



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO

CICLO XXI

RICERCA DI MUTAZIONI PATOGENE NELLA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA: NUOVI DATI E PROSPETTIVE

Direttore della Scuola : Prof. TULLIO POZZAN

Supervisore : Prof. GIAN ANTONIO DANIELI

Dottoranda : GESSICA SMANIOTTO

Gennaio 2009

INDICE

INTRODUZIONE	pag.5
MATERIALI E METODI	pag.15
SCOPO DELLA RICERCA	pag. 31
RISULTATI	pag. 33
DISCUSSIONE	pag. 61
APPENDICE	pag. 69
BIBLIOGRAFIA	pag. 73
RIASSUNTO	pag. 81
SUMMARY	pag. 83
ALTRE RICERCHE	pag. 85

INTRODUZIONE

La Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI), è una patologia del muscolo cardiaco caratterizzata da un ispessimento del setto inter-ventricolare e della parete del ventricolo sinistro (Figura 1). L'ipertrofia è concentrica in assenza di ipertensione arteriosa o di stenosi aortica (Maron BJ, 1997); l'ipertrofia è però quasi di regola asimmetrica, con localizzazione preferenziale nel setto basale, più raramente nel setto medio, nella parete anterolaterale, posterolaterale o all'apice (Klues HG et al., 1995).

A livello microscopico l'alterazione più specifica è il “*myocardial disarray*” (Figura 2) ovvero la sostituzione, in corrispondenza delle regioni ipertrofiche, del regolare pattern istologico del miocardio con una rete tridimensionale e disorganizzata di miofibrille o fibre singole spesso con andamento vorticoide (Maron BJ et Roberts WC, 1979; Maron BJ et Roberts WC, 1981).

Questa alterazione strutturale rappresenta un carattere diagnostico molto specifico quando coinvolga almeno il 5% della superficie considerata dall'esame istologico. Nella cardiomiopatia ipertrofica si verifica inoltre sia fibrosi interstiziale che sostitutiva, come conseguenza della progressiva necrosi ischemica dei miociti (Maron BJ et al., 1986; Lazzeroni E, 1997; Krams R et al., 1998).

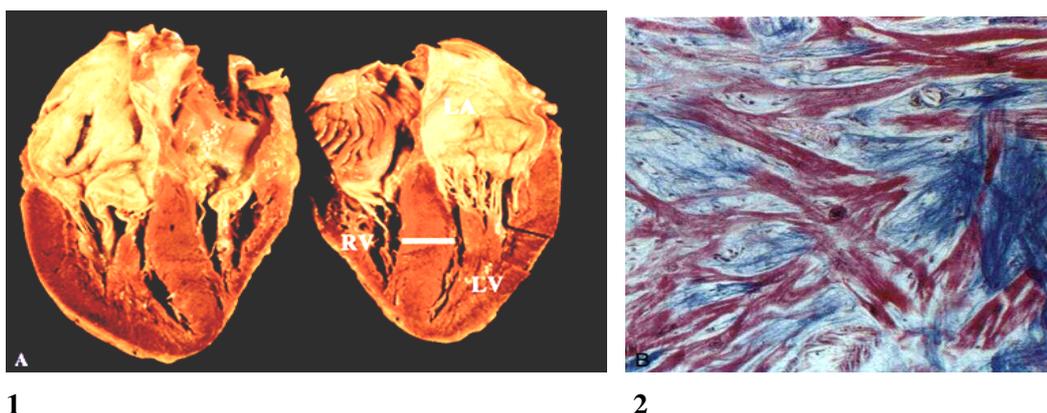


Figura 1: Marcata ipertrofia del ventricolo sinistro (LV) e del setto inter-ventricolare (spessore:19 mm; normale <13 mm); evidente ipertrofia anche dell'atrio sinistro (LA) e della parete del ventricolo destro (RV).

Figura 2: Aspetto istologico della cardiomiopatia ipertrofica: la sezione rivela ingrossamento dei miociti (ipertrofia), disorganizzazione cellulare(disarray) e (C) fibrosi interstiziale (il collagene è colorato in blu nella colorazione tricromica); da Arad M et al., 2002.

La frequenza della cardiomiopatia ipertrofica nella popolazione adulta è di circa lo 0.2%. (Maron BJ et al., 1995).

Il decorso clinico della malattia è estremamente eterogeneo: ci sono casi con lenta progressione dei sintomi, nei quali il paziente è asintomatico o paucisintomatico e mantiene la normale aspettativa di vita e casi molto più gravi in cui la comparsa di fibrillazione atriale determina un aggravamento della sintomatologia dispnoica e rischio di embolie sistemiche. La fase terminale è caratterizzata da alterata funzione sistolica e rimodellamento del ventricolo sinistro.

La morte improvvisa può sopraggiungere a riposo, durante il sonno, oppure durante o subito dopo un intenso sforzo fisico (Spirito P et al., 1997).

Due studi basati su casistiche ampie di pazienti (McKenna W et al., 1981; Maron BJ et al., 1987), hanno registrato una mortalità annua per morte improvvisa del 2-4%. Tuttavia questi dati risentono probabilmente di un vizio di selezione, visto che nel campione considerato dallo studio sono verosimilmente sovrarappresentati i pazienti con patologia più grave (Maron BJ et Spirito P, 1993). Uno studio analogo, condotto su un'ampia popolazione italiana di pazienti con cardiomiopatia ipertrofica (Olivetto I et al., 2003) ha registrato una mortalità annua per morte improvvisa tra 1.2% e 2% mentre in uno studio più recente (Elliot PM et al., 2006) questa percentuale scende al di sotto dell'1%.

Indipendentemente da una certa variabilità nelle stime finora disponibili la cardiomiopatia ipertrofica rimane comunque la causa più comune di morte improvvisa (Maron BJ, 2002), che può sopravvenire in tutte le età, sebbene colpisca prevalentemente soggetti tra i 12 ed i 35 anni. In circa un terzo dei casi l'evento si verifica durante o subito dopo un'intensa attività fisica.

La cardiomiopatia ipertrofica viene riferita come principale causa di morte improvvisa nei giovani atleti degli Stati Uniti (Burke AP et al., 1991). Uno studio analogo condotto in Italia ha rivelato invece che tale patologia è causa relativamente meno frequente di arresto cardiaco, probabilmente perché il controllo cardiologico prescritto per il certificato di idoneità agonistica esclude dall'agonismo i soggetti a rischio; la diagnosi di CMI è stata infatti motivo di esclusione per 22 su 621 atleti (3.5%) (Corrado D et al., 1998).

La cardiomiopatia ipertrofica è ereditata come carattere autosomico dominante a penetranza incompleta ed espressività variabile (Maron BJ et al., 1984).

Appare come malattia a carattere familiare nel 50% dei casi, mentre nell'altro 50% deriva verosimilmente da mutazioni *de novo* (Swynghedauw B, 1998).

La cardiomiopatia ipertrofica è una malattia geneticamente eterogenea, infatti sono più di 17 i loci malattia finora individuati per ciascuno dei quali è stato identificato il gene che, se mutato, è responsabile della patologia (tabella 1).

GENE	LOCUS	PROTEINA
<i>MYH7</i>	14q12	catena pesante della β -miosina
<i>MYBPC3</i>	11p11.2	proteina C che lega la miosina
<i>TNNT2</i>	1q32	troponina T
<i>TNNI3</i>	19q13.4	troponina I
<i>TPM1</i>	15q22.1	α -tropomiosina
<i>MYL2</i>	12q24.3	catena leggera regolatoria della miosina
<i>MYL3</i>	3p21	catena leggera essenziale della miosina
<i>MYLK2</i>	20q13.3	catena leggera chinastica della miosina
<i>TNNC1</i>	3p21.3-p14.3	troponina C
<i>ACTC1</i>	15q14	actina
<i>TTN</i>	2q31	titina
<i>CSRP3</i>	11p15.1	proteina LIM
<i>TCAP</i>	17q12	teletonina
<i>MYOZ2</i>	4q26	miozenina-2
<i>VCL</i>	10q22.1	vinculina
<i>CAV3</i>	3p25	caveolina
<i>PLN</i>	6q22.1	fosfolambano

Tabella 1: Geni e rispettivi loci coinvolti nella cardiomiopatia ipertrofica.

La maggior parte dei geni coinvolti codifica proteine del sarcomero cardiaco (Figura 3). appartenenti ai filamenti spessi e sottili, per tale motivo la cardiomiopatia ipertrofica viene spesso riferita come “malattia del sarcomero”.

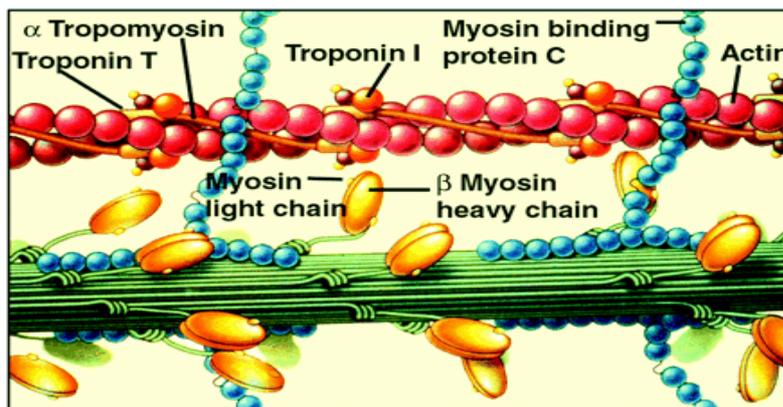


Figura 3: Struttura di un sarcomero del muscolo cardiaco in cui sono evidenziate alcune tra le proteine implicate nella cardiomiopatia ipertrofica.

Il primo gene implicato nella patologia ad essere scoperto è stato *MYH7* che codifica la catena pesante della β -miosina (Geisterfer-Lowrance AA et al., 1990); attualmente sono state individuate oltre 455 mutazioni in geni che codificano altre proteine sarcomeriche quali la troponina T e l' α -tropomiosina (Thierfelder L et al., 1994), la proteina C che lega la miosina (Watkins H et al., 1995), la troponina I (Kimura A et al., 1997), l'actina (Mogensen J et al., 1999), la titina (Satoh M et al., 1999), la catena leggera essenziale della miosina e la catena leggera regolatoria della miosina (Sanbe A et al., 2000) ed infine la catena leggera con attività chinasi della miosina (Davis JS et al., 2001). Mutazioni a carico dei geni che codificano proteine dei dischi z sono state identificate nella proteina LIM del muscolo umano (essenziale per il differenziamento miogenico, oltre che componente citoscheletrica di unione dei sarcomeri periferici al sarcolemma mediante la β I-spectrina) (Geier C et al., 2003), nella teletonina (Hyashi T et al., 2004), e nella miozenina (Osio A et al., 2007). Recentemente è stata riportata anche una mutazione nel gene che codifica la vinculina (Vasile VC et al., 2006), una proteina citoscheletrica localizzata nei dischi intercalari. Inoltre sono risultate associate ad CMI anche mutazioni del gene che codifica il fosfolambano (inibitore endogeno dell'ATP-asi Ca^{2+} dipendente del reticolo sarcoplasmatico) e del suo promotore (Minamisawa S et al., 2003).

Nonostante tale eterogeneità secondo uno studio di Marian AJ et al., 2001 le mutazioni nei geni che codificano per la catena pesante della β -miosina, per la troponina T e per la proteina C che lega la miosina sono la causa più frequente di

CMI essendo insieme responsabili di quasi due terzi di tutte le cause di cardiomiopatia ipertrofica. Attualmente secondo dati riportati nel sito Cardiogenomics (<http://www.cardiogenomics.med.harvard.edu>) mutazioni nei geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3* rappresentano circa il 70% delle mutazioni note. È stato possibile stabilire che nelle forme dovute a mutazioni nel gene *MYH7*, il grado di ipertrofia, è per lo più, direttamente proporzionale al rischio di morte improvvisa . Al contrario nelle forme dovute a mutazione nel gene *TNNT2*, il rischio di morte improvvisa è elevato anche in caso di leggera o assente ipertrofia. Le mutazioni nel gene *MYBPC3* sarebbero associate ad un decorso clinico benigno con un basso rischio di morte improvvisa ed un lento sviluppo dell'ipertrofia; mutazioni a carico della troponina I sono spesso associate ad un fenotipo di tipo restrittivo ((Kubo T et al., 2007).

La miosina è la maggior componente dei filamenti spessi del muscolo cardiaco rappresentando circa il 30% della proteina totale delle miofibrille.

Esistono due isoforme della miosina cardiaca: α -miosina e β -miosina. Nell'uomo tuttavia la seconda isoforma risulta essere la più espressa nel ventricolo adulto.

E' un esamero costituito da due catene pesanti a ciascuna delle quali è associata una coppia di catene leggere (una regolatoria ed una essenziale); ciascuna catena pesante consiste di una testa globulare unita ad una lunga α -elica *coiled-coil*.

Ogni testa o *subfragment-1* (S1) è composta di circa 850 aminoacidi e contiene le regioni responsabili dell'interazione con l'actina, dell'idrolisi dell'ATP e della trasduzione chimico meccanica. La lunga α -elica è invece costituita da 1100 aminoacidi e comprende una porzione N-terminale, detta *subfragment-2* (S2) ed una C-terminale detta LMM (light meromyosin) situata lungo l'asse dei filamenti spessi ne media l'assemblaggio (Sohn RL et al., 1997). In tale dominio si trovano i siti di legame per altre proteine sarcomeriche quali la titina e la proteina C che lega la miosina (figura 4).

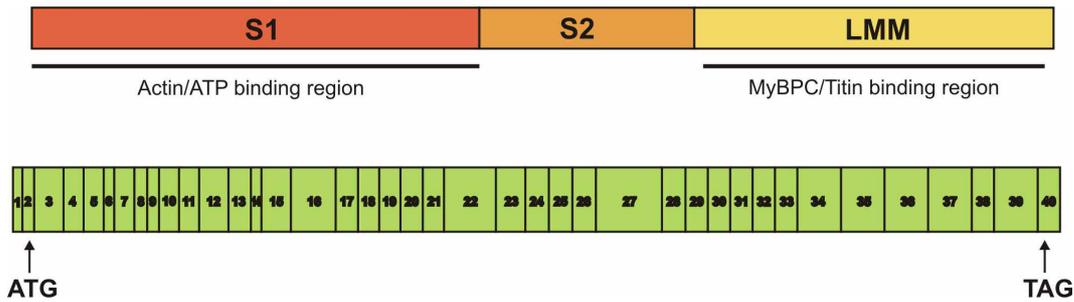


Figura 4: struttura schematica della catena pesante della β -miosina in cui sono rappresentati i domini proteici (in alto) ed i rispettivi esoni che li costituiscono (in basso) .

La proteina C che lega la miosina esiste in tre isoforme espresse rispettivamente nel muscolo liscio, in quello striato ed infine nel muscolo cardiaco.

Il gene *MYBPC3* mappa sul braccio corto del cromosoma 11 e codifica l'unica isoforma espressa in cuore; comprende 24 kb di DNA genomico ed è costituito da 35 esoni che codifica non una proteina di 1274 aminoacidi.

Essa contiene otto domini con alta omologia con quelli immunoglobulinici e tre altamente omologhi a quelli della fibronectina. Sono presenti inoltre una regione tipica solo dell'isoforma cardiaca, ricca in prolina e residui carichi, una regione di fosforilazione ed una contenente i siti di legame per la titina e la beta miosina.(Figura 5).

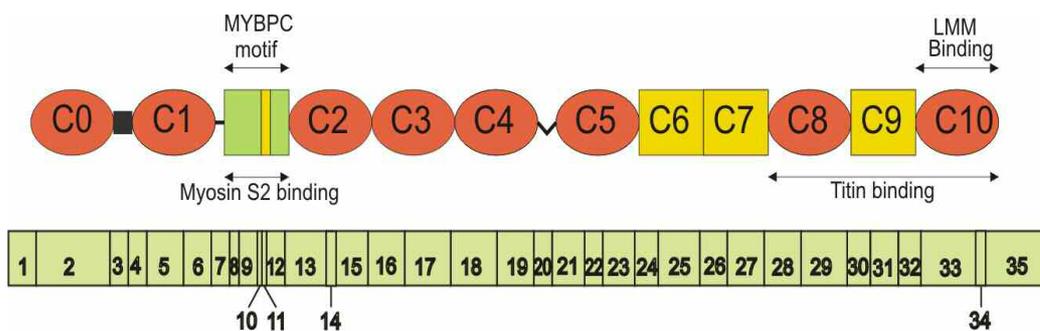


Figura 5: struttura schematica della proteina C che lega la miosina in cui sono rappresentati i domini proteici (in alto) ed i rispettivi esoni che li costituiscono (in basso).

