel paziente S518, affetto da epilessia idiopatica generalizzata. In A, è mostrato il profilo dell'analisi cromatografica (traccia in rosa) ed in a' la sequenza corrispondente. Paragonando il tracciato del campione mutato (a') con quello di un controllo sano (b'), si nota come il primo, in eterozigosi (visibile dalla sovrapposizione dei picchi in A), sia caratterizzato da un cambio di base c→a (in figura è riportata la sequenza del filamento antisense), che determina, a livello proteico, una sostituzione dell'amminoacido basico Istidina (H) con Asparagina (N), molecola neutra.

Da un'analisi filogenetica, è emerso che H è conservato in specie diverse (Fig. 4C) e può quindi avere un importante significato per la funzionalità del canale. Per valutare se questa mutazione avesse un significato patogenetico, abbiamo preso in esame alcuni familiari del paziente S518 (famiglia 204). In particolare, sono stati considerati i DNA dei campioni indicati in Fig. 5A. Dall'analisi degli amplificati (pannello B) mostrata in C, è evidente come S515 ed S516, individui sani della famiglia 204, presentino il medesimo profilo trovato in S518, mentre S517, altro membro affetto da epilessia, mostri una curva normale. Il sequenziamento del DNA ha evidenziato che tutti i profili mutati presentano la stessa sostituzione nucleotica mostrata in Fig. 4A pannello a'. Il fatto che l'eterozigosi sia presente solo in uno dei due membri epilettici e caratterizzi anche alcuni membri sani della famiglia ha indicato che essa non è correlata con l'insorgenza della patologia. Il paziente S518 è risultato mutato anche nella zona C-terminale della proteina, nella porzione codificata dall'esone 13.

In questo caso, il campione ha rivelato un profilo mutato (Fig. 6, pannello A) in DHPLC, a cui corrisponde la sequenza mostrata nel pannello 6B. In essa, sono state identificate 4 possibili mutazioni (indicate dalle frecce). L'analisi successiva dei familiari (Fig. 6C) ha dato i seguenti risultati:

S514 →mutato

S515 →normale

S516 →mutato

S517 →mutato

I grafici mostrati in figura indicano il profilo mutato rilevato dalla DHPLC che, dall'analisi della sequenza, è risultato essere causato da una sostituzione a→g (freccia in nero). Questa determina, a livello amminoacidico, un cambio Serina (AA basico)→Glicina (AA neutro), in una porzione proteica non molto conservata tra le varie specie.

A differenza della mutazione trovata nell'esone 4, in questo caso l'eterozigosi interessa entrambi i membri della famiglia affetti da epilessia, oltre che alcuni tra i familiari sani. In Fig. 7, è

riassunto lo schema del genotipo di ciascun membro della famiglia 204 per entrambe le mutazioni analizzate.

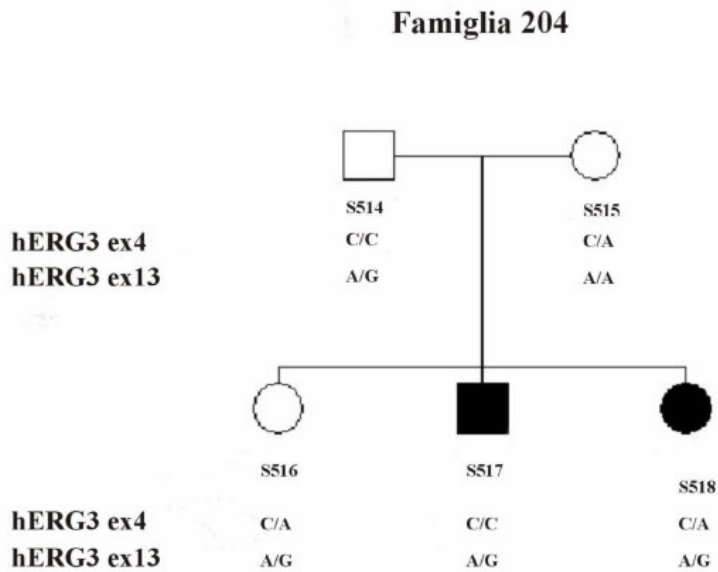


Fig. 7. Schema delle eterozigosi nella famiglia 204.

Tali dati ci hanno indotto ad analizzare 92 ulteriori controlli sani (Fig. 8) che, nell'insieme, hanno mostrato un profilo non mutato. Questo risultato non esclude un possibile significato patogenetico di questa mutazione, poichè la sua assenza nei controlli sani, giustificherebbe un suo coinvolgimento in un meccanismo di ereditarietà multifattoriale. Al contrario, l'analisi delle sospette eterozigosi presenti nel solo paziente S518 e indicate dalle frecce in rosso in Fig. 6C, ha chiarito che le sovrapposizioni dei picchi a quel livello, sono artefatti da imputare alla presenza di aspecifici nella reazione di sequenziamento. E' stato quindi analizzato il profilo dell'esone 6 nel paziente II:1 della famiglia 233, affetto da epilessia idiopatica di tipo rolandico. In esso (Fig. 9A), la sequenza mostra la sostituzione di base **a**→g in una porzione intronica tra l'esone 6 e 7, particolarmente interessante poichè coinvolge un potenziale sito di splicing. L'analisi dei familiari del paziente in questione (I:1 e I:2, campioni sano e malato, rispettivamente) ha rivelato che tale cambio di base è presente solo nei membri della famiglia affetti da epilessia (tracce in nero, I:2, ed in rosa, II:1, rispettivamente). Per questo motivo, abbiamo condotto uno studio sul DNA genomico di controlli sani. 88 di questi, venuti positivi alla PCR (Fig. 10), sono stati analizzati mediante DHPLC: da questi esperimenti, è emerso che i campioni 64 e 72 (tracce in marrone e verde, rispettivamente in Fig. 9B) avevano un profilo mutato paragonabile a quello riscontrato nei pazienti

epilettici della famiglia 233. La dimostrazione che tutti i campioni presi in esame presentavano la medesima sostituzione nucleotidica, è stata ottenuta dal sequenziamento dei vari amplificati.

La frequenza bassa di tale sostituzione e la sua specifica presenza, nella famiglia 233, nella quale i soli membri affetti da epilessia mostrano l'eterozigosi, indica che questa mutazione possa essere coinvolta in un meccanismo di splicing che potrebbe alterare l'espressione del gene di nostro interesse. Infine, è stata analizzata la sequenza degli esoni di *herg3* in 3 diversi pazienti affetti da epilessia generalizzata idiopatica di tipo assenze, in cui è stato dimostrato che il locus responsabile di tale sindrome è localizzato a livello del cromosoma 2, in un'ampia regione dove mappa anche il gene di nostro interesse (Fig. 11).

Ad una prima analisi, i campioni non hanno mostrato alcun profilo alterato. I risultati ottenuti mediante DHPLC sono stati talvolta di difficile interpretazione, per problemi di taratura dello strumento e per la presenza di prodotti aspecifici negli amplificati di PCR. Per questo motivo, per valutare l'eventuale presenza dei polimorfismi negli esoni 4, 6 e 13 individuati negli altri campioni compresi nel nostro studio, abbiamo sequenziato i corrispondenti amplificati. I risultati ottenuti hanno confermato l'assenza di un cambio nucleotidico a questo livello.