Il complesso troponina è costituito da tre componenti ciascuno dei quali svolge una specifica funzione.

La troponina C lega il calcio, la troponina I inibisce l'attività ATPasica dell'actomiosina ed infine la troponina T provvede al legame dell'intero complesso con la tropomiosina.

Il gene *TNNT2* è costituito da 18 kb di DNA genomico e ha 16 esoni; esistono quattro isoforme cardiache di troponina T prodotte dallo *splicing* alternativo dello stesso gene; quella maggiormente espressa è costituita da 288 amminoacidi ed è formata da due domini principali: uno molto esteso N-terminale o T1 che lega la tropomiosina sui filamenti leggeri ed uno globulare C-terminale o T2 che lega la porzione aminoterminale della troponina I e la troponina C (Figura 6).

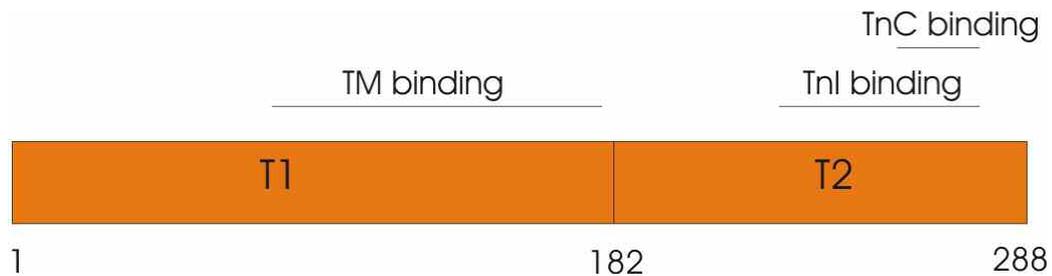


Figura 6: Struttura schematica della troponina T in cui sono rappresentati i domini proteici più importanti.

Il gene *TNNI3*, che mappa sul cromosoma 19, comprende 6.2 kb di DNA genomico ed è costituito da otto esoni che codificano l'unica isoforma cardiaca della proteina costituita da 210 amminoacidi. La troponina I cardiaca ha una regione di inibizione (aa129-149) che a basse concentrazioni di calcio diminuisce la contrazione inibendo l'attività ATPasica dell'actomiosina; sono presenti inoltre siti di legame con la troponina C e T (Figura 7).

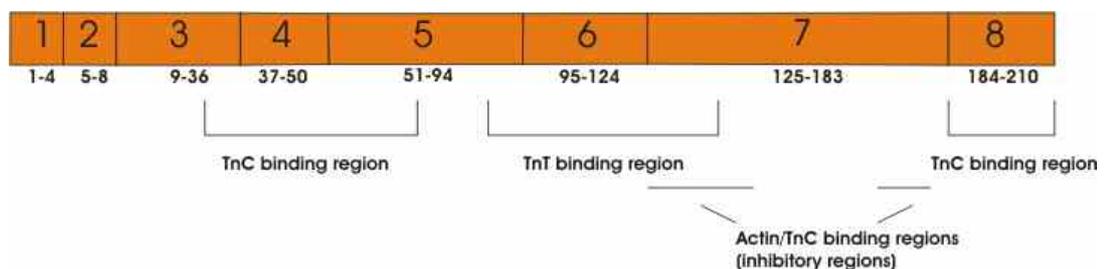


Figura 7: Struttura schematica della troponina I in cui sono rappresentate le regioni d'interazione con le altre troponine.

Mentre l'eziologia della cardiomiopatia ipertrofica è ben conosciuta, la patogenesi molecolare della malattia risulta ancora in buona parte non chiara.

Un'ipotesi largamente condivisa ritiene che l'ipertrofia rappresenti un fenomeno compensatorio rispetto all'alterazione della contrattilità cardiaca dovuta alle mutazioni patogene. L'ipotesi più probabile è che la proteina mutata non venga degradata ed interferisca con la funzione della proteina normale (dominanza negativa); l'anomalia della funzione contrattile che ne deriverebbe indurrebbe una risposta compensatoria alla base delle tipiche alterazioni morfologiche della malattia: ipertrofia e disorganizzazione delle fibre muscolari cardiache (*disarray*), fibrosi interstiziale ed alterazioni della microcircolazione del miocardio. È stato dimostrato che alcune mutazioni (catena pesante della β -miosina e troponina T) determinano ipocontrattilità del cardiomiocita. Questa ipocontrattilità e le anomale sollecitazioni meccaniche a cui sono sottoposti i cardiomiociti (causate dalla disorganizzazione spaziale e dall'asimmetrica distribuzione dell'ipertrofia) determinerebbero alterazioni focali con conseguente rilascio di citochine e/o fattori di crescita responsabili dello sviluppo di ipertrofia e/o di fibrosi interstiziale.

L'ampia variabilità fenotipica intrafamiliarmente potrebbe essere attribuibile ai diversi stili di vita, in particolare al grado di attività fisica e sportiva praticata, ma anche all'età ed al sesso (Bashyaam et al., 2003), alla presenza di altre patologie cardiovascolari (come ad esempio l'ipertensione), e a differenze nel substrato genetico individuale. A tal proposito non è escluso che altri geni contribuiscano a determinare il fenotipo agendo da "geni modificatori".

Attualmente l'identificazione di mutazioni causative è diventata parte integrante della procedura diagnostica; qualora infatti venga identificata una mutazione in un paziente è possibile identificare gli individui a rischio di sviluppare la malattia, analizzando il DNA dei componenti del nucleo familiare.

Poiché il rischio di morte improvvisa è elevato anche in individui asintomatici, un'indagine di questo tipo può risultare molto utile per instaurare precocemente un trattamento che riduca tale rischio.

All'inizio, la ricerca di mutazioni nei geni noti per essere implicati nella cardiomiopatia ipertrofica veniva effettuata mediante *single-strand analysis* (SSCA) o *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE); tali tecniche sono sempre meno utilizzate, sia per la loro relativa laboriosità e forte dipendenza dei risultati dalla manualità dell'operatore, sia perché non garantiscono un'elevata

efficienza. Vengono preferite l'analisi mediante DHPLC (denaturing high performance chromatography) (van Driest et al., 2004; Yu B et al., 2005; Olivotto I et al., 2008) ed il sequenziamento diretto del DNA. Recentemente è stata introdotta, sia pure a livello sperimentale, la ricerca di mutazioni mediante *re-sequencing* su chip a DNA (Waldmuller S et al., 2008; Fokstuen S et al., 2008), tecnologia che consentirebbe di individuare mutazioni in più geni contemporaneamente nel DNA di ogni singolo paziente.

Il presente lavoro si è proposto di allestire un protocollo sperimentale relativamente rapido ed economico, basato sull' analisi DHPLC per la ricerca di mutazioni nei quattro geni più frequentemente implicati nella cardiomiopatia ipertrofica, a partire dalla strategia di analisi, alla progettazione dei primers di amplificazione, fino alla valutazione dell'efficienza comparata con quella di chip a DNA.

MATERIALE E METODI

Reperimento dei casi ed estrazione del DNA da sangue intero

Ai fini della ricerca è stato analizzato il DNA di 82 soggetti italiani definiti affetti da cardiomiopatia ipertrofica, in base a diagnosi clinica eseguita dalla Dott.ssa Paola Melacini (Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari dell'Università di Padova). I pazienti sono stati sottoposti ad esame cardiologico completo (accertamenti clinici, elettrocardiogramma a riposo, ecocardiogramma, monitoraggio Holter per 24 ore e talvolta prove da sforzo e cateterismo cardiaco). I soggetti diagnosticati affetti ma di cui non si aveva alcuna informazione riguardo alla storia familiare sono stati classificati come casi isolati.

La prassi prevede che, una volta diagnosticata la patologia, il cardiologo disponga il prelievo di sangue per l'estrazione del DNA, previo ottenimento del consenso informato da parte del paziente. Ciascun campione di sangue (10 ml) è fornito in provette contenenti 70 µl di Potassio-EDTA (Acido Etilendiamminotetracetico) 0,38 M, per evitarne la coagulazione, e viene mantenuto a -20°C, fino al momento dell'estrazione del DNA.

In questo caso, il DNA è stato estratto con il metodo del salting out (Miller et al., 1988) modificato dal Dott. Rosa (Laboratorio di Genetica Umana Molecolare dell'Università di Padova), il cui protocollo è descritto di seguito.

Reagenti:

- Soluzione N-N (NaCl 0,9%; Nonidet (NP40) 0,1%)
- Soluzione TEN (TrisHCl 10 mM, pH 8; EDTA 2 mM; NaCl 400 mM)
- TE (TrisHCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM)
- SDS 10%
- NaCl saturo
- Cloroformio
- Isopropanolo
- Etanolo 70%

- versare il sangue in una Falcon da 50 ml e aggiungere la soluzione N-N (NaCl 0,9%; Nonidet 0,1%), portando a un volume finale di 40 ml. In questo modo, essendo la soluzione N-N ipotonica, avviene la lisi dei globuli rossi;
- centrifugare per 35 minuti a 6000 rpm a 4°C;
- dopo aver eliminato il surnatante, risospendere il pellet, formato da linfociti, con 40 ml di soluzione N-N;
- vortexare per risospendere al meglio il pellet e centrifugare per 30 minuti a 6000 rpm a 4°C;
- separare il pellet dal surnatante e risospenderlo in 4 ml di soluzione TEN (TrisHCl 10 mM; EDTA 2 mM, pH 8; NaCl 400 mM), un tampone di lisi;
- aggiungere 300 µl di SDS 20%;
- incubare a 80°C per 3 ore sotto agitazione per portare a termine la denaturazione delle proteine;
- aggiungere 1 ml di NaCl saturo per far precipitare la componente proteica;
- centrifugare per 10 minuti a 6000 rpm a temperatura ambiente;
- dopo aver trasferito il surnatante in una Falcon da 15 ml, aggiungere un isovolume di cloroformio;
- agitare e centrifugare per 10 minuti a 6000 rpm a temperatura ambiente. Dopo questo passaggio si possono distinguere nella provetta 3 fasi distinte: il cloroformio, sul fondo; uno strato intermedio di membrane e proteine residue; una fase superiore contenente gli acidi nucleici;
- trasferire la fase superiore in un'altra Falcon da 15 ml, aggiungere un isovolume di isopropanolo e agitare lentamente per inversione: in questo modo si favorisce la precipitazione del DNA che può essere visibile sotto forma di flocculo;
- centrifugare per 15 minuti a 6000 rpm a temperatura ambiente;
- separare il surnatante e lavare il pellet, costituito da DNA addensato, con 2ml di EtOH 70%;
- centrifugare per 10 minuti a 6000 rpm a temperatura ambiente;
- eliminare il surnatante e lavare il pellet con 1 ml di EtOH 70%;
- aspirare l'EtOH e lasciare asciugare il pellet in stufa o sotto cappa biologica;
- quando i flocculi appaiono trasparenti, risospenderli in 300-500 µl di TE autoclavato (TrisHCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM);
- lasciare le Falcon in camera fredda o/n.

Determinazione della concentrazione di DNA tramite spettrofotometro

Il DNA dei campioni è diluito 2:100 con acqua bidistillata sterile, ovvero inserendo nella cuvetta per la lettura allo spettrofotometro 10 µl di DNA e 490 µl di acqua. La calibratura dello strumento è fatta con 500 µl di acqua bidistillata sterile (blank), successivamente si prosegue con l'analisi dei campioni. Durante la misurazione, viene anche annotato il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e l'assorbanza a 280 nm, per conoscere l'indice di purezza. I valori accettabili variano da 1,8 a 2,0: se sono inferiori a 1,8, oltre al DNA nel campione sono presenti impurità, come proteine e fenoli; mentre se sono maggiori di 2,0, potrebbe essere rimasto nel campione del cloroformio, che assorbe alla stessa lunghezza d'onda.

Una volta nota la concentrazione del DNA, il campione viene diluito in acqua bidistillata sterile sulla base dell'equazione

$$C \text{ iniziale} \times V \text{ iniziale} = C \text{ finale} \times V \text{ finale}$$

dove, per lo screening di mutazioni, C iniziale è posto pari a 50 ng/µl.

Amplificazione delle sequenze esoniche dei geni MYH7, MYBPC3, TNNT2 e TNNI3 mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

Ai fini dell'analisi DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e/o del sequenziamento degli esoni dei geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3*, il DNA estratto da ciascun campione e opportunamente diluito è stato amplificato *in vitro* mediante PCR, utilizzando coppie di primers specifiche per le sequenze di interesse. Sebbene le sequenze dei primers per l'amplificazione dei quattro geni in questione fossero in parte disponibili in rete o in letteratura, un'indagine preliminare non le ha ritenute idonee all'utilizzo, perciò le sequenze di tutti i primers necessari per lo screening di mutazioni nei quattro geni considerati sono state riprogettate tramite il programma "Primer3". Quelle riportate nelle appendici A, B e C, che costituiscono il risultato di tale lavoro preliminare e che sono poi state utilizzate per lo screening sono quindi originali.

Ciascuna reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 25 µl, per quei campioni da sottoporre a sequenziamento diretto o all'analisi DHPLC ad una o due temperature diverse; tale volume è stato raddoppiato nel caso in cui l'analisi dovesse essere condotta a tre temperature differenti. Per l'amplificazione sono stati utilizzati due diversi enzimi, AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystem) e GoTaq™ (Promega) entrambe polimerasi “hot start” dotate di attività proofreading (correzione delle bozze).

I reagenti e le relative quantità utilizzate per la preparazione della miscela di reazione sono riportati in tabella 2.

Reagenti	AmpliTaq Gold™	GoTaq™
DNA genomico 50 ng/µl	1µl	1µl
Tampone 10X	2.5µl	-
Tampone 5X	-	5µl
MgCl ₂	1.5µl	-
dNTPs 1 mM	5µl	5µl
Primer forward 10 pmol/µ	1µl	1µl
Primer reverse 10 pmol/µl	1µl	1µl
TaqPolimerasi (5u/µl)	0.16µl	0.125µl
Acqua sterile	12.85µl	11.875µl
Volume totale	25µl	25µl

Tabella 2: Protocolli relativi alle mix di reazione delle due diverse Taq polimerasi utilizzate.

In tabella 3 sono riportate le condizioni di amplificazione relative a ciascuna polimerasi utilizzata.

	T°C	AmpliTaq Gold™	GoTaq™
Attivazione Taq	95°C	8-12 min	2 min
Denaturazione	95°C	30 sec	30 sec
Annealing	T _{ann}	30 sec	30 sec
Estensione	72°C	45 sec	30 sec
Estensione Finale	72°C	5 min	5 min
Blocco reazione	4°C	10 min	10 min

} 35 cicli

Tabella 3: Condizioni di amplificazione relative ai due enzimi utilizzati.

Elettroforesi orizzontale in gel di agarosio al 2%

L'efficienza di ciascuna reazione di amplificazione è stata valutata mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% (p/v), che ha permesso una stima approssimativa della quantità di amplificato attraverso il confronto con un marcatore di peso molecolare a concentrazione nota.

Reagenti:

- Tampone di corsa TAE 1X (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM, pH 8)
- Agarosio (Invitrogen)
- Bromuro di etidio (10ng/μl)
- Marcatore di peso molecolare 100bp (Invitrogen Ladder 100bp)
- Loading Buffer 5X (Orange G 0,25% p/v; glicerolo 30% v/v; EDTA 10mM, pH 8)

Un'opportuna quantità di agarosio in polvere viene sciolta, all'interno di una beuta, in un volume di tampone TAE 1X tale da ottenere una soluzione al 2% (p/v); successivamente si aggiunge bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 1 μg/ml. Il bromuro di etidio è una molecola planare che si intercala tra le basi del DNA e, se viene irradiata da luce ultravioletta, emette fluorescenza nel visibile alla lunghezza d'onda di 590 nm, evidenziando, in tal modo, posizione ed intensità delle bande elettroforetiche. La soluzione di agarosio, così preparata, viene versata nell'apposita vaschetta dotata di pettini per la formazione dei

pozzetti di caricamento e, una volta polimerizzato, il gel viene posto nella camera da elettroforesi, precedentemente riempita con tampone TAE 1X. In ciascun pozzetto, ad eccezione di quello riservato al marcatore di peso molecolare, si caricano 3 μ l di amplificato insieme a 3 μ l di loading buffer, che rende visibile il fronte della corsa grazie alla presenza, al suo interno, del colorante Orange G; il voltaggio applicato, al fine di consentire la migrazione dei campioni, è pari a circa 6 mV per cm di lunghezza del gel. Al termine della corsa elettroforetica, le bande di DNA vengono visualizzate esponendo il gel a luce ultravioletta in un transilluminatore.

Analisi DHPLC

La maggior parte delle sequenze dei geni considerati è stata analizzata mediante DHPLC; gli amplificati in cui l'analisi cromatografica ha rilevato la presenza di una variazione nucleotidica e gli esoni difficilmente analizzabili con tale metodica sono stati sottoposti a sequenziamento diretto.

La cromatografia DHPLC è una tecnica semi-automatizzata e relativamente veloce, che consente di rilevare la presenza di variazioni nucleotidiche tra le due forme alleliche di un frammento di DNA (Oefner e Underhill, 1995). L'analisi cromatografica può essere applicata ad amplificati di dimensioni comprese tra 100 e 700 bp e il principio di separazione delle molecole è quello della cromatografia liquida ad accoppiamento ionico in fase inversa. La fase stazionaria è costituita da una colonna riempita con sfere del polimero polistirene-divinilbenzene (PS-DVB), derivatizzate con catene alchiliche C18 che, essendo idrofobiche ed elettrostaticamente neutre, non interagiscono con gli acidi nucleici. L'accoppiamento ionico è ottenuto con l'ausilio del controione trietilammonioacetato (TEAA), una molecola "ponte" di natura anfipatica; in particolare, la carica positiva del TEAA lega i gruppi fosfato del DNA, carichi negativamente, mentre la parte idrofobica interagisce con le catene C18 permettendo, in tal modo, l'adesione del DNA alla fase stazionaria. La fase mobile, costituita da una miscela di TEAA, acqua ed acetonitrile in bassissima concentrazione, consente inizialmente la ritenzione in colonna delle molecole di

DNA; aumentando progressivamente la quantità di acetonitrile in soluzione, si crea un gradiente lineare di eluizione che comporta il distacco dei frammenti di DNA dalla matrice, in quanto l'acetonitrile compete con il TEEA nel legame all'acido nucleico. Il principio alla base dell'analisi DHPLC, che consente di rilevare la presenza di una variazione nucleotidica nel DNA, è la differente velocità di eluizione delle molecole eteroduplex rispetto alle omoduplex. La corsa cromatografica viene condotta ad una temperatura critica, definita temperatura di "quasi denaturazione", alla quale il DNA è sotto forma di doppia elica per il 75% della sua sequenza; a tale temperatura gli eteroduplex risultano maggiormente denaturati rispetto agli omoduplex, a causa della presenza del mismatch tra le basi non complementari. La maggiore denaturazione determina un'interazione meno stabile con la fase stazionaria e, di conseguenza, un'eluizione più precoce (Xiao e Oefner, 2001). La temperatura di "quasi denaturazione" è strettamente correlata alla composizione nucleotidica del frammento in esame, pertanto, alcuni esoni richiedono l'analisi a diverse temperature, in quanto costituiti da più domini di melting. Durante la separazione cromatografica l'eluato passa in continuo in uno spettrofotometro, corredato di microcella a flusso, che consente di misurare l'assorbanza delle molecole di DNA a 260 nm; il valore viene registrato da un computer e riportato sotto forma grafica di cromatogramma. In presenza di una variazione nucleotidica in eterozigosi, si dovrebbero osservare, teoricamente, quattro picchi di eluizione (Figura 8).

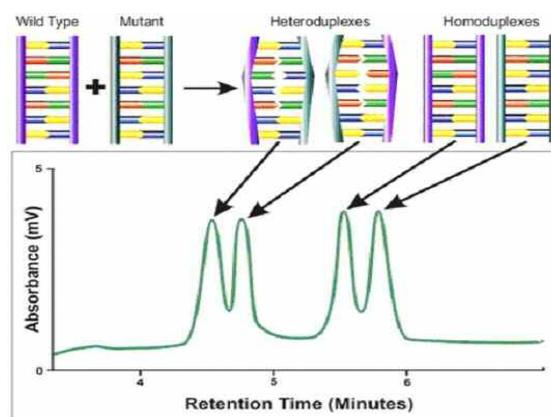


Figura 8: Rappresentazione schematica della formazione delle molecole di DNA eteroduplex e omoduplex, in seguito a denaturazione termica e successiva rinaturazione di un campione con una variazione nucleotidica in eterozigosi. Nel relativo cromatogramma, derivante dall'analisi DHPLC, si osservano i picchi di eluizione corrispondenti alle quattro diverse molecole presenti.

I cromatogrammi dei vari campioni in esame sono confrontati con quello di riferimento, relativo ad un soggetto sano; gli amplificati che mostrano un profilo anomalo vengono sottoposti a sequenziamento, allo scopo di definire il tipo di cambiamento nucleotidico presente. Le sequenze caratterizzate da un elevato numero di ripetizioni mononucleotidiche o da domini con temperature di analisi molto diverse danno origine a cromatogrammi non significativi e di difficile interpretazione; in questi casi si ricorre al sequenziamento diretto dei frammenti. Gli amplificati ottenuti mediante PCR vengono sottoposti a denaturazione termica a 95°C per 5 minuti, così da permettere la separazione di ciascun frammento di DNA nei due filamenti che lo compongono; successivamente, mantenendo i campioni a temperatura ambiente per 30 minuti, si ottiene la rinaturazione spontanea delle molecole di DNA. In tal modo, se in un campione è presente un cambiamento nucleotidico in eterozigosi, il riappaiamento casuale delle singole eliche di DNA porta alla formazione di una miscela di frammenti omoduplex, costituiti da due filamenti perfettamente complementari, ed eteroduplex, caratterizzati dalla presenza di un mismatch tra le basi, in corrispondenza della variazione. Il differente comportamento cromatografico di questi due tipi di molecole permette di individuare la presenza di mutazioni o polimorfismi nei campioni in esame.

Una volta completata la fase di rinaturazione, i prodotti di PCR sono pronti per l'analisi in DHPLC; il volume di iniezione viene stabilito in base alla concentrazione approssimativa di DNA, stimata attraverso l'elettroforesi in gel di agarosio, in modo da ottimizzare l'intensità dei picchi di eluizione.

Sequenziamento

Prima di sequenziare i campioni, è stata effettuata una reazione di purificazione allo scopo di rimuovere i dNTPs e i *primers* in eccesso non utilizzati durante l'amplificazione, in quanto la loro presenza avrebbe potuto interferire con il sequenziamento. Gli amplificati sono stati purificati utilizzando un *kit* (PCR Product Pre-sequencing Kit, Amersham Pharmacia Biotech) che comprende gli enzimi SAP (*Shrimo Alcaline Phospatase*) ed EXO (*Exonuclease I*). SAP è una fosfatasi alcalina che idrolizza i dNTPs a nucleosidi e fosfato inorganico; EXO è un'esonucleasi che rimuove i *primers* ed ogni eventuale DNA a singolo filamento.

Per ogni campione, sono stati purificati 5 μ l di DNA aggiungendo 0,5 μ l di SAP e 0,5 μ l di EXO; le condizioni della reazione di purificazione sono riportate nella tabella 4.

<i>Step</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
Attivazione degli enzimi	37°C	15'
Inattivazione degli enzimi	80°C	15'
Blocco della reazione	4°C	10'

Tabella 4: Condizioni della reazione di purificazione.

La reazione di sequenziamento richiede una quantità di DNA purificato pari a 3 ng per 100 bp di lunghezza dell'amplificato e 1 μ l di *primer* (*forward* o *reverse*), inoltre la miscela deve essere completamente disidratata.

Il sequenziamento è stato effettuato presso il centro BMR-Genomics di Padova, utilizzando il sequenziatore automatico a 96 capillari ABI PRISM 3730XL DNA Sequencer (Applied Biosystems). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con i programmi Chromas e SeqMan II.

Chip a DNA

In collaborazione con la Dott.ssa Siv Fokstuen dello University Hospital, Genetic Medicine di Ginevra, 12 degli 82 pazienti considerati in questo studio, sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni anche con il metodo dei chip a DNA (Fokstuen S et al., 2008).

Ogni chip è un *array* ad alta densità costituito da 400000 oligonucleotidi di 25 pb per ciascuna sequenza da interrogare per un totale di circa 30kb di DNA genomico.

Ciascun *resequencing array* (customSeq Affymetrix, Santa Clara, CA), contiene la sequenza senso ed antisenso di tutti gli esoni codificanti 12 geni implicati nella cardiomiopatia ipertrofica (*MYH7*, *MYBPC3*, *MYL3*, *MYL2*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*, *TPMI*, *ACTC*, *CSRP*, *PLN*, *PRKAG2*), per un totale di 160 esoni, i siti donatori ed accettori di *splicing*, le sequenze note dei promotori di alcuni geni

(*MYL3*, *MYL2*, *PRKAG2*, *TNNC1* e *TNNI3*) e le sequenze non codificanti degli esoni dei geni *MYH7* e *PLN*.

Una volta amplificato il DNA del paziente relativo ai geni considerati, questo viene ibridato sul chip che contiene per ogni posizione del nucleotide interrogato presente su entrambi i filamenti di DNA 8 sonde: due perfettamente complementari e sei non complementari.

I segnali di ibridazione vengono letti da un laser ad alta risoluzione ed i risultati interpretati per mezzo di un software specifico.

In questo modo è possibile individuare direttamente con quale sonda abbia ibridato il DNA del paziente stabilendo quindi sia il gene sia la precisa sequenza complementare.

Strumenti bioinformatici

BCM Search Launcher-Sequence utilities

(Baylor College of Medicine Search Launcher)

<http://searchlauncher.bmc.tmc.edu>

Il Baylor College of Medicine Search Launcher è un sito che si occupa di organizzare la ricerca e l'analisi relative alla biologia molecolare disponibile online ed è suddiviso in varie sezioni, in base alle diverse possibilità di analisi dei dati, sia nucleotidici che amminoacidici. La sezione Sequence Utilities fornisce svariate funzioni per la rielaborazione delle sequenze quali, ad esempio, la codifica nei sei frames di lettura e la conversione in formato FASTA.

Chromas

(non disponibile in rete)

Chromas è un programma utilizzato per l'analisi degli elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento automatico del DNA. I picchi relativi al segnale di fluorescenza emesso dalle diverse sonde, corrispondenti ai quattro nucleotidi, vengono visualizzati con un'elevata risoluzione, ma non è consentita l'analisi di più di una sequenza alla volta.

Seqman II

(non disponibile in rete)

Seqman II è un programma utilizzato per l'analisi degli elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento automatico del DNA. Importando le sequenze nel giusto formato, è possibile costruire un contiguo che consente di confrontare in modo rapido i frammenti amplificati a partire dal DNA di individui diversi e identificare eventuali differenze rispetto alla sequenza consenso.

Clustal W

[\(http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/\)](http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/)

Clustal W è un programma, fornito dal Bioinformatics Center Institute for Chemical Research dell'Università di Kyoto, che consente di eseguire l'allineamento multiplo di sequenze omologhe.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

[\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

Set di programmi per la ricerca di similarità tra sequenze nucleotidiche o proteiche gestito e distribuito dalla N.C.B.I. Questi programmi si basano su un algoritmo che tende a massimizzare gli allineamenti locali, ossia le regioni di appaiamento tra due sequenze per le quali il punteggio è localmente massimo. Ciò permette di identificare regioni isolate di similarità, che risultano molto utili nell'analisi bioinformatica di domini nucleotidici o proteici.

In particolare, il programma Advanced BLAST Search consente di mettere a confronto una singola sequenza con un intero database, mentre il BLAST 2 sequences permette di confrontare due sequenze singole. Quest'ultimo è a sua volta costituito da cinque diversi programmi:

- blastn: confronta una sequenza nucleotidica con un database di sequenze nucleotidiche;
- blastp: confronta una sequenza proteica con un database di sequenze proteiche;
- blastx: traduce la sequenza nucleotidica di interesse nelle sei possibili fasi di lettura e confronta queste ultime con un database di sequenze proteiche;
- tblastn: confronta una sequenza proteica con un database di sequenze nucleotidiche dinamicamente tradotte nelle sei possibili fasi di lettura;

-tblastx: traduce la sequenza nucleotidica di interesse nelle sei possibili fasi di lettura e confronta queste ultime con un database di sequenze nucleotidiche dinamicamente tradotte nelle sei possibili fasi di lettura.

dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

Il dbSNP è una banca dati, gestita dalla N.C.B.I., che identifica e cataloga gli SNPs (polimorfismi di singoli nucleotidi) presenti nei genomi di vari organismi.

Genbank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>

Genbank è una banca dati, fornita dalla N.C.B.I., che raccoglie tutte le sequenze nucleotidiche pubblicamente disponibili. Insieme a DDBJ (DNA DataBank of Japan) ed EMBL (European Molecular Biology Laboratory), Genbank fa parte dell'International Nucleotide Sequence Database Collection, una collaborazione tra diverse banche dati con lo scopo di condividere quotidianamente i dati riguardanti le sequenze nucleotidiche.

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

Database mondiale delle malattie ereditarie della National Library of Medicine (NLM). Nato come MIM alla J.Hopkins University, è stato successivamente sviluppato ed introdotto in rete dalla N.C.B.I.

UCSC Human Genome Browser

<http://www.genome.ucsc.edu>

Si tratta di un database, fornito dalla suite di UCSC Genome Bioinformatics, che consente la visualizzazione di porzioni genomiche, in qualsiasi scala, mettendo in evidenza la presenza di CpG, di geni noti e predetti con relativa suddivisione in esoni ed introni, UTR e ORF e le varie isoforme prodotte. Inoltre, vengono indicati gli SNPs, i siti di restrizione eventualmente presenti, il grado di conservazione nei vari genomi, ESTs e mRNA.

CARDIOGENOMICS PGA

<http://www.cardiogenomics.med.harvard.edu>)

Uno degli undici Programmi per Applicazioni Genomiche (PGAs) fondati dal National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) del National Institute of Health (NIH), USA. Creato nel 2000 con lo scopo di fare progredire la ricerca genomica funzionale relativa a cuore, fegato e sangue, esso contiene informazioni su geni, strutture, funzioni, disfunzioni e anomalie strutturali del sistema cardiovascolare. Tutti i dati sono resi pubblicamente disponibili alla comunità scientifica.

Navigator™ Software

(non disponibile in rete)

Il Navigator™ Software è il programma che consente la gestione del sistema Transgenomic Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System (Transgenomic Wave System), utilizzato per l'analisi DHPLC.

La finestra "DNA" permette di inserire la sequenza dell'amplificato da analizzare e, tramite una variante dell'algoritmo di Fixman-Freire, il software calcola la probabilità che ogni nucleotide si trovi in una struttura a doppia o singola elica, al variare della temperatura (Fixman e Freire, 1977). I risultati ottenuti vengono visualizzati in forma grafica in quattro riquadri distinti. La prima curva mostra la percentuale di doppia elica al variare della temperatura; la seconda indica la percentuale di doppia elica rispetto alla posizione di ciascuna base nell'amplificato, ad una data temperatura; il terzo e il quarto grafico descrivono il rapporto tra temperatura di analisi e posizione delle basi nella sequenza. In genere, è il secondo grafico ad essere determinante nella scelta della temperatura ottimale per la ricerca di mutazioni nel frammento di DNA. Il Navigator™ Software consiglia automaticamente la temperatura di "quasi denaturazione", alla quale la sequenza di interesse ha una percentuale media di doppia elica del 75-80%; in alternativa, è possibile selezionare altri valori e visualizzare sullo stesso riquadro le curve corrispondenti, in modo da scegliere la temperatura più soddisfacente. Tali valori, unitamente al gradiente di eluizione prescelto, sono memorizzati attraverso l'opzione "Method".