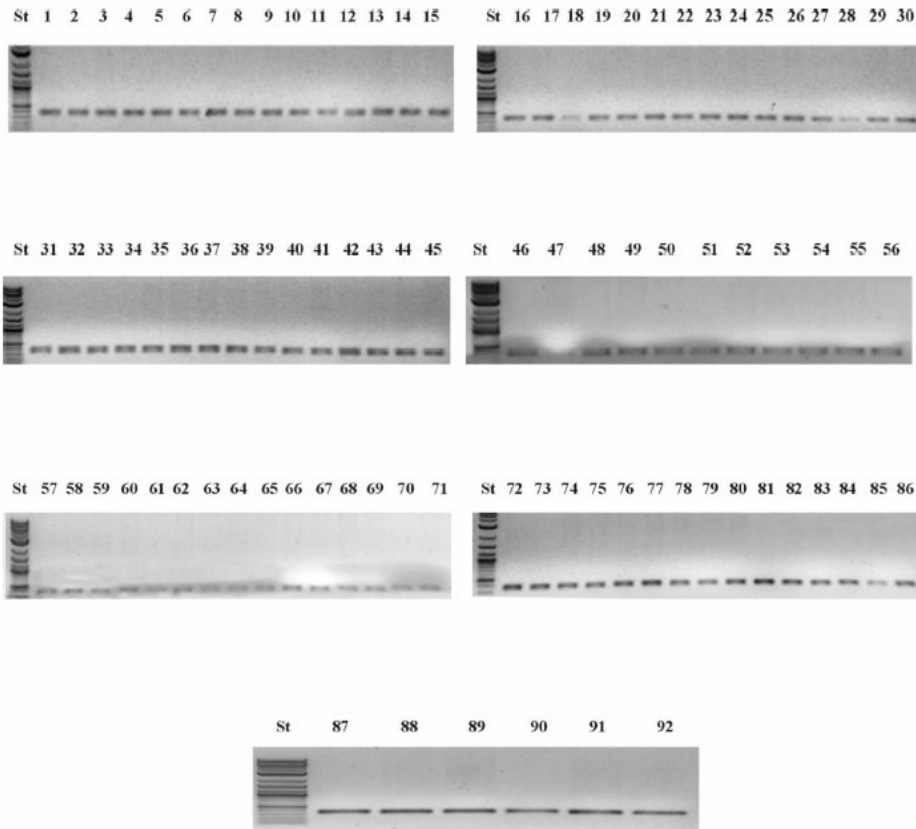
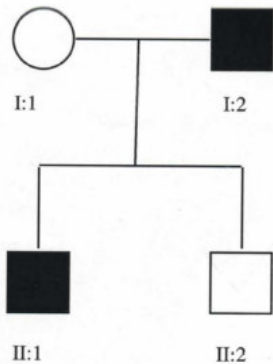


Fig.8. PCR su campioni di controllo sani dell'esone 13 del gene *herg3*. Nei campioni mostrati non sono presenti prodotti aspecifici che potrebbero compromettere la successiva analisi mediante DHPLC. Da questi amplificati sono stati ottenuti 92 tracciati cromatografici e di questi nessuno è risultat mutato.



Albero genealogico della famiglia 233

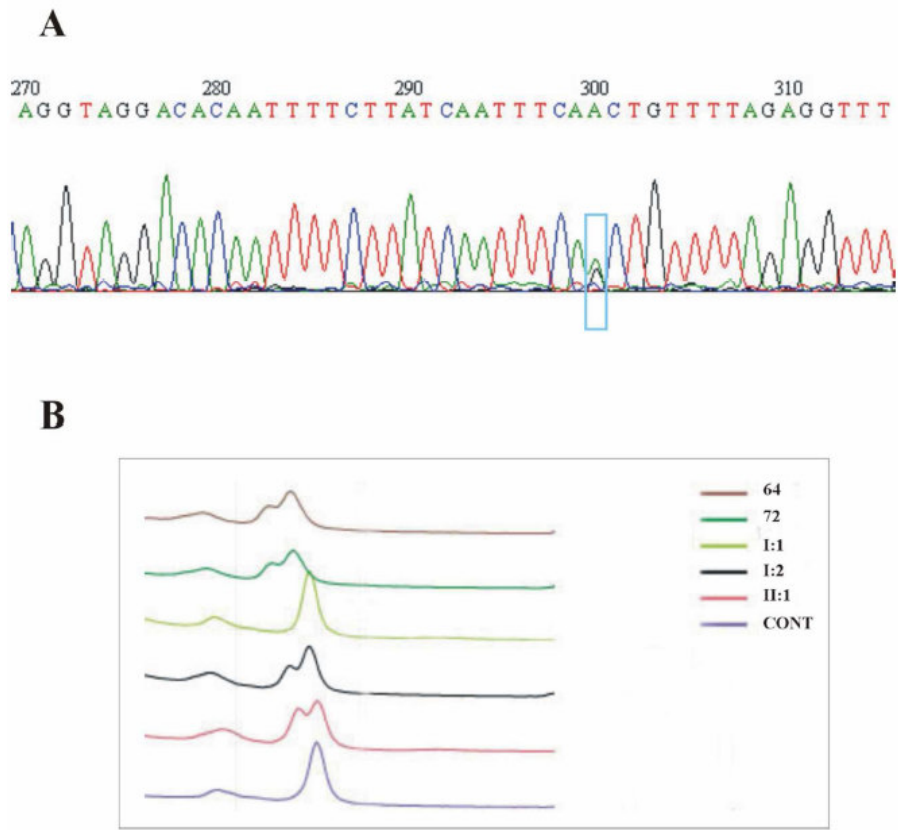


Fig.9. Profilo della mutazione relativa all'esone 6 del gene *herg3*. In alto, è riportato l'albero genealogico della famiglia del paziente II:1. In A, il riquadro azzurro indica l'eterozigosi, che interessa la porzione intronica compresa tra l'esone 6 e 7 del gene *herg3*. In B, sono mostrati i profili ottenuti mediante DHPLC dei parenti del paziente in studio e dei due controlli sani trovati mutati.

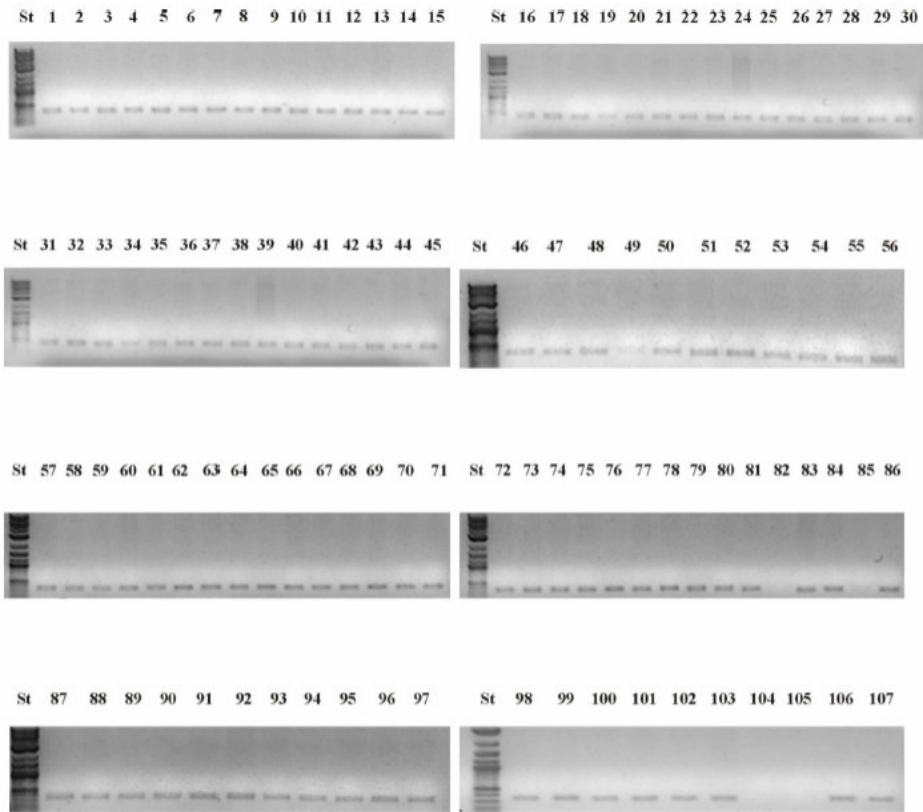


Fig.10. PCR su campioni di controllo sani dell'esone 6 del gene *herg3*.

Nei campioni mostrati non sono presenti prodotti aspecifici che potrebbero compromettere la successiva analisi mediante DHPLC. Da questi amplificati sono stati ottenuti 88 tracciati cromatografici e di questi i numeri 67 e 72 sono risultati mutati.

Valutazione delle mutazioni di *herg3* su modelli cellulari

Come è stato detto, i dati relativi le due mutazioni a carico del gene *herg3* codificante per il canale di K⁺ KCNH7 (hERG3), presenti in una paziente di 6 anni appartenente alla famiglia 204 mostrata in Figura 7 (tali mutazioni sono presenti con una frequenza nella popolazione sana minore dell'1%, mappano negli esoni 4 e 13 a livello della regione N- e C-terminale rispettivamente); in cui la mutazione dell'esone 4 comporta, a livello amminoacidico, la sostituzione di un residuo di istidina con un residuo di asparagina, mentre nella mutazione dell'esone 13 un residuo di serina viene sostituito con uno di glicina.

Per valutare il peso di tali mutazioni sulla funzionalità di hERG3 sono stati eseguiti esperimenti di mutagenesi, come illustrato nella relativa sezione dei "Materiali e metodi".

```

MUT4 31 AAGCTTATGTAGTATACGGAGAGCATCTTCGGTCAATGATATAGAAGGATTTCGGCGTCCA 90
|||||
WT 1007 AAGCTTATGTAGTATACGGAGAGCATCTTCGGTCCATGATATAGAAGGATTTCGGCGTCCA 1066
MUT4 91 CCCCAAGAACATATTTAGAGACCGACATGCCAGCGAAG 128
|||||
WT 1067 CCCCAAGAACATATTTAGAGACCGACATGCCAGCGAAG 1104

```

ESONE 13

```

MUT13 755 GAAGAGAAAAAAGGCAGATCCTCATCTTTTCATCTCCTCCATTGATGATGAACAAAAGCCG 814
|||||
WT 2882 GAAGAGAAAAAAAGCAGATCCTCATCTTTTCATCTCCTCCATTGATGATGAACAAAAGCCG 2941
MUT13 815 CTCTTCTCAGGAATAGTAGACTCTTCTCCAGGAATAGGGAAAGCATCTGGGCTCGATTTT 874
|||||
WT 2942 CTCTTCTCAGGAATAGTAGACTCTTCTCCAGGAATAGGGAAAGCATCTGGGCTCGATTTT 3001
MUT13 875 GAAGAAACAGTGCCACCTCAGGAAGAATGCACATAGATAAA 916
|||||
WT 3002 GAAGAAACAGTGCCACCTCAGGAAGAATGCACATAGATAAA 3043

```

Fig. 11: Allineamento tra le sequenze mutate e le sequenze wild type.

Il primo passo è stata la verifica del protocollo sperimentale con il sequenziamento dei costrutti ottenuti (Figura 11), sono state trasfettate cellule CHO ed è stata analizzata l’espressione dei costrutti mutati nell’esone 4 (MUT 4), 13 (MUT 13) e dal doppio mutante (MUT 4+13) mediante immunofluorescenza, al fine di valutare la loro corretta espressione in membrana e se ci fossero delle differenze nella localizzazione cellulare rispetto alla forma wild type. Come mostrato in Figura 12, è evidente come l’espressione dei costrutti sia sempre preferenzialmente localizzata a livello membranario. Dall’analisi eseguita confrontando l’espressione di hERG3 (pannelli a, a’) con quella di una proteina membranaria quale l’integrina $\beta 1$ (b, b’), si evidenzia come le due proteine colocalizzino quando si esegue una sovrapposizione dei due segnali di fluorescenza (c, c’, d). Inoltre, dal calcolo dei rapporti tra le densità integrate ($n^\circ \text{pixels} / (\text{area misurata}) \times \text{intensità}$) del segnale di hERG3 con quello di $\beta 1$, misurato mediante il software ImageJ, emerge come non ci siano differenze nella traslocazione in membrana delle proteine mutate rispetto alla forma wild type.