Tramite la finestra “Injection” è possibile creare un progetto di analisi, inserendo i dati relativi a ciascun campione, come il nome, il numero del pozzetto in cui viene caricato all’interno di una piastra da 96, il volume di PCR che si desidera iniettare in colonna e il metodo pre-memorizzato con il quale si intende effettuare l’analisi. Infine, la finestra “Analysis” consente di visualizzare i cromatogrammi ottenuti, selezionando quelli di interesse; scegliendo l’opzione “Mutation Calling”, i risultati vengono normalizzati e riportati in un grafico tridimensionale, in cui ogni campione è rappresentato da un punto e punti vicini simboleggiano dei risultati equiparabili.

Primer 3

<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>

Programma gestito e distribuito dalla WI/MIT che consente, inserendo la sequenza di interesse, di trovare una o più coppie di primers specifici con le caratteristiche scelte di volta in volta dall’operatore.

Una buona coppia di primers deve essere in grado di soddisfare alcuni requisiti:

- specificità per la sequenza bersaglio dell’amplificazione;
- stabilità soprattutto nell’appaiamento al 3’, indispensabile per l’innesco della sintesi da parte della DNA polimerasi;
- sequenza tale da non dare origine a dimerizzazione o formazione di strutture intramolecolari che potrebbero diminuire l’efficienza di appaiamento con lo stampo;
- Tm (temperatura di melting) paragonabile.

Nella progettazione dei primers sulla sequenza di interesse, il programma Primer 3 valuta tutte queste caratteristiche; esso inoltre permette di impostare diverse opzioni, tra le quali le più utilizzate sono:

- Excluded region: consente di definire la regione all’interno della quale non si vuole vengano costruiti i primers. Questo permette di progettare dei primers intronici fiancheggiati gli esoni da amplificare;
- Target region: consente di definire la regione che deve essere compresa dal prodotto di amplificazione;
- Mispriming library: consente di indicare la libreria che deve essere consultata dal programma per la ricerca di eventuali elementi ripetuti;

-Optimum primer size: consente di definire le dimensioni di ogni primer. In questo caso è stata scelta una lunghezza ottimale di 20 basi, compresa tra un minimo di 18 basi ed un massimo di 24;

-Product size range: consente di indicare le dimensioni massime di ogni prodotto di amplificazione. Sono state scelte dimensioni comprese tra le 200 e le 400 basi circa;

-Optimum Tm: consente di indicare la temperatura di melting per ogni coppia di primers. Generalmente è stata scelta una temperatura ottimale di 62°C, compresa tra una temperatura minima di 58°C ed una massima di 68°C.

PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>

PubMed è una banca dati, sviluppata dall'N.C.B.I, che consente la ricerca bibliografica di tutte le pubblicazioni scientifiche a livello mondiale; l'abstract è consultabile gratuitamente e spesso è possibile accedere all'intero articolo.

SCOPO DELLA RICERCA

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è una patologia cardiaca relativamente frequente (1/500 adulti), ereditata come carattere autosomico dominante e caratterizzata da un ispessimento del setto interventricolare e della parete del ventricolo sinistro. Essa è ritenuta la principale causa di morte improvvisa soprattutto nei giovani. Lo scopo della ricerca è la messa a punto un protocollo di screening, basato su DHPLC, che risulti conveniente per individuare mutazioni nel DNA di soggetti affetti da tale patologia. Il nuovo protocollo di analisi è stato impiegato per individuare mutazioni in 82 soggetti affetti (di cui 43 casi indice e 39 casi isolati).

RISULTATI

L'analisi genetica è stata eseguita su 43 casi indice e 39 casi isolati indagando preliminarmente gli esoni che i dati di letteratura indicano come maggiormente interessati da mutazioni, in particolare gli esoni dal 3 al 40 (compresi) del gene *MYH7*, gli esoni dall'1 al 35 del gene *MYBPC3*, gli esoni dall'1 all'8 e dall'8 al 16 dei geni *TNNI3* e *TNNT2* rispettivamente. Ogni singolo esone è stato amplificato mediante PCR con primers appositamente progettati. Lo screening di mutazioni è stato effettuato mediante DHPLC e sequenziamento diretto.

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi per ciascun gruppo di pazienti in ogni gene, la descrizione delle mutazioni rilevate e le caratteristiche cliniche dei soggetti che le presentano.

RICERCA DI MUTAZIONI NEI CASI INDICE

GENE *MYH7*

Il gene *MYH7* mappa sul cromosoma 14, comprende 23 kb di DNA genomico, è costituito di 40 esoni di cui 38 codificano una proteina, la catena pesante della β -miosina, di 1935 aminoacidi. *MYH7* è stato il primo gene le cui mutazioni siano state associate a cardiomiopatia ipertrofica (Geisterfer-Lowrance AA et al., 1990) ed è responsabile di circa 30% di tutte le variazioni patogene finora note.

L'analisi mediante DHPLC e sequenziamento diretto di questo gene ha portato all'identificazione di sei mutazioni in cinque pazienti di cui due già note in letteratura e quattro nuove (Tabella 5).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 5	c.428 G>A	R143Q
Esone 13	c.1219 G>T	G407C
Esone 19	c.2146 G>A	G716R
Esone 22	c.2631 G>T	M877I
Esone 35	c.4962G>T	Q1654H
Esone 36	c.5269C>T	T1760M

Tabella 5: Mutazioni nel gene *MYH7* individuate in cinque casi indice (in rosso sono riportate le variazioni non note in letteratura).

Sono state inoltre individuate variazioni già riportate nel database dei polimorfismi o comunque presenti nella popolazione italiana di controllo (Tabella 6).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Estone 3	c.-33 G>T c.189 T>C	- T63T	nuovo 2069540
Estone 5	c.480 C>T	N160N	45500700
Estone 7	c.597 A>G	A199 A	2069541
Estone 8	c.732C>T	F244F	2069542
Estone 11	c.Es11+44 T>C	-	nuovo
Estone 12	c.1062 C>T c.1095 G>A c.1128 C>T	G354G K365K N376N	735712 735711 2231126
Estone 20	c.Es20-56 A>G	-	3729818
Estone 24	c.2967 T>C	I989I	7157716
Estone 25	c.3133 C>T	R1045C	45611033
Estone 27	c.Es27-3 insC	-	45504498
Estone 28	c.Es28+27 T>A	-	2277475
Estone 29	c.Es29+63 insC	-	33987796
Estone 30	c.Es30-30 A>G c.Es30-75 G>A	- -	7159367 45550632
Estone 32	c.4472 C>G	S1491C	3729823
Estone 33	c.Es33+80 C>T	-	59799414
Estone 38	c.Es38+32 G>A	-	3729833
Estone 40+3'UTR	c.5920 G>A c.5950 C>A	- -	17794387 12147570

Tabella 6: Polimorfismi individuati nel gene *MYH7*

c.428 G>A→R143Q (esone 5)

L'analisi mediante DHPLC dell'amplificato corrispondente all'esone cinque ha portato all'individuazione di un profilo di eluizione anomalo rispetto al controllo nel caso indice #37. Il successivo sequenziamento diretto del frammento ha rilevato la presenza della sostituzione nucleotidica c.482 G>A che porta al cambiamento aminoacidico R143Q, già noto in letteratura come mutazione causativa della cardiomiopatia ipertrofica. La mutazione riguarda l'arginina 143 posta in un sito attivo della proteina (Koyanagi T et al., 1996).

Il paziente presenta una lieve ipertrofia, in base al valore dello spessore del setto inter-ventricolare; tuttavia poiché presenta familiarità per la CMI, sono stati studiati i familiari viventi. All'esame del DNA nessuno di essi è risultato portatore della mutazione identificata nel caso indice (Figura 9).

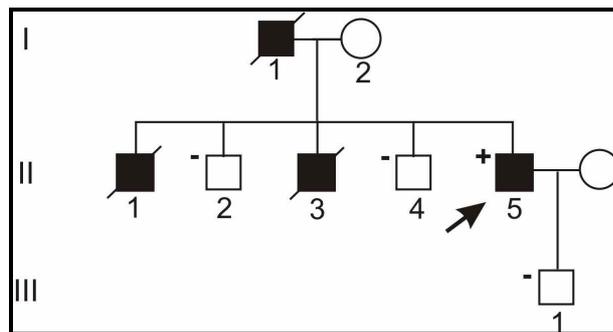


Figura 9: Albero genealogico del paziente con mutazione R143Q. La presenza o assenza della mutazione è indicata rispettivamente con i simboli + e -.

c.1219 G>T→G407C (esone 13)

Un profilo di eluizione anomalo è stato riscontrato nell'esone tredici del gene *MYH7* nel caso indice #35. Il successivo sequenziamento del frammento ha rivelato la presenza della sostituzione nucleotidica c.1219 G>T che porta alla sostituzione missenso G407C (Figura 10).

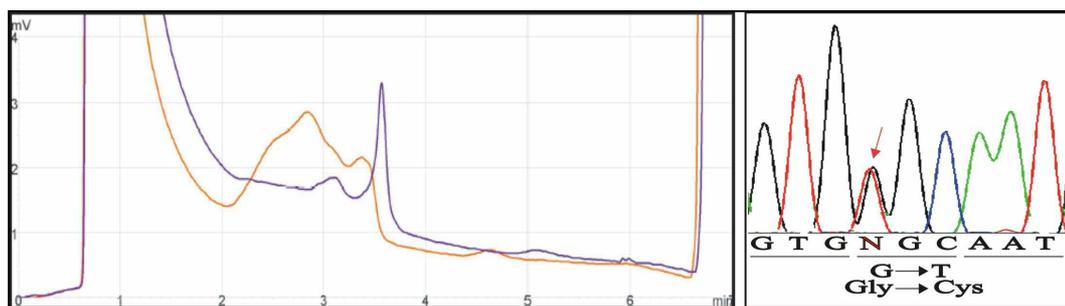


Figura 10: Profilo di eluizione dell'amplificato "esone 13" nel paziente con variazione G407C (in rosso) e nel controllo (in blu) e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Tale variazione non è presente del database dei polimorfismi e non è stata riscontrata in 150 individui sani della popolazione di controllo.

Essa comporta un cambiamento aminoacidico piuttosto importante, infatti un residuo di glicina non polare ed idrofobico viene sostituito con uno di cisteina, polare e idrofilico in una regione molto conservata nei mammiferi (Figura 11).

Human	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	R
Rhesus	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	RR
Mouse	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	RR
Dog	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	RR
Horse	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	RR
Armadillo	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	RR
Opossum	T	V	Y	E	N	G	V	K	V	R

Figura 11: La variazione G407C coinvolge un residuo molto conservato tra i mammiferi.

E' importante notare che il paziente in cui è stata riscontrata è deceduto improvvisamente a soli 24 anni, nonostante dal punto di vista clinico risultasse essere affetto da una forma lieve di CMI, compatibile con aspettative di sopravvivenza pressochè normali. Si può quindi ipotizzare che tale variazione sia verosimilmente patogena.

c.2146 G>A→G716R (esone 19)

c.4962 G>T→Q1654H (esone 35)

L'analisi DHPLC ha portato alla rilevazione di due pattern di eluizione anomali rispetto al controllo nell'esone diciannove e nell'esone trentacinque nel DNA del paziente #16. Il sequenziamento dei due frammenti ha confermato la presenza di due differenti variazioni nucleotidiche che portano entrambe ad un cambiamento aminoacidico (Figura 12).

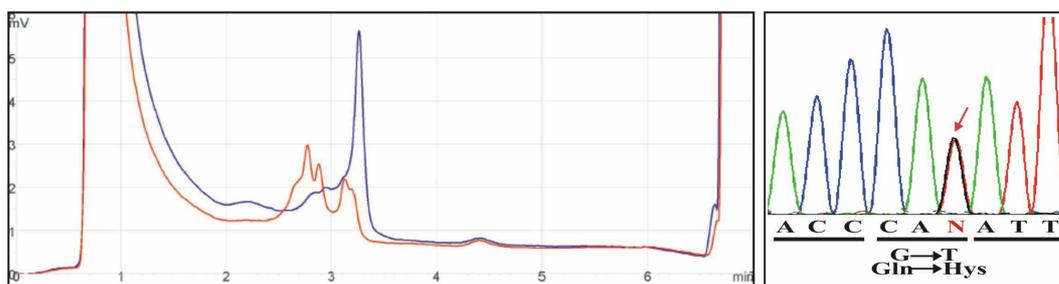


Figura 12: Profilo di eluizione del paziente con variazione Q1654H (in rosso) rispetto al controllo sano (in blu) nell'esone 35 e risultato del sequenziamento.

La prima variazione in posizione c.2146 G>A nell'esone 19 porta alla sostituzione missenso G716R, mutazione già nota in letteratura associata ad una prognosi maligna con alta incidenza di morte improvvisa soprattutto nei giovani (Hwang

TH et al., 1998); la seconda c.G>T 4962 causa la sostituzione Q1654H nell'esone 35, che non è presente nel database dei polimorfismi e non è stata riscontrata in 150 individui della popolazione di controllo.

La persona affetta era un'adolescente morta improvvisamente all'età di 17 anni subito dopo un intenso sforzo fisico; il suo cuore era caratterizzato da un'ipertrofia massiva; la madre era morta all'età di 37 anni per scompenso cardiaco, ma in assenza di una diagnosi precisa non era stata fatta l'autopsia. Si può presumere che anche la madre presentasse lo stesso difetto.

c.2631 G>T→M877I (esone 22)

Il cambiamento nucleotidico riscontrato c.2631 G>T porta alla sostituzione aminoacidica missenso M877I (Figura 13), in cui un residuo di metionina idrofilico e non carico viene sostituito da uno di isoleucina, idrofobico e non polare in una regione altamente conservata tra le specie (Figura 14) e già nota in letteratura come sito mutabile (Greber-Platzer et al., 2001).

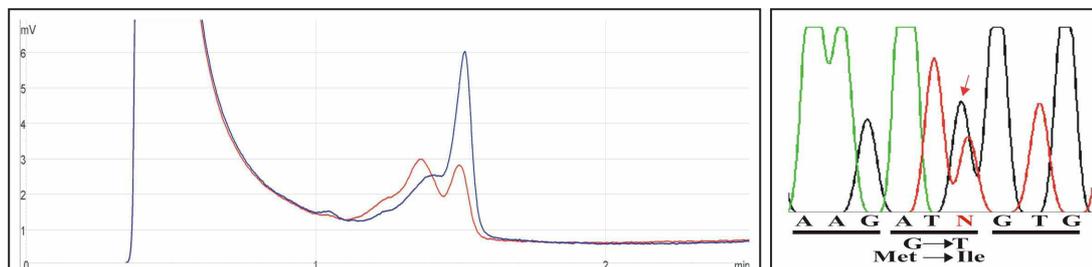


Figura 13 : Doppio picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione M877I (in rosso) rispetto al controllo sano (in blu) nell'esone 22 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Human	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E
Rhesus	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E
Mouse	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E
Dog	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E
Horse	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E
Armadillo	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E
Opossum	K	E	Q	L	L	S	V	M	K	E	E

Figura 14: La variazione M877I coinvolge un residuo molto conservato nei mammiferi.

La variazione inoltre non risulta presente nel database dei polimorfismi e non è stata riscontrata in 150 individui sani della popolazione di controllo, per cui può essere considerata come potenzialmente patogena.

c.5269 C>T→T1760M (esone 36)

Il profilo di eluizione anomalo ed il successivo sequenziamento diretto del frammento trentasei (Figura 15) hanno portato all'individuazione della sostituzione nucleotidica c.5269 C>T che porta alla sostituzione missenso T1760M nel caso indice #11 appartenente ad un'ampia famiglia con ricorrenza di cardiomiopatia ipertrofica.

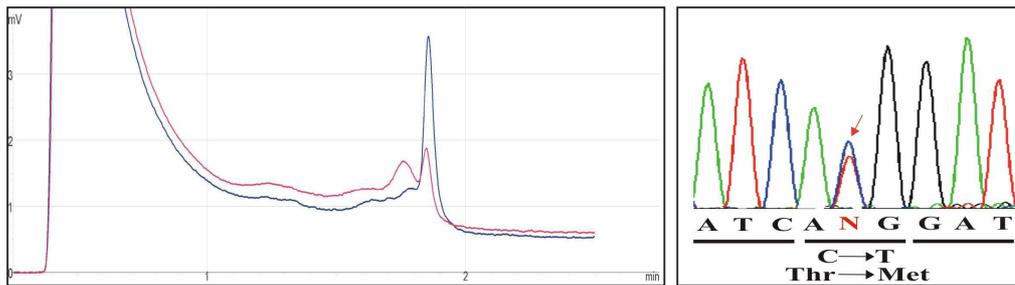


Figura 15: Risultato dell'analisi DHPLC e del sequenziamento dell'amplificato corrispondente all'esone 36 nel caso indice (in rosso) e nel controllo (in blu).