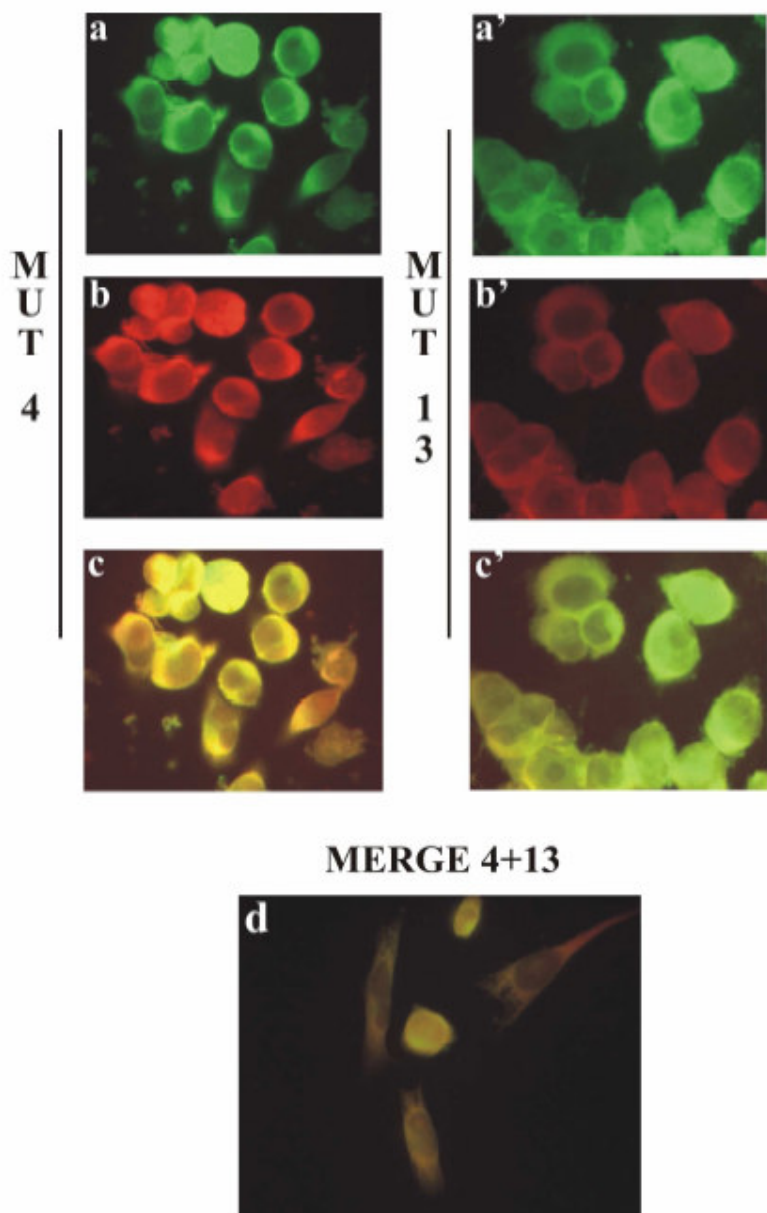


Fig. 12. *Analisi in immunofluorescenza dell'espressione di hERG3 (a,a') e dell'integrina $\beta 1$ (b, b'). In c,c' e d sono riportate le sovrapposizioni dei segnali relativi alle due proteine nei tre mutanti (merge). I valori dell'analisi eseguita mediante il software ImageJ e indicati nel testo sono i seguenti: MUT 4=1,44 \pm 0,5; MUT 13=1,41 \pm 0,7; MUT 4+13=1,5 \pm 0,7; WT=1,39 \pm 0,5.*

In ciascuna immagine relativa alla marcatura di hERG3, si noti come sia visibile un segnale citoplasmatico da attribuire alla presenza di proteine non interamente glicosilate come indicato in letteratura (Akhavan et al. 2005). Infine, per valutare l'importanza delle mutazioni in esame sulla funzionalità del canale ionico, in collaborazione con il laboratorio del Prof. E. Wanke dell'Università di Milano Bicocca, abbiamo analizzato le proprietà biofisiche della corrente mediata dai canali codificati dai plasmidi mutagenizzati, utilizzando il protocollo sperimentale riportato

nella specifica sezione dei “Materiali e metodi”. Nella Figura 13, sono mostrati i tracciati delle curve di attivazione dei tre mutanti (hERG3 MUT 4, hERG3 MUT 13, hERG3 MUT 4+13) e del canale wild type (hERG3 WT). Nel riquadro a destra sono riportati la traccia della corrente registrata ed il protocollo a rampa con il quale è stata ottenuta. Nella Tabella 1 sono invece mostrati i parametri delle curve di attivazione.

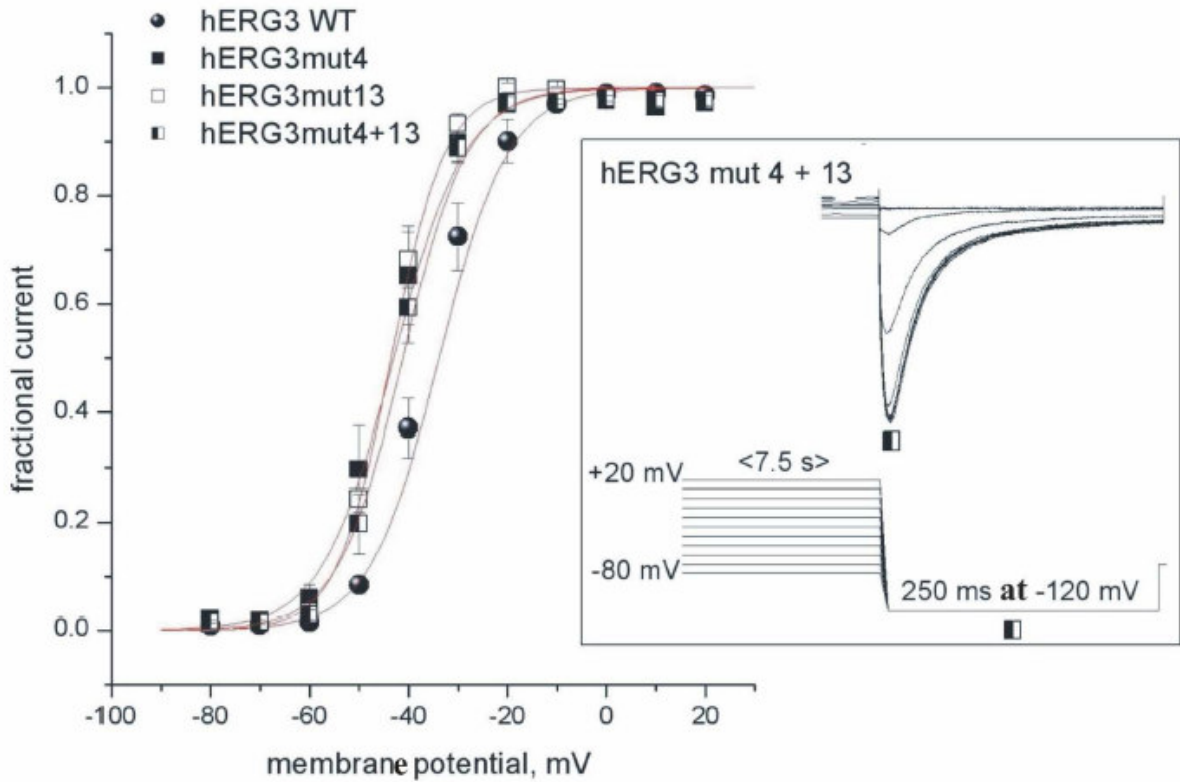


Fig. 13. *Analisi delle correnti.*

	$V_{1/2}$ (mV)	Slope (mV)	N
hERG3 wt	-33.8 ± 1.7	7 ± 0.5	11
hERG3 mut 4	-43.1 ± 2	7.3 ± 0.7	8
hERG3 mut 13	-43.6 ± 1	5.5 ± 0.4	7
hERG3 mut 4+13	-41.2 ± 17	6.6 ± 0.6	13

Tab. 1. *Parametri delle curve di attivazione.*

Da quanto indicato, emerge che, nonostante le variazioni amminoacidiche mappino in porzioni diverse del canale aventi distinte capacità di influenzare la funzionalità di hERG3, tutte le

correnti mediate dai mutanti presentano uno slittamento della curva di attivazione verso valori più iperpolarizzati. Ciò risulta evidente dal confronto del parametro $V_{1/2}$ (il valore a cui metà dei canali si trova allo stato aperto durante registrazioni in “whole cell”). Inoltre, la pendenza (slope) della curva di attivazione sia simile per tutti i costrutti analizzati ai limiti dell'errore standard. In cellule neuronali, dove queste proteine sono in grado di regolare la frequenza di scarica, ciò potrebbe influenzare le proprietà biofisiche alla base dell'eccitabilità cellulare.