Il cambiamento riscontrato non è presente nel dbSNP né in 150 individui sani della popolazione di controllo e coinvolge un aminoacido molto conservato (Figura 16).

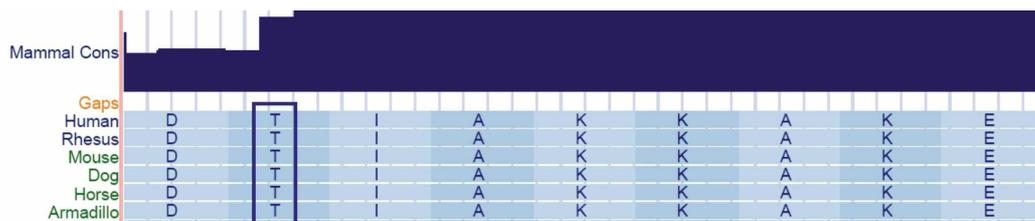


Figura 16: La variazione T1760M si trova in una regione altamente conservata tra i mammiferi.

Tale variazione però non segrega in tutti gli individui affetti della famiglia (Figura 17).

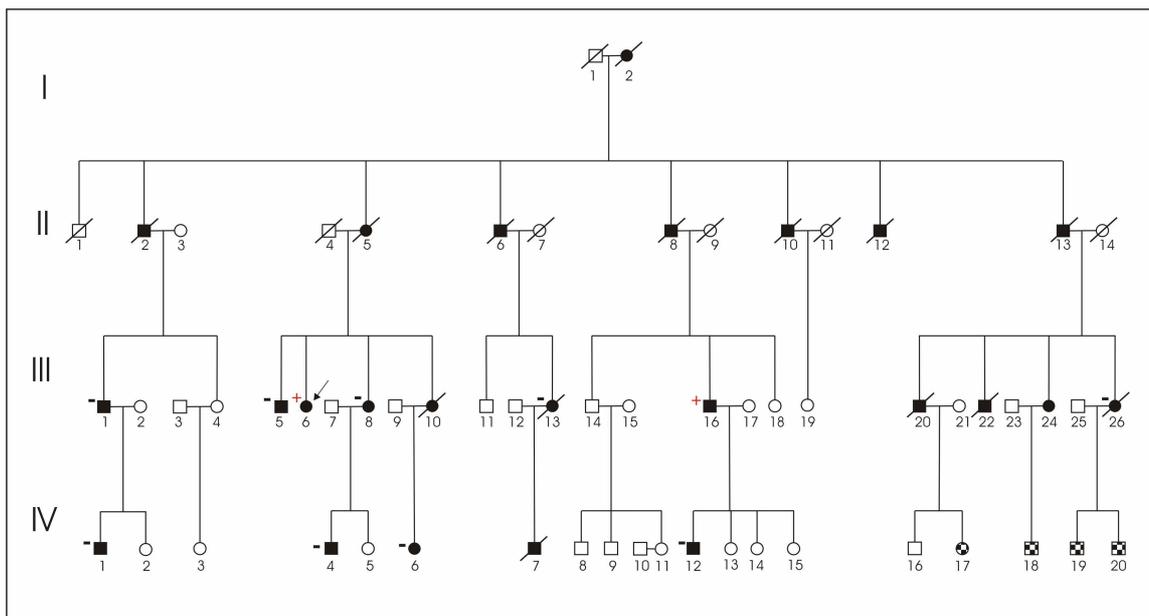


Figura 17: Albero genealogico del paziente con mutazione T1760M. La presenza o assenza della mutazione è indicata rispettivamente con i simboli + e -.

GENE *MYBPC3*

Il gene *MYBPC3* mappa sul braccio corto del cromosoma 11 e codifica l'unica isoforma cardiaca della proteina C che lega la miosina; comprende 24 kb di DNA genomico ed è costituito da 35 esoni che codificano una proteina di 1274 aminoacidi. Mutazioni nel gene *MYBPC3* sono state associate a cardiomiopatia ipertrofica (Watkins H et al., 1995) e, secondo i dati di letteratura, sarebbero responsabili della patologia nel 25-30% dei casi .

L'indagine genetica nei 43 casi indice ha rilevato la presenza di tre nuove mutazioni in cinque pazienti (Tabella 7).

Amplicone	Variatione nucleotidica	Variatione aminoacidica
Esone 12	c.1090 G>A	A364T
Esone 13	c.1112 C>G	P371R
Esone 19	c.2544 C>A	A848E

Tabella 7: Mutazioni nel gene *MYBPC3* individuate in cinque casi indice (in rosso sono riportate le variazioni non note in letteratura).

Sono state inoltre individuate durante l'analisi anche numerose variazioni già presenti nei database dei polimorfismi (Tabella 8).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esoni 5	c. 506-15 InsC	-	57780399
Esoni 6	c.706 A>G	S236G	3729989
Esoni 12	c.977 G>A	R326Q	34580776
Esoni 13	c.1104 G>A	K368K	nuovo
Esoni 19	c.Es19+47 G>A	-	11570086
Esoni 21	c.Es21 2067+117 A>G	-	nuovo
	c. Es21 2067+38 A>T	-	nuovo
Esoni 25	c.2547 C>T	V849V	3739953
Esoni 26	c.Es26+12 C>T	-	3729936
3'UTR	c.3851 C>T	-	2290146

Tabella 8: Polimorfismi individuati nel gene *MYBPC3*.

c.1090 G>A → A364T (esone 12)

Nei tre casi indice #15, #19 e #40 l'analisi cromatografica ha evidenziato lo stesso pattern di eluizione differente rispetto al controllo nell'esone dodici ed il sequenziamento del relativo frammento (Figura 18) ha rilevato la presenza della variazione nucleotidica c. 1090 G>A che porta alla sostituzione aminoacidica A364T.

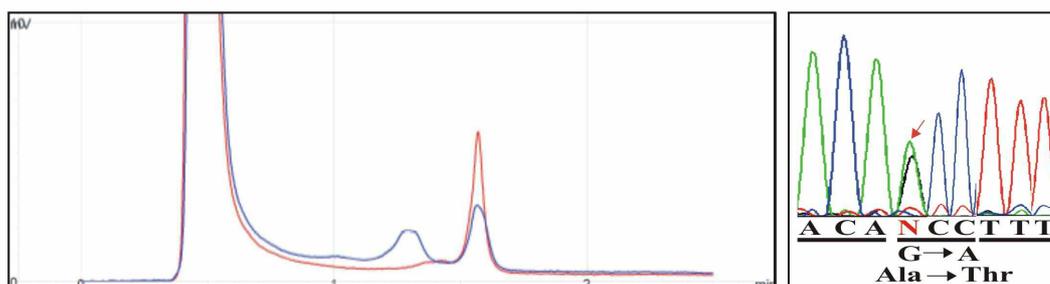


Figura 18: Risultato dell'analisi DHPLC e del sequenziamento dell'amplificato corrispondente all'esone 12 nel caso indice (in blu) e nel controllo (in rosso).

Questa variazione non è presente nel database dei polimorfismi e non è stata riscontrata in 150 individui sani della popolazione di controllo.

Il cambiamento aminoacidico è piuttosto radicale , poiché un residuo di alanina idrofobico viene sostituito con uno di treonina, idrofilico, in una regione altamente conservata tra le specie (Figura 19). deputata al legame della proteina C con la porzione S2 della β -miosina.

Human	P	E	L	K	K	Q	F	A	C	T
Rhesus	P	E	L	K	K	Q	F	A	C	T
Mouse	P	E	L	K	K	Q	F	A	C	T
Dog	P	E	L	K	K	Q	F	A	C	T
Horse	P	E	L	K	K	Q	F	A	C	T

Figura 19: La variazione A364T si trova in una regione altamente conservata tra i mammiferi.

Tutti e tre i pazienti presentano un'ipertrofia massiva; due di loro, di cui uno deceduto improvvisamente all'età di 22 anni, sottoposti ad analisi genetica con il metodo dei chip a DNA, sono risultati negativi per la presenza di mutazioni in altri 11 geni responsabili della cardiomiopatia ipertrofica.

Un paziente presenta familiarità per la patologia e per questo sono stati studiati i familiari viventi (Figura 20).

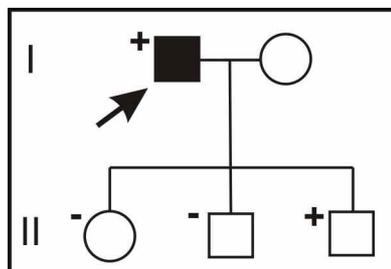


Figura 20: Albero genealogico del paziente con mutazione A364T. La presenza o assenza della mutazione è indicata rispettivamente con i simboli + e -.

c.1112 C>G→P371R (esone 13)

L'analisi del frammento tredici ha portato alla rilevazione di un triplo picco nel DNA del caso indice #23 ed il successivo sequenziamento ha evidenziato la presenza della variazione nucleotidica c.1112 C>G che porta alla variazione aminoacidica P371R (Figura 21).

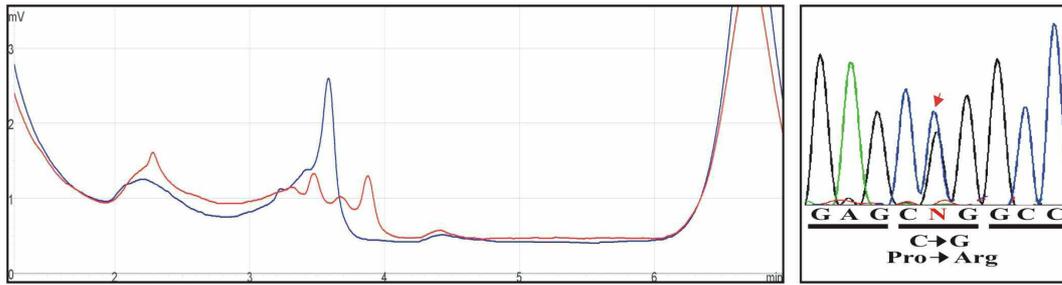


Figura 21: Triplo picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione P371R (in rosso) rispetto al controllo sano (in blu) nell'esone 13 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Tale sostituzione non è presente nel dbSNP nè in 150 individui sani della popolazione di controllo e coinvolge un residuo molto conservato (Figura 22).

Human	G	K	S	V	Q	Y	A	P	E
Rhesus	G	K	S	V	Q	Y	A	P	E
Mouse	G	K	N	V	Q	Y	A	P	E
Dog	G	K	S	V	Q	Y	A	P	E
Horse	G	K	S	V	Q	Y	A	P	E

Figura 22: La variazione P371R coinvolge un residuo molto conservato tra i mammiferi.

Un residuo di prolina non polare ed idrofobico viene sostituito con uno di arginina, carico positivamente e dal differente ingombro sterico .

Il paziente presenta elevata ipertrofia del setto interventricolare e familiarità per la stessa patologia.

c.2544 C>A→A848E (esone 25)

Un picco anomalo nell'analisi DHPLC dell'esone venticinque è stato riscontrato nel caso indice #30, caratterizzato da ipertrofia massiva.

Il sequenziamento del relativo frammento ha messo in evidenza la presenza della sostituzione c.2544 C>A che porta alla variazione missenso A848E (Figura 23).

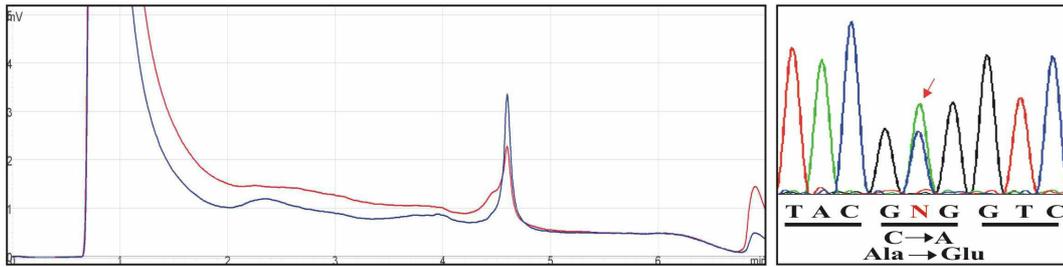


Figura 23: Risultato dell'analisi DHPLC e del sequenziamento dell'amplificato corrispondente all'esone 25 nel caso indice (in rosso) e nel controllo (in blu).

Si tratta di un cambiamento radicale dal punto di vista della carica poiché un residuo elettricamente neutro viene sostituito con uno carico negativamente.

La variazione, non descritta in letteratura, non è presente nella popolazione di controllo e coinvolge un aminoacido molto conservato (Figura 24).

Human	I	A	N	V	A	Y	V	R	M	E
Rhesus	I	A	N	V	A	Y	V	R	M	E
Mouse	V	A	N	V	A	Y	V	R	M	E
Dog	I	A	N	V	A	Y	V	R	M	E
Horse	I	A	N	V	A	Y	V	R	M	E

Figura 24: La variazione A848E coinvolge un residuo molto conservato tra i mammiferi.

Inoltre il residuo 848 è già noto in letteratura come sito mutato (Sou L, Zong Y et al., 2005); si potrebbe quindi ritenere una potenziale mutazione patogena.

GENE *TNNT2*

Il gene *TNNT2* è costituito da 18 kb di DNA genomico e ha 16 esoni; esistono quattro isoforme cardiache di troponina T prodotte dallo *splicing* alternativo dello stesso gene; quella maggiormente espressa in cuore è costituita da 288 aminoacidi.

La ricerca di mutazioni nel gene *TNNT2* ha portato all'individuazione di un'unica mutazione già nota nell'esone nove in cui il cambiamento nucleotidico c.274 C>T porta alla variazione aminoacidica missenso R92W.

c.274 C>T→R92W (esone 9)

Il paziente #7 in cui è stata riscontrata questa mutazione è morto improvvisamente all'età di 52 anni pur manifestando una lieve ipertrofia miocardica.

Il cambiamento aminoacidico interessa un residuo di arginina, basico, che viene sostituito con uno di triptofano neutro ed idrofobico. Tale mutazione, già nota in letteratura è legata ad un decorso maligno della malattia (Moolman JC et al., 1997).

L'analisi ha evidenziato anche la presenza di sostituzioni già note nel database dei polimorfismi o comunque frequenti nella popolazione italiana (Tabella 9).

Amplicone	Variatione nucleotidica	Variatione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 8	c.207 G>A (207)	S69S	nuovo
Esone 9	c.318 C>T	I106I	nuovo
Esone 14	c.758 A>G	K253R	3730238
Esone 15	c.Es15-33 C>T	-	nuovo
	c.Es15+51 C>T	-	nuovo
	c.Es15+45 C>T	-	nuovo
Esone 16	c.Es16+66 G>A	-	nuovo
	c.Es16+72 G>T	-	nuovo

Tabella 9: Polimorfismi individuati nel gene *TNNT2*.

GENE *TNNI3*

Il gene *TNNI3*, che mappa sul cromosoma 19, comprende 6.2 kb di DNA genomico ed è costituito da otto esoni che codificano l'unica isoforma cardiaca della proteina costituita da 210 aminoacidi

La ricerca di mutazioni in questo gene ha portato all'individuazione di tre mutazioni di cui due nuove in tre casi indice (Tabella 10).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 8	c.547 G>A c.563 T>C c.620 A>C	R186Q V188A K207T

Tabella 10: Mutazioni nel gene *TNNI3* individuate in tre casi indice (in rosso sono riportate le variazioni non note in letteratura).

Sono state inoltre individuate variazioni già riportate nel dbSNP o comunque frequentemente presenti nella popolazione italiana (Tabella 11).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 3	c.Es3+21 G>A	-	3729837
Esone 4	c.Es4+13 G>A	-	nuovo
Esone 5	c.204 G>T	R68R	3729711
	c.Es5+6 G>A	-	nuovo
Esone 7	c.537 G>A	E179E	3729841

Tabella 11: Polimorfismi individuati nel gene *TNNI3*.

c.547 G>A→R186Q (esone 8)

L'analisi genetica condotta mediante DHPLC e successivo sequenziamento (e confermata dal chip a DNA), ha rilevato nel caso indice #25 la presenza della variazione nucleotidica c.547 G>A che porta alla sostituzione aminoacidica R186Q.