Discussione

Parte I:

Espressione di *erg* nel midollo spinale e distribuzione spazio-temporale di neuroni ERG-positivi durante lo sviluppo *in vitro*.

I risultati ottenuti nella prima parte del lavoro di tesi qui riportato rientravano in un più complesso studio, oggetto della pubblicazione Furlan et al., 2005. Tale studio ha portato alla dimostrazione che i geni *m-erg*, le corrispondenti proteine nonché la corrente $I_{K(ERG)}$ sono espresse in interneuroni ventrali di midollo spinale di topo con una definita finestra temporale, durante lo sviluppo *in vitro*. Per definire il profilo di espressione dei canali ERG durante lo sviluppo nel midollo spinale, abbiamo usato un modello *in vitro* semplificato: colture organotipiche di midollo spinale embrionale. In letteratura si è molto discusso sulle potenzialità e sulle limitazioni di queste colture. In particolare, è stato osservato come molti processi di sviluppo della rete neuronale finivano per essere persi in queste condizioni di crescita, per l'assenza di innervazione afferente, necessaria per il completo sviluppo dei circuiti spinali (Harris-Warrick and Marder, 1991; Nusbaum et al., 2001; Branchereau et al., 2002). Tuttavia, questa preparazione è un buon modello utile nello studio della fisiologia spinale, in cui il circuito nell'espianto embrionale subisce maturazione mentre cresce *in vitro* (Ballerini and Galante, 1998; Avossa et al., 2003; Rosato-Siri et al., 2004). Inoltre, recenti osservazioni suggeriscono che durante lo sviluppo nel midollo spinale di topo, l'attività di rete vada incontro a diversi cambiamenti (Branchereau et al., 2002; Hanson and Landmesser, 2003; Whelan, 2003; Rosato-Siri et al., 2004). Per questo motivo abbiamo considerato tale sistema modello opportuno per identificare una popolazione di canali presente durante un particolare periodo di sviluppo nella maturazione spinale. In particolare, abbiamo valutato cambiamenti genici nella maturazione e nell'attività cellulare che avvengono fra la 1° e la 2° settimana *in vitro* (Ballerini and Galante, 1998; Avossa et al., 2003; Rosato-Siri et al., 2004).

Per quanto riguarda il lavoro specifico riportato in questa tesi, è stato valutato il profilo di espressione dei geni *m-erg* durante la maturazione *in vitro* fra la 1° e 2° settimana di coltura. La famiglia ERG è composta da tre membri, *erg1*, *erg2* and *erg3* (Shi et al., 1997). Un trascritto alternativo di *erg1* nei mammiferi (*erg1b*) è anche stato identificato (Lees-Miller et al., 1997; Crociani et al., 2003). In un precedente studio avevamo riportato la presenza di ERG1 in cellule di midollo spinale embrionale durante lo sviluppo *in vitro* (Avossa et al., 2003), senza discriminazione fra ERG1A e ERG1B. Nel presente lavoro, per ovviare a questo problema sono stati usati anticorpi

specifici anti-ERG1A e anti-ERG1B. Esperimenti di immunistochemica effettuati con tali anticorpi sono stati inoltre accompagnati da esperimenti di ibridazione *in situ* non radioattiva (NR-ISH). Entrambi i tipi di esperimento hanno dimostrato che solamente ERG1A è espresso in colture di midollo spinale, mentre l'espressione di ERG1B è confinata ai DRG.

Un altro risultato importante emerso da questo studio è rappresentato dal fatto che tutte le proteine ERG sono down-regolate nella parte ventrale durante lo sviluppo *in vitro*. Questa distribuzione spazio temporale apparentemente mima quello che accade *in vivo* durante lo sviluppo (E17 e P5) corrispondenti a 1 e 2 settimane *in vitro*. Inoltre, a 7 DIV e 14 DIV, le cellule ERG positive sono rappresentate da piccoli neuroni, che mostrano la morfologia degli interneuroni (Caserta and Barker, 1994; Galante et al., 2000; Avossa et al., 2003). Nei nostri esperimenti, la maggior parte delle cellule positive per ERG1A, ERG2 e ERG3 hanno un fenotipo GABAergico. Ulteriori esperimenti saranno necessari per identificare gli interneuroni ERG positivi non GABAergici. La conclusione che interneuroni GABAergici positivi in midollo spinale embrionale sono sempre ERG positivi è interessante. Una delle maggiori differenze fra rete spinale matura e embrionale sta nel fatto che una popolazione di interneuroni GABAergici ventrali a livello embrionale scompare nel tardo sviluppo, possibilmente seguendo un impulso di sviluppo dal GABA alla Glicina (Antal et al., 1994; Barbeau et al., 1999; Gao et al., 2001). Questa popolazione transiente di interneuroni GABAergici potrebbe in parte controllare la spontanea attivazione della rete immatura embrionale. Tale attività è supposta essere necessaria per il normale sviluppo di rete (O'Donovan et al., 1998; Barbeau et al., 1999; Feller, 1999). Può essere speculato che l'espressione di ERG in neuroni GABAergici controlli l'eccitabilità tramite la $I_{K(ERG)}$ ad uno specifico stadio.

Nella II e III parte del lavoro riportato in questa tesi, il lavoro sperimentale si è più direttamente rivolto allo studio dei meccanismi molecolari alla base della patologia epilettica, in particolare alle possibili correlazioni fra epilessia e canali di K^+ della famiglia ERG. Deve essere qui premesso che nonostante la continua ricerca di nuovi farmaci, il 24 % delle epilessie risulta ancora non controllabile e parte delle terapie in uso risulta avere spiacevoli effetti collaterali: nessun farmaco anticonvulsivo ne è infatti privo, e gli inconvenienti più comuni sono la sonnolenza e la

sedazione, che possono ostacolare la normale attività intellettuale. Anche l'utilizzo di terapie alternative quali la tecnica chirurgica e la stimolazione del nervo vago sono ancora in una fase preliminare di sperimentazione clinica. E' necessario quindi sforzarsi nell'affinamento delle terapie esistenti e nella ricerca di nuovi trattamenti clinici e di nuovi farmaci più specifici. La comprensione dei meccanismi molecolari di una patologia è fondamentale per l'identificazione di farmaci specifici. Tale approccio è però, per le sindromi epilettiche, particolarmente complicato a causa della loro ereditarietà multifattoriale, con penetranza variabile ed espressione età dipendente. Un'ulteriore caratteristica che spesso complica il quadro di incidenza mendeliana, è l'espressione variabile: differenti membri di una stessa famiglia possono essere affetti dalla medesima mutazione, ma presentare caratteristiche differenti della sindrome.