Questa mutazione è già nota in letteratura (Richard P et al., 2003) e non correlata ad una prognosi ben precisa; tuttavia il paziente in cui è stata riscontrata presenta caratteristiche cliniche gravi.

c.563 T>C→V188A (esone 8)

L'analisi DHPLC ha rivelato la presenza di un picco differente rispetto a quello del controllo nell'esone otto ed il successivo sequenziamento del frammento ha mostrato la presenza della sostituzione c.563 T>C che si traduce nel cambiamento aminoacidico V188A (Figura 25).

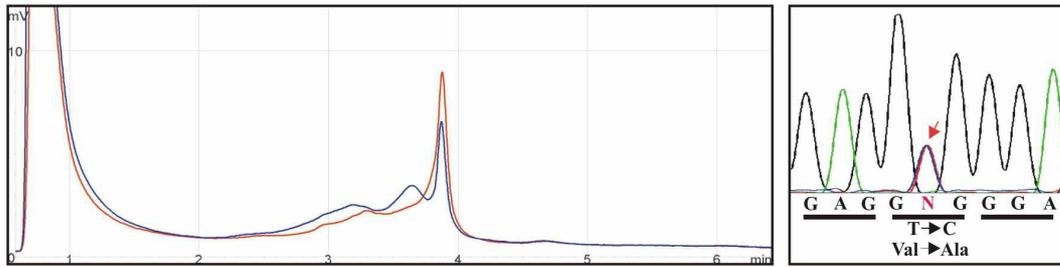


Figura 25: Doppio picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione V188A (in blu) rispetto al controllo sano (in rosso) nell'esone 8 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Tale variazione non rappresenta un radicale sostituzione aminoacidica anche se l'alanina contiene differenti gruppi funzionali.

Il caso indice #32 in cui è stata riscontrata presenta una lieve ipertrofia in base al valore del setto e non manifesta sintomi gravi; tuttavia questa sostituzione non è nota nel database dei polimorfismi, non è stata riscontrata nei 150 individui sani della popolazione di controllo e coinvolge un residuo altamente conservato (Figura 26).

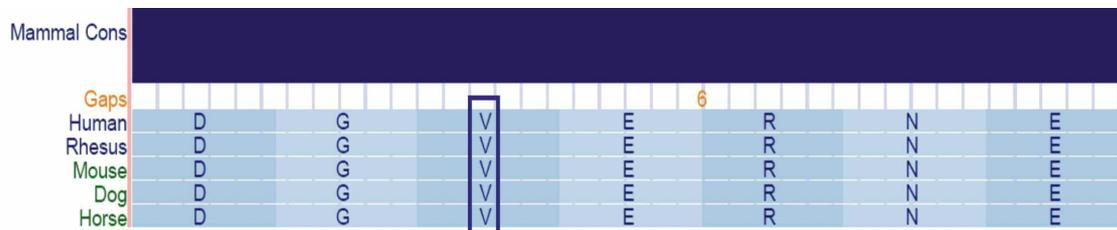


Figura 26: La variazione V188A coinvolge un residuo molto conservato tra i mammiferi.

c.620 A>C→K207T (esone 8)

La sostituzione nucleotidica c.620 A>C che porta al cambiamento aminoacidico K207T è stata individuata in seguito a sequenziamento del frammento corrispondente all'esone otto poiché esso presentava un picco di eluizione anomalo (Figura 27).

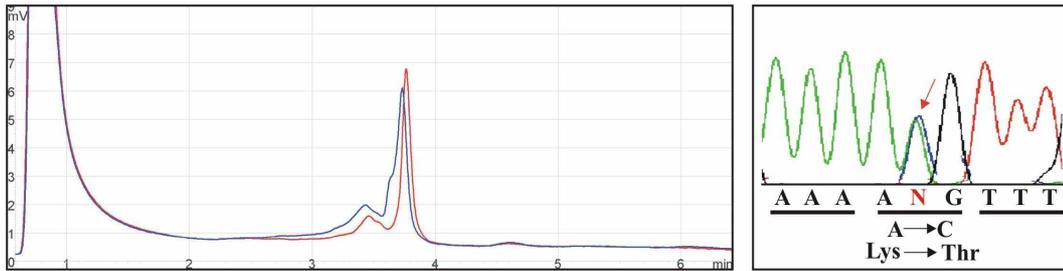


Figura 27: Risultato dell'analisi DHPLC e del sequenziamento dell'amplificato corrispondente all'esone 8 nel caso indice (in blu) e nel controllo (in rosso).

Il cambiamento aminoacidico è sostanziale poiché un residuo di lisina di tipo basico viene sostituito con uno di treonina neutro e polare in una regione molto conservata tra le specie (Figura 28).

Mammal Cons	[Conserved Region]												
Gaps													
Human	S	E	F	K	K	K	R	G	E	M	G	S	L
Rhesus	G	E	F	K	K	K	R	G	E	M	G	S	L
Mouse	G	E	F	K	K	K	R	G	E	M	G	S	L
Dog	G	E	F	K	K	K	R	G	E	M	G	S	L
Horse	G	E	F	K	K	K	R	G	E	M	G	S	L

Figura 28: Conservazione dell'aminoacido K207 coinvolto nella mutazione K207T.

Questa sostituzione inoltre non è nota nel database dei polimorfismi e non è stata riscontrata nei 150 individui sani della popolazione di controllo; la paziente in cui è stata individuata mostrava un'evoluzione della patologia di tipo restrittivo ed è morta dopo trapianto cardiaco.

RICERCA DI MUTAZIONI IN CASI ISOLATI

GENE *MYH7*

L'analisi mediante DHPLC e sequenziamento diretto dei 39 casi isolati affetti da cardiomiopatia ipertrofica ha portato all'identificazione di quattro mutazioni di cui tre non note (Tabella 12).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 9	c.746 G>T	R249L
Esone 19	c.2146 G>A	G716R
Esone 27	c.3621 C>G	I1207M
Esone 39	c.Es39+7 C>T	-

Tabella 12: Mutazioni nel gene *MYH7* individuate in quattro casi isolati (in rosso sono riportate le variazioni non note in letteratura).

L'analisi ha portato anche all'individuazione di numerosi polimorfismi già descritti dei database (Tabella 13).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 3	c.-33 G>T c.189 T>C	- T63T	nuovo 2069540
Esone 7	c.597 A>G	A199 A	2069541
Esone 8	c.732C>T	F244F	2069542
Esone 11	c.Es11+44 T>C c.975 C>T	- D325D	nuovo 2231124
Esone 12	c.1062 C>T c.1095 G>A	G354G K365K	735712 735711
Esone 20	c.Es20-56 A>G	-	3729818
Esone 24	c.2967 T>C c.Es24+45 T>A c.Es24+46 G>A	I989I - -	7157716 nuovo nuovo
Esone 27	c.Es27-3 insC	-	45504498
Esone 28	c.Es28+27 T>A	-	2277475
Esone 29	c.Es29+63 insC	-	33987796
Esone 30	c.Es30-30 A>G c.Es30-75 G>A	- -	7159367 45550632
Esone 33	c.Es33+80 C>T	-	59799414
Esone 37	c.Es37-45 G>T	-	nuovo

Tabella 13: polimorfismi individuati nel gene *MYH7* nei 39 casi isolati.

c.746 G>T→R249L (esone 9)

Nel paziente #3 l'analisi cromatografica ha rilevato un profilo di eluizione anomalo rispetto al controllo nell'esone nove ed il sequenziamento diretto del relativo frammento ha evidenziato la presenza della variazione nucleotidica c.746 G>T che si traduce nel cambiamento aminoacidico R249L (Figura 29).

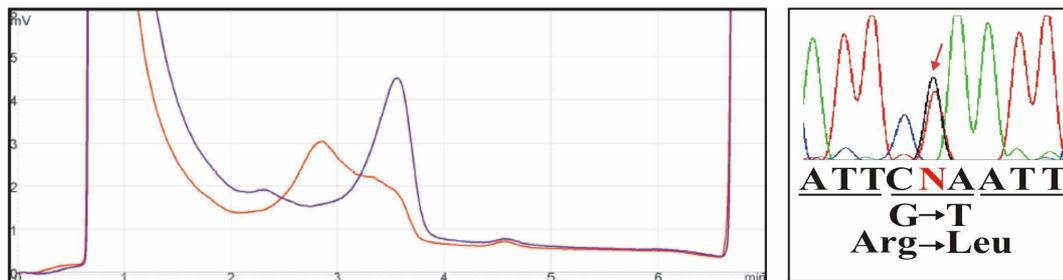


Figura 29: Risultato dell'analisi DHPLC e del sequenziamento dell'amplicone corrispondente all'esone 9 nel caso indice (in rosso) e nel controllo (in blu).

Tale sostituzione non nota in letteratura non è stata riscontrata in 150 individui della popolazione di controllo ed interessa un residuo già noto come mutabile (Woo A et al., 2003). Un' arginina basica viene sostituita con una leucina neutra ed idrofobica in una regione altamente conservata tra le specie (Figura 30).

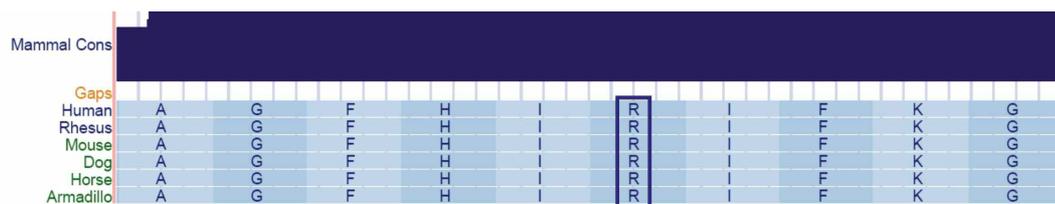


Figura 30: La variazione R249L si trova in una regione altamente conservata tra i mammiferi.

Il paziente portatore di questa mutazione è morto per scompenso cardiaco all'età di 22 anni pur presentando una lieve ipertrofia; in esso è stata inoltre riscontrata anche una variazione intronica nel gene *MYBPC3* descritta nella sezione risultati successiva.

c.2146 G>A→G716R (esone 19)

Questa mutazione già descritta in letteratura e già individuata nel caso indice #16 è stata riscontrata anche nel caso isolato #28 in seguito all'analisi DHPLC e successivo sequenziamento.

Il paziente in questione diagnosticato affetto all'età di 28 anni presenta ipertrofia massiva ma non ha manifestato episodi gravi.

c.3621 C>G→I1207M (esone 27)

L'analisi cromatografica ha evidenziato la presenza di un doppio picco nel DNA del paziente #31 nell'esone ventisette (Figura 31) ed il sequenziamento del relativo frammento ha mostrato la presenza della sostituzione nucleotidica c.3621 C>G che porta alla variazione aminoacidica I1207M.

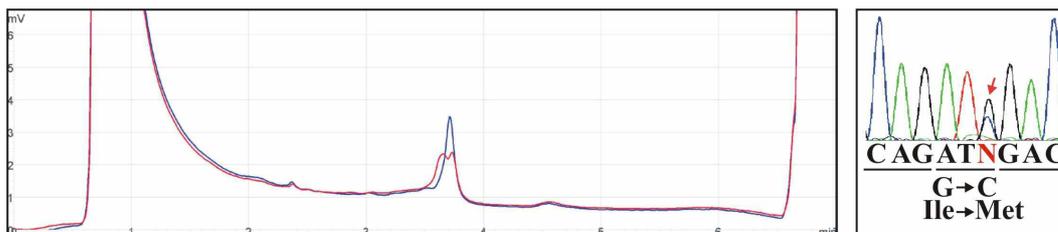


Figura 31: Doppio picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione I1207M (in rosso) rispetto al controllo sano (in blu) nell'esone 13 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Questo cambiamento non è noto e non è stato riscontrato in 150 individui della popolazione di controllo; pur non portando ad una sostituzione drastica dal punto di vista dell'aminoacido, interessa un residuo altamente conservato.

Il paziente portatore di tale variazione è morto all'età di 60 anni dopo trapianto cardiaco.

c.Es39+7 C>T

L'analisi DHPLC ha rivelato la presenza di un picco differente rispetto a quello del controllo nell'esone trentanove del DNA del paziente #14 ed il successivo sequenziamento del frammento ha evidenziato la presenza della sostituzione c.Es39+7 C>T (Figura 32).

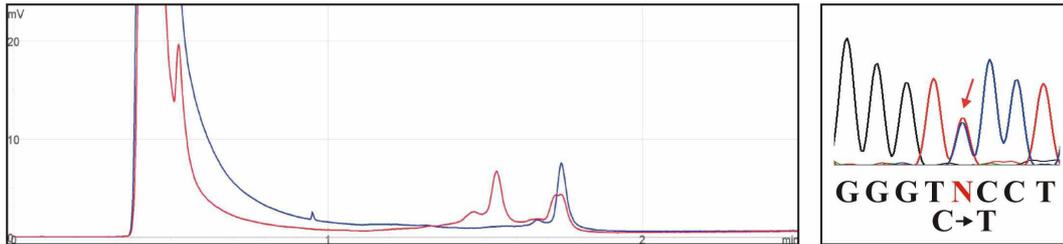


Figura 32: Doppio picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione c.Es39+7 C>T (in rosso) rispetto al controllo sano (in blu) nell'esone 39 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Questa variazione non nota in letteratura non è stata riscontrata nel DNA di 200 individui sani della popolazione di controllo.

Si potrebbe trattare di una mutazione nel sito di *splicing* dell'esone poiché situato sette nucleotidi dopo la fine di esso. In letteratura, proprio in quel sito, è già riportata una mutazione di questo tipo che porta ad una perdita di parte dell'esone 39 e di parte del 40 con conseguente produzione di una proteina tronca (Marian AJ et al., 1992). Anche in questo caso il nucleotide interessato è abbastanza conservato (Figura 33).

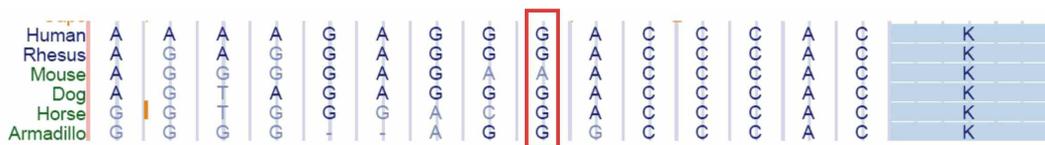


Figura 33: Il nucleotide che interessa la sostituzione ES39+7 C>T è abbastanza conservato tra i mammiferi. In questa immagine è stato considerato il filamento +.

Tuttavia questa ipotesi non è stata confermata per l'impossibilità di ottenere un ulteriore prelievo di sangue da cui estrarre l'RNA sul quale effettuare analisi per verificare le conseguenze della variazione a livello trascrizionale.

GENE *MYBPC3*

La ricerca di mutazioni nel gene *MYBPC3* nei 39 casi isolati affetti ha portato all'individuazione di cinque mutazioni in sei pazienti di cui quattro nuove (Tabella 14).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 5	c.Es5-2 A>C	-
Esone 10	c.Es10-7 G>T	-
Esone 12	c.1122 G>A	A364T
Esone 13	c.1128 C>T	Q366X
Esone 25	c.2579 C>T	R810H

Tabella 14: Mutazioni nel gene *MYBPC3* individuate in sei casi isolati (in rosso sono riportate le variazioni non note in letteratura).

Sono stati individuati numerosi polimorfismi già descritti nei database o comunque presenti nella popolazione italiana (Tabella 15).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 3	c.Es3-19 C>T	-	nuovo
Esone 5	c. 506-15 InsC	-	57780399
Esone 6	c.706 A>G	S236G	3729989
Esone 12	c.977 G>A	R326Q	34580776
Esone 13	c.1104 G>A	K368K	nuovo
Esone 19	c.Es19+47 G>A	-	11570086
Esone 25	c.2547 C>T	V849V	3739953

Tabella 15: polimorfismi individuati nel gene *MYBPC3* nei 39 casi isolati.

c.Es5-2 A>C

L'analisi DHPLC ha evidenziato la presenza di un triplo picco nell'amplificato dell'esone cinque nel paziente #23 ed il sequenziamento del relativo frammento ha individuato la variazione nucleotidica c.Es5-2 A>C (Figura 34).