PARTE II:

Effetto di scariche epilettiche indotte da acido Kainico (e Pilocarpina) nella espressione dei geni *erg* nell'ippocampo di topo

Il lavoro svolto in questa parte di tesi ha avuto lo scopo di valutare se la scarica epilettica fosse, in qualche modo, in grado di alterare l'espressione dei canali ERG, e in particolare dei geni che codificano per tali canali. Ci sono infatti alcune indicazioni in letteratura (Brewster et al., 2002) secondo le quali le convulsioni febbrili sarebbero in grado di contribuire al successivo innesco di una epilessia limbica mediante una complessa e coordinata modulazione dei canali HCN nell'ippocampo. Sulla base di queste premesse, abbiamo utilizzato un modello sperimentale rappresentato da uno stato di malattia epilettica indotta, nel topo, dalla somministrazione di acido Kainico e dalla successiva valutazione di espressione dei geni *m-erg* a livello dell'ippocampo. L'acido Kainico induce crisi epilettiche alterando i recettori GABA e tali crisi trovano il loro punto d'innescio a livello della regione CA3 dell'ippocampo; da qui poi si propagano a tutto l'ippocampo e quindi al sistema limbico che ha le sue proiezioni nella corteccia. Il nostro protocollo sperimentale cercava di portare una risposta alla seguente domanda: può la scarica epilettica indotta da acido Kainico (o da altre sostanze epilettogene) provocare di per sé alterazioni di geni per canali ionici che, a livello dello stesso ippocampo, potrebbero essere in grado di modulare l'eccitabilità neuronale e pertanto mantenere e/o limitare la propagazione di tale scarica? I risultati da noi ottenuti portano alla conclusione che né la somministrazione di acido Kainico (che coinvolge centri ippocampali in maniera diretta), né di Pilocarpina (che invece induce crisi non coinvolgendo centri ippocampali) produce una significativa variazione dell'espressione dei geni *m-erg*. Ciò avviene sia

nell'ippocampo considerato nella sua totalità, sia valutando tale espressione in specifiche aree ippocampali.

Gli esperimenti da noi condotti hanno richiesto l'analisi di un elevato numero di animali e la conduzione di esperimenti temporalmente distinti fra di loro. Infatti, la valutazione dell'espressione di geni specifici tramite una metodica così raffinata quale la Real Time PCR, condotta però in un modello sperimentale estremamente complesso, non può che richiedere un'analisi ottenuta da un numero elevato di dati, per non incorrere in grossolani errori metodologici. Nel complesso ci sentiamo di poter concludere, che una modulazione dell'espressione dei canali ERG non sembra essere coinvolta nella propagazione e mantenimento delle scariche epilettiche. Questo risultato apparentemente negativo ci ha viceversa stimolato a valutare l'ipotesi opposta, e cioè se alterazioni primitive della funzionalità dei canali ERG potessero essere in grado di rappresentare il “primum movens” della malattia epilettica. Tale studio viene riportato nella parte III della presente tesi.

PARTE III

Valutazione del ruolo patogenetico del gene *herg3*, (KCNQH7) nella malattia epilettica

Lo studio di questa tesi si è rivolto all'identificazione di alterazioni del gene *herg3* (*KCNH7*) in pazienti affetti da epilessia idiopatica. Tale gene codifica per un canale di K⁺ voltaggio-dipendente facente parte della sottofamiglia hERG, il cui rappresentante più noto è il canale hERG1, per il suo coinvolgimento nella sindrome cardiaca del QT lungo. Il canale hERG3 mostra caratteristiche biofisiche comuni ad hERG1, che è in grado di regolare la frequenza di scarica neuronale con proprietà simili alla corrente M responsabile dell'insorgenza di alcune forme di epilessia idiopatica (Chiesa *et al.*, 1997; Sacco *et al.*, 2003). In più, a differenza di hERG1, hERG3 ha la caratteristica di essere espresso esclusivamente nel SNC, ad eccezione delle prime fasi dello sviluppo embrionale. Tale specificità di espressione è stata fondamentale per focalizzare la nostra attenzione sull'analisi di tale gene nelle sindromi epilettiche, in cui la correlazione con anomalie cardiache (spesso da associare a mutazioni di *herg1*) è un evento sporadico.

Tra le mutazioni analizzate nella famiglia 204, quella relativa all'esone 4 di *herg3*, caratterizzata da un cambio di base **c**→**a**, che determina, a livello proteico, una sostituzione dell'amminoacido basico Istidina (H) con Asparagina (N), molecola neutra.

Per quanto riguarda l'eterozigosi a carico dell'esone 13, è opportuno sottolineare che, nonostante non sia presente una correlazione diretta tra sostituzione **a**→**g** e genesi della sindrome epilettica,

tuttavia la trasmissione recessiva presente in tale famiglia, non esclude che tale mutazione rappresenti uno dei molteplici fattori che, in certe condizioni, possono cooperare in tal senso. Questa ipotesi è confermata dalla totale assenza della sostituzione nucleotidica in un ampio numero di controlli sani.

Allo stesso modo, la mutazione a livello della porzione intronica dell'esone 6 nella famiglia 233 rappresenta un interessante elemento di studio. Essa è localizzata su una sequenza intronica, fra l'esone 6 e l'esone 7, la zona coinvolta non risulta fondamentale per la funzionalità della proteina.

Nel nostro laboratorio erano state isolate, in un paziente di sei anni affetto da epilessia, due mutazioni a livello dell'esone 4 e dell'esone 13 del gene *herg3* (*KCNH7*) codificante per il canale di K^+ hERG3. Uno degli obiettivi di questa tesi è stato quello di valutare l'importanza di questi mutanti sulla funzionalità del canale. A tale scopo, è stata mutagenizzata la sequenza *herg3* wild type per riprodurre i singoli mutanti e la sequenza con doppia mutazione ed i costrutti ottenuti sono stati trasfettati in cellule CHO ed HEK293. E' stata quindi valutata la presenza di variazioni nell'espressione, nella localizzazione cellulare e nelle caratteristiche biofisiche dei vari mutanti hERG3. Da tale studio, è emerso come non ci fossero differenze rilevanti nell'espressione di tali proteine. Sono però emerse interessanti variazioni nelle proprietà elettrofisiologiche quando sono state trasfettate cellule HEK293 col canale mutato nell'esone 4, nell'esone 13 o in entrambe le posizioni: in particolare, sembra che in tutti i mutanti si verifichi un analogo spostamento della curva di attivazione verso valori più iperpolarizzati. L'assenza di un effetto cumulativo sullo spostamento della curva nel doppio mutante, potrebbe essere imputato al fatto che gli esperimenti sono stati eseguiti con costrutti in cui le sequenze hERG3 mutate erano state inserite sotto un promotore fortemente attivo qual'è quello presente nei vettori di espressione. Ciò potrebbe aver portato già nel singolo mutante al raggiungimento del massimo valore di shift dell'attivazione sostenibile nel modello cellulare da noi utilizzato. Una seconda spiegazione, potrebbe essere quella di supporre l'esistenza di un'interazione delle due regioni nelle quali sono state individuate le mutazioni e di ipotizzare che questa concorra a determinare la velocità di attivazione del canale. Quindi, sarebbe sufficiente che il canale fosse affetto anche solo da una delle due mutazioni da noi analizzate, affinché proprio tale interazione venga a mancare e si verifichi lo spostamento della curva di attivazione da noi rilevato. Tuttavia, la variazione trovata in tutti i mutanti analizzati dovrà essere ulteriormente verificata con l'espressione dei costrutti in oociti di *Xenopus*, per escludere qualsiasi artefatto post-trascrizionale attribuibile alla loro espressione in cellule eucariotiche. E' da sottolineare che comunque questo risultato assume un forte significato alla luce del fatto che, proprio nelle cellule nervose, i canali hERG sono in grado di regolare la frequenza di scarica neuronale con proprietà simili alla corrente M, responsabile dell'insorgenza di alcune forme di