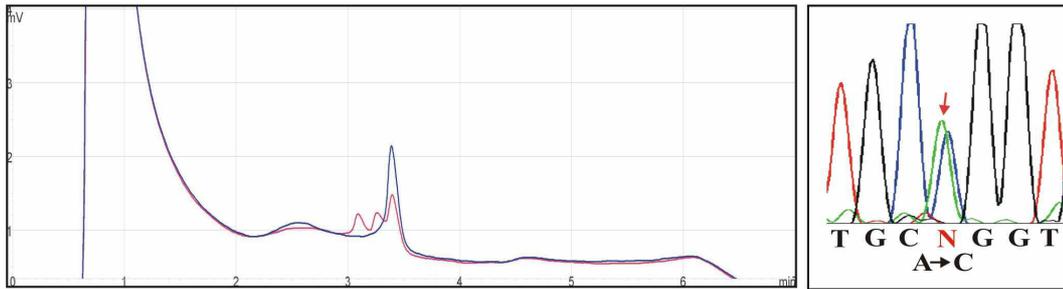


Figura 34: Triplo picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione c.Es5-2 A>C (in rosso) rispetto al controllo sano (in blu) nell'esone 39 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

La sostituzione in questione non è nota e non è presente nel DNA di 200 individui della popolazione di controllo; interessa il classico dinucleotide di *splicing* AG molto conservato tra le specie (Figura35).

Human	T	I	S	G	G	C	T	G	C	A	A
Rhesus	T	I	S	G	G	C	T	G	C	A	A
Mouse	V	I	S	G	G	C	T	G	C	A	A
Dog	T	I	S	G	G	C	T	G	C	A	G
Horse	T	I	S	G	G	C	T	G	C	A	G
Armadillo	S	I	S	G	G	C	T	G	C	A	G

Figura 35: Conservazione del nucleotide coinvolto nella mutazione Es5-2 A>C. In questa immagine viene indicato il filamento +.

Non è stato possibile effettuare analisi per verificare le conseguenze di tale variazione a livello trascrizionale per l'impossibilità di ottenere un ulteriore prelievo di sangue del paziente da cui estrarre l'RNA:

Il soggetto portatore di questa variazione presenta un'ipertrofia massiva.

c.Es10-7 G>T

Il caso isolato #3 ha mostrato un picco anomalo nell'analisi cromatografica dell'esone dieci ed il sequenziamento del frammento ha evidenziato la presenza della variazione es10-7 G>T (Figura 36).

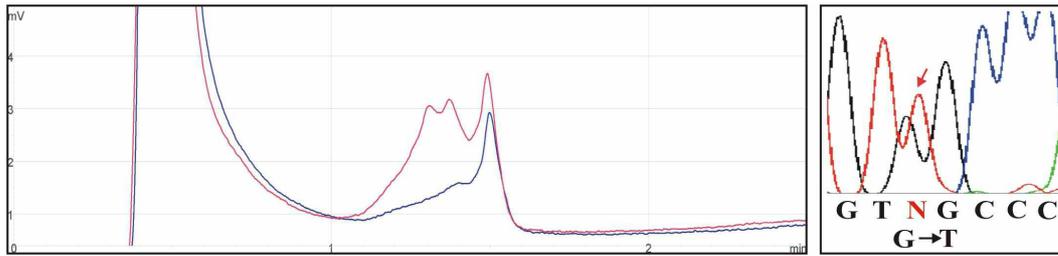


Figura 36: Risultato dell'analisi DHPLC e del sequenziamento dell'amplicone corrispondente all'esone 10 nel caso indice (in rosso) e nel controllo (in blu).

Tale variazione non è nota e non è presente nel DNA di 200 controlli italiani; essa interessa inoltre una regione molto conservata.

Non è stato possibile effettuare analisi a livello trascrizionale poiché il paziente è deceduto. Esso era portatore anche di una mutazione nel gene *MYH7* descritta nella sezione precedente.

c.1122 G>A→A364T (esone 12)

Questa mutazione, già riscontrata in tre casi indice, è stata individuata anche nei casi isolati #11 e #30.

Entrambi presentano ipertrofia massiva ed uno di loro è deceduto all'età di 12 anni dopo trapianto cardiaco.

c.1128 C>T→Q366X (esone 13)

L'analisi cromatografica ha evidenziato un profilo di eluizione anomalo rispetto al controllo nell'amplicato dell'esone tredici nel paziente #32 ed il sequenziamento ha rilevato la sostituzione nucleotica c.1128 C>T che porta alla variazione non senso Q366X (Figura 37).

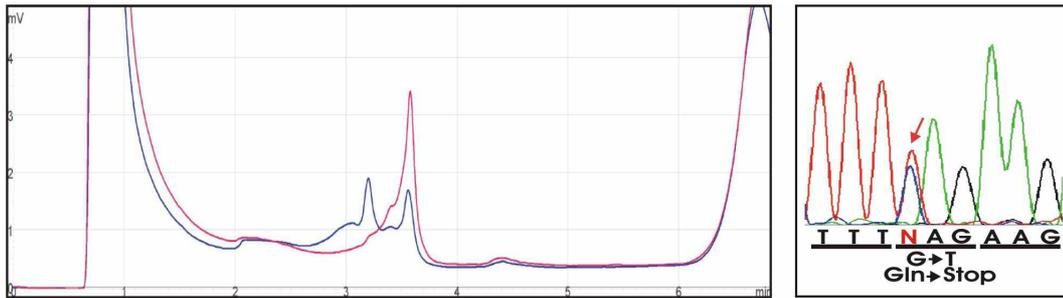


Figura 37: Doppio picco nel profilo di eluizione del paziente con variazione Q366X (in rosso) rispetto al controllo (in blu) nell'esone 39 e risultato del sequenziamento del relativo frammento.

Tale variazione non nota non è presente in 150 controlli italiani; essa porta all'introduzione di un codone di stop in posizione 366 della proteina nell'esone tredici in una regione altamente conservata (Figura 38), con conseguente produzione di una proteina tronca, mancante dei principali domini funzionali.

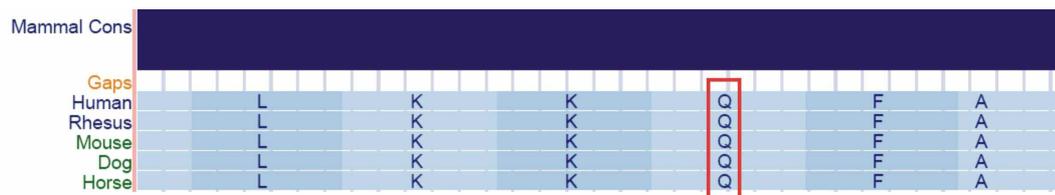


Figura 38: La variazione Q366X coinvolge un residuo molto conservato tra i mammiferi.

La paziente in cui è stata riscontrata è morta all'età di 63 anni dopo trapianto cardiaco.

c.2579 C>T→R810H (esone 25)

L'analisi DHPLC ha rivelato la presenza di un picco differente rispetto a quello del controllo nell'esone venticinque del DNA del paziente #27 ed il successivo sequenziamento del frammento ha mostrato la presenza della sostituzione nucleotidica c.2579 C>T che porta alla variazione aminoacidica R810H già descritta in letteratura come mutazione causativa della cardiomiopatia ipertrofica (Nanni L et al., 2003). Il paziente portatore di tale variazione presenta ipertrofia massiva.

GENE *TNNT2*

Lo screening per la ricerca di mutazioni nei 39 casi isolati affetti da CMI ha portato all'individuazione di un'unica mutazione R94L e numerosi polimorfismi (Tabella 16).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 8	c.207 G>A (207)	S69S	nuovo
Esone 9	c.318 C>T	I106I	nuovo
Esone 10	c.Es10+49 C>T c.420 C>T	- I140I	nuovo nuovo
Esone 14	c.758 A>G	K253R	3730238
Esone 15	c.Es15-33 C>T	-	nuovo
Esone 16	c.Es16+66 G>A c.Es16+72 G>T c.Es16-47 C>A	- - -	nuovo nuovo nuovo

Tabella 16: Polimorfismi individuati nel gene *TNNT2* in 39 casi isolati.

c.281 G>T→R94L (esone 9)

Nel paziente #4 è stata riscontrato un profilo anomalo rispetto al controllo nell'analisi DHPLC ed il sequenziamento del frammento nove ha rilevato la presenza della sostituzione nucleotidica c. 281 G>T che porta al cambiamento aminoacidico R94L.

Questa mutazione già nota in letteratura, comporta un netto cambiamento di carica in un sito molto importante per il legame della troponina T con la tropomiosina (Tobacman LS 1996).

Il paziente che la presentava pur presentando una lieve ipertrofia, è deceduto all'età di 59 anni dopo aver subito trapianto cardiaco.

GENE *TNNI3*

La ricerca di mutazioni nel gene codificante la troponina I cardiaca non ha rilevato la presenza di alcuna mutazione nei 39 casi isolati analizzati; sono stati però individuati alcuni polimorfismi già descritti nei database (tabella 17).

Amplicone	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 3	c.Es3+21 G>A	-	3729837
Esone 5	c.204 G>T	R68R	3729711
Esone 7	c.537 G>A	E179E	3729841

Tabella 17: Polimorfismi individuati nel gene *TNNI3* in 39 casi isolati.

RISULTATI CHIP A DNA

In collaborazione con la Dott.ssa Siv Fokstuen di Ginevra, 12 degli 82 pazienti considerati in questo studio (8 casi indice e 4 casi isolati) sono stati sottoposti ad analisi mediante chip a DNA per valutare la presenza di mutazioni in 12 geni coinvolti nella cardiomiopatia ipertrofica e soprattutto per verificare l'efficacia del metodo DHPLC utilizzato in questo lavoro.

I risultati dell'analisi con i chip hanno confermato quelli già ottenuti in precedenza (Tabella 18).

GENE				
Caso indice #	<i>MYH7</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>TNNT2</i>	<i>TNNI3</i>
2	c.-33G>T T63T (rs2069540) F244F (rs2069542) I989I (rs7157716) c.Es20-56 A>G (rs3729818) c.Es30-30 A>G (rs7159367) c.Es33-80 A>G (rs59799414)	-	S69S	E179E (rs3729841)
13	c.Es30-30 A>G (rs7159367)	V189I (rs11570052)	I106I	-
14	-	V849V (rs3739953)	K253R (rs3730238)	-
15	I989I (rs7157716) c.Es30-30 A>G (rs7159367)	A364T	-	-
17	I989I (rs7157716)	-	S69S	-
18	-	-	-	-
19	-	A364T V189I (rs11570052)	-	-
25	-	V158M (rs3729986)	-	R186Q
Caso isolato #	<i>MYH7</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>TNNT2</i>	<i>TNNI3</i>
12	-	-	-	-
15	-	V158M (rs3729986)	-	-
18	-	-	-	-
35	T63T (rs2069540) A199A	-	-	-

Tabella 18: Risultati dell'analisi con i chip a DNA e con DHPLC. In rosso sono riportate le mutazioni nuove, in blu quelle note, in nero i polimorfismi.

In nessuno dei 12 soggetti analizzati sono state riscontrate mutazioni in geni diversi dai quattro considerati in questo studio; è stata inoltre confermata la presenza di due mutazioni in tre pazienti così come quella di numerosi polimorfismi.

DISCUSSIONE

Come è stato riportato nell' Introduzione, la Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI) è una malattia autosomica dominante caratterizzata da eterogeneità genetica ed espressività variabile. La maggior parte delle mutazioni identificate finora sono a carico di geni che codificano proteine del sarcomero miocardico ed in particolare la catena pesante della β -miosina (*MYH7*), la proteina C che lega la miosina (*MYBPC3*) e le troponine I e T cardiache (*TNNI3* e *TNNT2*). Tali mutazioni sono risultate associate a forme fenotipicamente eterogenee di CMI con evoluzione clinica variabile.

La cardiomiopatia ipertrofica risulta la causa più comune di morte improvvisa tra i giovani dai 12 ai 35 anni (Maron BJ et al., 2002) e questo pone l'attenzione sulla necessità, una volta individuata una mutazione in un paziente, di estendere la ricerca di questa anche tra i suoi familiari; infatti, poiché a volte il primo sintomo che si manifesta può essere la morte improvvisa, è molto importante identificare all'interno della famiglia del paziente in esame quei soggetti che, portando la mutazione patogena, sono a rischio di sviluppare la patologia.

Principale obiettivo di questo studio era elaborare una strategia economica in termini di tempo e di denaro per identificare mutazioni nei quattro geni sopra citati.

Nel corso del lavoro sono stati analizzati 82 soggetti affetti da cardiomiopatia ipertrofica, di cui 43 casi indice e 39 casi isolati e sono state individuate in tutto 21 mutazioni in 24 pazienti (29%) come riportato in tabella 19.

GENE totale	TOTALE n=82	CASI INDICE n=43	CASI ISOLATI n=39
<i>MYH7</i>	7 (8.5%)	4 (9%)	3 (8%)
<i>MYBPC3</i>	10 (12.2%)	5 (11.6%)	5 (13%)
<i>TNNT2</i>	2 (2.4%)	1 (2.3%)	1 (2.5%)
<i>TNNI3</i>	3 (3.6%)	3 (7%)	0
Doppi eterozigoti	2 (2.4%)	1 (2.3%)	1 (2.5%)

Tabella 19: Frequenze delle mutazioni riscontrate nei quattro geni analizzati, in 82 pazienti.

Le mutazioni, per lo più sostituzioni missenso ed in minor numero non senso o di *splicing* (soprattutto nel gene *MYBPC3*) sono eterogeneamente distribuite lungo

tutta la sequenza codificante dei geni *MYH7* e *MYBPC3*, mentre risultano raggruppate in esoni specifici nelle due troponine, in accordo con i dati finora riportati nei database ed in letteratura.

I dati ottenuti sulle frequenze con le quali i quattro geni analizzati in questo lavoro risultano mutati possono essere confrontati con quelli di precedenti studi (Richard P et al., 2003; Van Driest et al., 2004; Andersen PS et al., 2008; Olivotto I et al., 2008) riportati nella tabella 20.

GENE	Questo studio	Richard et al.,	Van Driest et	Andersen PS	Olivotto I et
	Italia	2003 Francia	al., 2004 Stati Uniti	et al., 2008 Danimarca	al., 2008 Italia
totale	n=82	n=197	n=389	n=90	n=203
<i>MYH7</i>	7 (8.5%)	46 (23%)	54 (14%)	9 (10%)	34 (17%)
<i>MYBPC3</i>	10 (12.2%)	48 (24%)	63 (16%)	9 (10%)	59 (29%)
<i>TNNT2</i>	2 (2.4%)	8 (4%)	6 (1.5%)	2 (2.2%)	7 (3.4%)
<i>TNNI3</i>	3 (3.6%)	8 (4%)	4 (1%)	2 (2.2%)	1 (0.5%)
Doppi eterozigoti	2 (2.4%)	4 (2%)	10 (2.6%)	6 (6.6%)	15 (18%)

Tabella 20: Frequenze con le quali i quattro geni analizzati risultano mutati, in cinque studi differenti.

Come si può osservare dalla tabella sopra riportata, le differenze più evidenti riguardano le frequenze di mutazioni nei geni *MYH7* e *MYBPC3* tra la popolazione analizzata in questo studio e quelle francese (Richard P et al., 2003) ed italiana (Olivotto I et al., 2008) rispettivamente.

Inoltre, mentre nella popolazione francese le frequenze di mutazioni nei due geni considerati si equivalgono, nei due campioni italiani il gene *MYBPC3* risulta più frequentemente interessato da mutazioni.

Questo potrebbe essere dovuto all'effetto del fondatore, infatti nel presente studio la medesima mutazione del gene *MYBPC3* A364T ricorre in 5/10 pazienti; nel lavoro di Olivotto et al., la mutazione E258K dello stesso gene è stata riscontrata in 27/59 soggetti affetti.