epilessia idiopatica (Chiesa *et. al.*, 1997; Sacco *et al.*, 2003). Infine, come riportato in letteratura (vedi “Introduzione”), le modificazioni biofisiche rilevate potrebbero essere in grado di influenzare l’assetto delle proteine della famiglia hERG, capaci di interagire a formare eterotetrameri. Infatti, tali canali eterotetramerici mostrano, rispetto a quelli omotetramerici, proprietà elettrofisiologiche diverse, che dipendono dal modo con cui le varie subunità si assortiscono tra di loro.

Bibliografia

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999 Apr 16;97(2):175-87.

Akbarali HI, Thatte H, He XD, Giles WR, Goyal RK.
Role of HERG-like K(+) currents in opossum esophageal circular smooth muscle.
Am J Physiol. 1999 Dec;277(6 Pt 1):C1284-90.

Ashcroft F.M. (2000). Ion channels and disease. Academic press

Avoli M, Gloor P.

The effects of transient functional depression of the thalamus on spindles and on bilateral synchronous epileptic discharges of feline generalized penicillin epilepsy. *Epilepsia*. 1981 Aug;22(4):443-52.

Avoli M, Gloor P.

Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. *Exp Neurol*. 1982 Apr;76(1):196-217. No abstract available.

Avoli M.

Epileptiform discharges and a synchronous GABAergic potential induced by 4-aminopyridine in the rat immature hippocampus. *Neurosci Lett*. 1990 Sep 4;117(1-2):93-8.

Berkovic SF, Scheffer IE.

Febrile seizures: genetics and relationship to other epilepsy syndromes. *Curr Opin Neurol*. 1998 Apr;11(2):129-34. Review.

Biervert C., Schroeder B. C., Kubisch C., Berkovic S. F., Propping P., Jentsch T. J., Steinlein O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal epilepsy. *Science*. **279**: 403-406.

Blumenfeld H.

Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia*. 2005;46 Suppl 9:21-33. Review.

Browne D. L., Ganchar S. T., Nutt, J. G., Brunt E. R. P., Smith E. A., Kramer P., Litt M. (1994). Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat. Genet.* . **8**: 136-140.

Brügemann A, Pardo LA, Stühmer W, Pongs O.

Ether-à-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP.

Nature. 1993 Sep 30;365(6445):445-8

Castano et al., (1995). Anatomia umana. Edi-Ermes.

Chiesa N., Rosati B., Arcangeli A., Olivotto M., Wanke E. (1997). A novel role for HERG K⁺ channels: spike- frequency adaptation. *J. Physiol*. **501**: 313-318.

Choi KL, Aldrich RW, Yellen G.

Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jun 15;88(12):5092-5

Commission on classification and terminology of the international league against epilepsy. 1985 Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 26:268-278.

Crociani O., Guasti L., Balzi E., Becchetti A., Wanke E., Olivotto M., Wymore R. S., Arcangeli A. (2003). Cell cycle-dependent expression of hERG1 and hERG1B isoforms in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 2947-2955.

Dolly JO, Parcej DN.

Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels.

J Bioenerg Biomembr. 1996 Jun;28(3):231-53. Review.

Furlan F., Guasti L., Avossa D., Becchetti A., Cilia E., Ballerini L., Arcangeli A. (2005). Interneurons transiently express the ERG K⁺ channels during development of mouse spinal networks *in vitro*. *Neuroscience* **135**: 1179-1192.

Furlan F, Taccola G, Grandolfo M, Guasti L, Arcangeli A, Nistri A, Ballerini L.

ERG conductance expression modulates the excitability of ventral horn GABAergic interneurons that control rhythmic oscillations in the developing mouse spinal cord. *J Neurosci.* 2007 Jan 24;27(4):919-28.

Ganetzky B, Wu CF.

Indirect Suppression Involving Behavioral Mutants with Altered Nerve Excitability in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics.* 1982 Apr;100(4):597-614.

Guasti L., Cilia E., Crociani O., Hoffman G., Polvani S., Becchetti A., Wanke E., Tempia F., Arcangeli A. (2005). Expression pattern of Ether-A-Go-Go-Related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits. *J. Of comparative neurology* **491**: 157-174.

Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ.

Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K current during the cardiac ventricular action potential. *Pflugers Arch.* 1998 Nov;436(6):843-53

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW.

Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron.* 1991 Oct;7(4):547-56.

Ito M.

Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81(3):1143-95. Review.

Li M, Jan YN, Jan LY.

Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1225-30.

Less Miller J. P., Kondo C., Wang L., Duff H. J., (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circ. Res.* **81**: 719-726.

London B., Trudeau M.C., Newton K. P., Beyer A. K., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Satler C. A., Robertson G. A. (1997). Two isoforms of the mouse Ether g δ -g δ related gene coassemble to form a channel with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ. Res.* **81**: 870-878.

MATSUMOTO H, MARSAN CA.

CORTICAL CELLULAR PHENOMENA IN EXPERIMENTAL EPILEPSY: INTERICTAL MANIFESTATIONS.

Exp Neurol. 1964 Apr;9:286-304. No abstract available.

McCormick DA. 1989. Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing, Trends Neurosci 12:215-221

McCormick DA, Contreras D.

On the cellular and network bases of epileptic seizures. Annu Rev Physiol. 2001;63:815-46. Review.

Neyroud N., Tesson F., Denjoy I., Leibovici M., Donger C., Barhanin J., Faure S., Gary F., Coumel P., Petit C., Schwartz K., Guicheney P. (1997). A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Niels.

Johnston D., Christie B. R., Frick A., Gray R., Hoffman D. A., Schexnayder L. K., Watanabe S., Yuan L. L. (2003). Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Biol. Sci.* **358**: 667-674.

Jurkiewicz NK, Wang J, Fermini B, Sanguinetti MC, Salata JJ.

Mechanism of action potential prolongation by RP 58866 and its active enantiomer, terikalant. Block of the rapidly activating delayed rectifier K⁺ current, IKr. *Circulation.* 1996 Dec 1;94(11):2938-46.

Kandel E., Schwartz J.H., Jessel T. M. *Principles of neural science*. Fourth edition. (2004)

Karle CA, Thomas D, Kiehn J.

The antiarrhythmic drug BRL-32872.

Cardiovasc Drug Rev. 2002 Summer;20(2):111-20. Review.

Kellaway P.

Sleep and epilepsy. *Epilepsia.* 1985;26 Suppl 1:S15-30. Review.

Kiehn J, Lacerda AE, Wible B, Brown AM.

Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide.

Circulation. 1996 Nov 15;94(10):2572-9

Kiehn J, Thomas D, Karle CA, Schöls W, Kübler W.

Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999 Mar;359(3):212-9.

Kim U, Sanchez-Vives MV, McCormick DA.

Functional dynamics of GABAergic inhibition in the thalamus. *Science*. 1997 Oct 3;278(5335):130-4.

Kubisch C., Schroeder B. C., Friedrich T., Lütjohann B., El-Amraoui A., Marlin S., Petit C., Jentsch T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*. **96**: 437-446.en cardioauditory syndrome. *Nat Genet*. **15**: 186-189.

Kupersmidt S, Snyders DJ, Raes A, Roden DM.

A K⁺ channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly activating delayed rectifier current. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27231-5.

Ohya S., Hoovitz B., Greenwood I. A. (2002). Functional and molecular identification of ERG channels neuron porta vein myocytes. *Am. Journal. physiol*. **283**: c866-c877.

Panayiotopoulos CP, Koutroumanidis M, Giannakodimos S, Agathonikou A.

Idiopathic generalised epilepsy in adults manifested by phantom absences, generalised tonic-clonic seizures, and frequent absence status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997 Nov;63(5):622-7.

Panayiotopoulos CP, Sharqi IA, Agathonikou A.

Acephalgic migraine or childhood occipital seizures? *Neurology*. 1997 Nov;49(5):1479-80. No abstract available.

Papa M., Boscia F., Canitano, Castaldo P., Sellitti S., Annunziato L., Tagliatela M. (2003). Expression Pattern of the Ether-A-Gogo-Related (ERG) K⁺ Channel-Encoding Genes ERG1, ERG2, ERG3 in the Adult Rat Central Nervous System. *The Journal of comparative neurology*. **466**: 119-135.

Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY

Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*. 1987 Aug 14;237(4816):749-53.

Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY.

Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. 1991 Jan 24;349(6307):305-10.

Patil N., Cox D. R., Bhat D., Faham M., Myers R. M., Peterson A. S. (1995). A potassium channel mutation in **weaver** mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet*. **11**: 126-129.

Pellegrini A, Gloor P.

Effects of bilateral partial diencephalic lesions on cortical epileptic activity in generalized penicillin epilepsy in the cat. *Exp Neurol*. 1979 Nov;66(2):285-308. No abstract available.

Platika D., Boulos M. H., Baizer L., Fishman M.C. (1985). Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **82**: 3499-3503.

Polvani S., Masi A., Pillozzi S., Gragnani L., Crociani O., Olivotto M., Becchetti A., Wanke E., Arcangeli A. (2003). Developmentally regulated expression of the mouse Homologues potassium channel encoding genes **m-erg1**, **m-erg2**, **m-erg3**. *Gene Expr Patterns*. **3(6)**: 260-269

Rosati B., Marchetti P., Crociani O., Lecchi M., Lupi R., Arcangeli A., Olivotto M., Wanke E. (2000). Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic β -cells: the role of HERG K⁺ channels in firing and release. *FASEB J*. **14**: 2601-2610.

Sacco T., Bruno A., Wanke E., Tempia F. (2003). Functional Roles of an Erg Current isolated in Cerebellar Purkinje Neurons. *J. Neurophysiol*. **90**: 1817-1828.

Saganich M. J., Machado E., Rudy B. (2001). Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J. Neurosci*. **21(13)**: 4609-4624.

Sanguinetti M. C., Jiang C., Curran M. E., Keating M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell*. **81**: 299-307

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT.
Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 1996 Nov 7;384(6604):80-3.

Schroder B. C., Kubish C., Stein V., Jentsch T.J., (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396: 687-690.

Shi W., Wymore R. S., Wange H. S., Pan Z., Cohen I. S., Mc Kinnon D., Dixon J.E. (1997). Identification of two nervous system-specific members of the erg potassium channel gene family. *J. Neurosci*. **17(24)** : 9423-9432.

Shoeb F., Malykhima A. P., Akbaralis H. I. (2003). Cloning and functional characterization in the smooth muscle Ether a go-go related gene K⁺ channel. *J. Biol. Chem*. **278**: 1503-2514.

Schönherr R., Rosati B., Hehl S., Rao V. G., Arcangeli A., Olivotto M., Heinemann S.H., Wanke E. (1999). Functional role of the slow activation property of ERG K⁺ channels. *Eur. J. Neurosci*. **11**: 753-760.

Snyders DJ, Chaudhary A.
High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol*. 1996 Jun;49(6):949-55.

Spinelli W, Moubarak IF, Parsons RW, Colatsky TJ.
Cellular electrophysiology of WAY-123,398, a new class III antiarrhythmic agent: specificity of IK block and lack of reverse use dependence in cat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 1993 Sep;27(9):1580-91.

Steriade M.
Central core modulation of spontaneous oscillations and sensory transmission in thalamocortical systems. *Curr Opin Neurobiol*. 1993 Aug;3(4):619-25. Review.

Taylor BL, Zhulin IB.

PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Jun;63(2):479-506. Review.

Theodore WH, Rose D, Patronas N, Sato S, Holmes M, Bairamian D, Porter RJ, Di Chiro G, Larson S, Fishbein D.

Cerebral glucose metabolism in the Lennox-Gastaut syndrome. *Ann Neurol.* 1987 Jan;21(1):14-21.

Timofeev I, Grenier F, Steriade M.

Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. IV. Paroxysmal fast runs in cortical and thalamic neurons. *J Neurophysiol.* 1998 Sep;80(3):1495-513.

Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA.

HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science.* 1995 Jul 7;269(5220):92-5. Erratum in: *Science.* 1996 May 24;272(5265):1087.

Vandenberg JI, Walker BD, Campbell TJ.

HERG K⁺ channels: friend and foe. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 May;22(5):240-6. Review. Erratum in: *Trends Pharmacol Sci* 2001 Aug;22(8):438

Viloria CG, Barros F, Giráldez T, Gómez-Varela D, de la Peña P.

Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K(+) channel gating. *Biophys J.* 2000 Jul;79(1):231-46

Yellen G, Sodickson D, Chen TY, Jurman ME.

An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J.* 1994 Apr;66(4):1068-75.

Wallace R.H. et al. Mutant GABA_A receptor γ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizure. *Nature Genet.* 28, 49-52 (2001).

Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Tempel BL.

Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci.* 1994 Aug;14(8):4588-99

Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B.

A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science.* 1991 Jun 14;252(5012):1560-2.

Warmke JW, Ganetzky B.

A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 12;91(8):3438-42

Wimmers S, Bauer CK, Schwarz JR.

Biophysical properties of heteromultimeric erg K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 2002 Dec;445(3):423-30. Epub 2002 Oct 31