Rimane tuttavia da spiegare la notevole discrepanza tra le proporzioni di mutazioni nei geni *MYH7* e *MYBPC3* riportate nei due lavori considerati e quelle

rilevate nel campione esaminato nel presente studio. La spiegazione più semplice è che si tratti di errori casuali nel campionamento, visto anche la minore numerosità del campione rispetto a quello di Olivotto et al. In effetti, per una malattia autosomica dominante non letale in termini genetici (e quindi compatibile con la riproduzione), ci si può attendere una distribuzione geografica non omogenea, in particolare quando la mobilità interna della popolazione non sia molto elevata. In più, l' esclusione dal campione di pazienti con sintomatologia modesta aumenta la sicurezza della diagnosi, ma può portare ad una sottostima della frequenza di mutazione nei geni considerati nella popolazione generale.

E' comunque interessante notare che la differenza tra le due popolazioni italiane: non può dipendere dal metodo utilizzato per effettuare la ricerca di mutazioni; infatti sia in questo studio che in quello di Olivotto et al. è stata utilizzata la tecnica DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) che ha una sensibilità molto vicina a 100% ed una specificità del 98%, secondo quanto riportato in letteratura (Bagattin A et al., 2004). Nel presente lavoro, l'efficacia di tale metodo di screening è stata confermata analizzando mediante chip a DNA (Fokstuen S et al., 2008) 12 degli 82 pazienti: in tutti i casi non sono state notate discrepanze nei risultati ottenuti con le due metodiche. In conclusione, la differenza riscontrata nei risultati ottenuti dalla ricerca di mutazioni nei due campioni potrebbe essere dovuta a diversi criteri utilizzati nel selezionare i pazienti. Un'altra causa, sia pure meno rilevante, delle differenze riscontrate potrebbe essere l' inclusione di polimorfismi missenso rari nella categoria "mutazioni patogene". Tale inclusione non è del tutto ingiustificata, perché in qualche caso la presenza di un' altra variazione (di per sé incapace di determinare la malattia) nello stesso gene o in un gene diverso (ma comunque implicato nella patogenesi) potrebbe contribuire ad aggravare il fenotipo di pazienti portatori di una mutazione patogena. La variazione R1045C nel gene *MYH7*, riportata nel lavoro di Olivotto et al. come mutazione patogena, è viceversa registrata presente come polimorfismo nel dbSNP ed, in effetti, è stata individuata in circa il 2% dei soggetti di controllo nel presente studio.

Recentemente, in un'altra cardiomiopatia (la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro), tre mutazioni ritenute precedentemente patogene (Syrris P et al., 2007) sono state riscontrate con frequenza superiore all'1% o di poco inferiore

nella popolazione di controllo (Posch MG et al., 2008). Questi dati richiamano l'attenzione sulla necessità di adottare criteri rigorosi per stabilire se variazioni missenso possano essere considerate mutazioni causative (in assenza di studi funzionali *in vivo* ed *in vitro* che confermino il loro ruolo patogeno nella malattia); infatti, qualora la loro frequenza risulti inferiore all'1% potrebbero essere classificate come patogene, patogene con alta probabilità, probabilmente patogene o possibilmente patogene (Tabella 21).

DEFINIZIONE		CRITERI
MUTAZIONE	Variazione che produce un effetto sul fenotipo	Variante allelica trovata nella popolazione di controllo con frequenza <1%
• PATOGENA	Variazione con effetti funzionali dimostrati	<ul style="list-style-type: none"> • Mutazioni di stop • Mutazioni nel sito di splicing confermati da studi <i>in vitro</i> • Mutazioni missenso con effetti funzionali dimostrati
• PATOGENA CON ALTA PROBABILITA'	Variazione che si suppongono essere patogene con alta probabilità	<ul style="list-style-type: none"> • Mutazioni probabilmente patogene che segregano in un'ampia famiglia (lod score >3)
• PROBABILMENTE PATOGENA	Variazione che si suppongono essere patogene	<ul style="list-style-type: none"> • Mutazioni missenso che causano un cambiamento aminoacidico non conservativo in un residuo conservato tra le specie, non riscontrato nei controlli • Mutazioni che coinvolgono cisteina e prolina • Mutazioni nel sito di splicing che cambiano i nucleotidi GT/AG, in assenza di studi funzionali
• POSSIBILMENTE PATOGENA	Variazione che si sospetta sia patogena	<ul style="list-style-type: none"> • Mutazioni missenso che causano una sostituzione conservativa, in residui conservati e non riscontrate nei controlli • Mutazioni missenso che coinvolgono residui non conservati, non riscontrate nei controlli • Mutazioni missenso coinvolgono residui conservati ma riscontrate nei controlli • Variazioni vicine o all'interno delle regioni consenso di splicing ma non provate da studi funzionali <i>in vitro</i> • Varianti silenti, non codificanti senza effetti funzionali dimostrati

Tabella 21: Criteri di valutazione per stabilire la patogenicità di una mutazione.

Una considerazione particolare merita l'osservazione di pazienti portatori di più di una mutazione.

La frequenza di doppi eterozigoti tra i soggetti affetti da cardiomiopatia ipertrofica varia notevolmente a seconda dei lavori: Richard P et al., 2003 riporta una frequenza dell'1% di pazienti con mutazioni multiple; Van Driest et al., 2004 del 2.5%; Andersen PS et al., 2008 del 6.6%; Olivetto I et al., 2008 del 18%.

Nel presente lavoro, due pazienti, un caso indice ed un caso isolato, risultano portatori di due mutazioni differenti; il primo nello stesso gene (*MYH7*) ed il secondo in due geni diversi (*MYH7* e *MYBPC3*).

Il caso isolato #3 presentava la mutazione R249L nel gene *MYH7* ed una variazione intronica nel gene *MYBPC3*; purtroppo non è stato possibile verificare le conseguenze a livello trascrizionale di quest'ultima poiché il paziente è deceduto. Inoltre non si è potuta analizzare la segregazione di entrambe nella famiglia dal momento che non erano disponibili i DNA dei membri del nucleo familiare.

Il caso indice #16 riguarda invece un'adolescente morta a 17 anni dopo un intenso sforzo fisico; l'analisi genetica ha rilevato la presenza di due diverse mutazioni nel gene *MYH7*. La prima G716R già nota e documentata in letteratura è caratterizzata da prognosi maligna con alta incidenza di morte improvvisa soprattutto nei giovani (Hwang TH et al., 1998); la seconda invece Q1654H è stata riscontrata per la prima volta in questo lavoro.

La madre della paziente è deceduta per scompenso cardiaco a soli 37 anni e quindi possiamo ipotizzare, anche se in mancanza di una diagnosi certa di cardiomiopatia ipertrofica, che essa fosse portatrice delle stesse alterazioni della figlia nella sequenza del gene *MYH7*.

Non è stato però possibile stabilire se le due mutazioni fossero state ereditate in *cis* od in *trans* verificando la loro segregazione nella famiglia del caso indice ed in particolare nella madre.

In mancanza dell'analisi genetica sui familiari di pazienti portatori di una o più mutazioni è quindi difficile stabilire quale sia il contributo di ciascuna nella manifestazione fenotipica della patologia.

L'identificazione di mutazioni in soggetti affetti da CMI è quindi molto importante in quanto conferma la diagnosi in soggetti con forme minori di malattia.

Data la frequenza di mutazioni nei geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3* in pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica, durante questo studio si è messo a punto un protocollo di screening che risultasse relativamente rapido e poco costoso per l'analisi.

Le sequenze dei 4 geni considerati sono state suddivise in un totale di 91 frammenti per 82 dei quali è stato possibile mettere a punto le temperature di analisi DHPLC (primers, condizioni di amplificazione e DHPLC sono riportate nelle appendici A, B e C rispettivamente). Sono stati inoltre sintetizzati i primers specifici per ciascuna amplificazione. Il costo totale è relativamente elevato (circa 200 euro), ma l'incidenza del costo per analisi è bassissima, perché le quantità utilizzate in ciascuna analisi sono minime. Per effettuare l'analisi degli 82 frammenti in un individuo sono necessarie 100 analisi DHPLC per un costo totale di 50€. Il tempo/macchina necessario per l'analisi di tutti gli 82 frammenti è di circa 15 ore più un paio d'ore per l'osservazione dei profili di eluizione prodotti. Si deve tener presente che in un laboratorio che abbia una routine diagnostica con un elevato numero di casi si preferisce eseguire le analisi frammento per frammento, su lotti di 96 pazienti. Con tale procedimento si riesce ad analizzare il DNA di tutti i pazienti in questione in circa 10 giorni di lavoro, fermo restando il costo unitario per paziente. A questo va tuttavia aggiunto il costo per il sequenziamento del DNA di amplificati che mostrino anomali profili di eluizione; in media si può considerare che siano necessari 4 sequenziamenti di DNA per paziente, con un costo aggiuntivo di circa 30 euro. Inoltre, per completare il calcolo dei costi, bisogna considerare che è necessario sequenziare 9 amplificati che non si prestano all'analisi DHPLC a causa della caratteristica di composizione nucleotidica. Quindi, in totale, lo screening di mutazioni nei geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3* comporta un costo di $(80+63) = 143$ euro/paziente.

L'alternativa a questo procedimento analitico è costituita dal sequenziamento diretto, che attualmente viene offerto da ditte specializzate a 7 euro/ campione.

Anche in questo caso bisogna disporre di primers specifici per l' amplificazione (si possono però usare gli stessi primers progettati per l' analisi DHPLC).

In totale l' analisi verrebbe a costare 637 euro/paziente, con l' ottenimento dei risultati in due giorni.

Recentemente sono state introdotte le nuove tecnologie di sequenziamento di DNA mediante *pyrosequencing* o *sequencing by synthesis* (Langae T et al., 2005). In termini di tempo, il *pyrosequencing* risulta decisamente più rapido, con 96 prodotti di amplificazione analizzati in un' ora (Tan Yh et al., 2008). Tuttavia il metodo si applica ad amplificati non più lunghi di 100 pb, il che richiede di "spezzettare" il gene da analizzare in numerosissimi frammenti, ciascuno amplificato separatamente. Inoltre, uno dei due primers dev'essere biotinilato per consentire la successiva analisi e soprattutto ciascun frammento amplificato necessita di un particolare primer anche per il sequenziamento (con una spesa di circa 110€ per coppia di primers per amplificato). Il costo per sequenza dovrebbe essere inferiore a quello del sequenziamento tradizionale, verosimilmente intorno ai 3 euro/sequenza. Tenendo conto che il totale di DNA genomico da analizzare è circa 26.5 Kb, sarebbero necessarie 265 coppie di primers (con un investimento di 29150 euro); il costo totale del sequenziamento sarebbe invece di 795 euro/paziente

La terza opzione per la ricerca di mutazioni in geni candidati è rappresentata dalla tecnica dei DNA-chip, di cui si è parlato anche nel presente lavoro. Il vantaggio è costituito dalla possibilità di analizzare contemporaneamente le sequenze codificanti di una decina di geni; lo svantaggio è il costo per paziente (non meno di 500 euro) e che per il momento tale tecnologia è disponibile soltanto in pochissimi laboratori.

Dal momento quindi che i geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3* tengono conto di circa il 70% delle mutazioni finora note responsabili della cardiomiopatia ipertrofica, come riportato nell'Introduzione, l'approccio utilizzato nel presente studio, basato sull'analisi DHPLC della maggioranza degli esoni codificanti di questi 4 geni, può essere considerata una buona strategia relativamente al tempo ed alle risorse impiegati, per uno screening di mutazioni in pazienti affetti da tale patologia.

APPENDICE A

Condizioni di amplificazione e di analisi DHPLC del gene *MYH7*.

AMPLIFICATO	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	T°C ann	T° C DHPLC
Estone 3A	TTGACTCTTGAGCATGGTGC	CTCCTGTTTGTATCAGGCA	60	63.8
Estone 3B	CAGAGAAGGAGCGCTAGAA	TGTACCCCTCTCTGTCCACC	62	62.4
Estone 4	AAGCCCAGGCTGACAGGAG	ACCAAGGATGTTGGGACGA	62	63
Estone 5	AACTCCAAAAATCACCAGCC	GGCCTATCCCAGTTCCTTC	62	62
Estone 6	CCATCTCCGACAACGCCTAT	AGGCTGGGATCAGGGGAGATT	62	seq. diretto
Estone 7	GAGGCTTGCTGGTCTCCAGT	CCAAGAAGGAGGCAGGTGAG	62	61.8
Estone 8	AAGGTCTGTACCGCAGAAAAG	AGAGTGGTGATGAGTTGGGG	67	63.6+1
Estone 9	GACAACCTCCCGCTTCGTG	AACAGAGGGAGGGAGGGGAGAG	62	60.6
Estone 10	CCTTTTGCTTGCTACATTTATCAT	GCCACAAGCAGAGGGGACCAG	62	58.1
Estone 11	CCCTGTCTGTGCTCTTCCT	TCTGCTTTTGGACCCCTGTT	62	62
Estone 12	CCACAGGGATTAAGGAGACAAG	GAGCAGACATGGCCCTCCAT	62	60.5
Estone 13	ACCTGGCCAGCAGTCATCTC	AACTCTCATCCCACCATGCC	66	62.5
Estone 14	CAAGTTCACTCTTCCCAACAACCCT	ATGTGGGAGCGAGTGAGTGATTGTT	62	62
Estone 15	CCCTCCTTCACTGCCTTGAC	GAAGGGAGAGGGGCTGCTAT	62	61.3
Estone 16A	CATGTCCACCTGTGTGAAGGA	CAGCCAGCCAATGATGTTGT	62	62
Estone 16B	CCAGAAGCCACGCAATATCA	GACCTGGCTCAGAACCCTGG	62	61.6
Estone 17	ACCTCCCACACTGATGCTT	AGACAGGGAACGGGAGGAGT	62	60.8/62.3
Estone 18	TCCTGCATCTCTTCTGGCA	CCTAGGAGTCTGTTCCCA	62	61+1
Estone 19	AAAGCCAGGATCAGAACCCA	CTGGCTCCCCCTGTTCTATG	62	663.7
Estone 20	TGGGTATGAGGGTGCACCAGAGCT	GCATCAGAGGAGTCAATGGAAAAG	62	61.5+1
Estone 21	TAGGCTGTTACCCCTCCTAAGGTA	GCCTCTGACCCTGTGACTGCAGTG	62	61.7+1
Estone 22A	TCCCAAGGTTTCAGGACCTC	GCGAGCCTCGGACTTCTCTA	62	seq. diretto
Estone 22B	GCTGTGAAGAGTGCAGAAA	AGGAACAAGACAGTGAGCCC	64	63.7
Estone 23	TCCTATTTGAGTGATGTGCCTCTC	ATGGTCTGAGAGTCCCTGATGAGAC	62	60.9
Estone 24	AGATGGCACCAAGCTGGTGACCTT	TCTGGGCACAGATAGACATGGCAT	63	60.4/61.5
Estone 25	AGTCAGGATGCTTTGCCTCA	AGGATGGCTGTCTTGGGTCT	63	62.4/63.4+1
Estone 26	ACCACTGGTGGACCCCTCCT	GCTGTGAACAGGACACCCTAGA	63	62/63.4+1
Estone 27A	CAGAGAAGCCGAGAGCCTTT	GAGGTGGGAGGAGGAAGTTG	62	62.5
Estone 27B	CAGAGAAGCCGAGAGCCTTTT	TGCAGGTTGTCTGATCTGCTC	62	
Estone 28	CCTCTTACACCCCTTCATTCC	GTGTGCGTGTATTGGCTTGT	63	60.6/63.5+1.5
Estone 29	TGAGGGCTAGAGGAGGAGGT	GCTGGGAAGGGAAGTGA	63	63.2
Estone 30	ATGAGGCCAAGGGATGATGT	CCTGTGTGGGATCTGCTGAG	62	63.7
Estone 31	TGTTTCTCTTGTCCCATC	AGGATGGCTCTGGCCTCT	62	63.6
Estone 32	TCCTGAGACAGACCCTGGAC	GGAGGGACACGCCTCTTT	63	63
Estone 33	AACTCCACTGGACCTCAGCA	GGGATGGGACAGTGAACAAA	63	63.2/64.2+1.5
Estone 34	CTGTGCCCTGACTGTCTGC	GGAGGAATCTGGTGCCTGTA	60	62.9/63.4/63.7
Estone 35	TTCTCCTGCCCTAGGTTA	AGCAGGAAAAGCATTGAGCA	62	63.4
Estone 36	TGCTCAATGCTTTTCTGCT	GGCACATGGTCTGGTCAAGT	63	61.8/62.8+0.5
Estone 37A	CGGGATGTAAGTCCCCCACTC	TGGTTGTCAGTGTGGCTATGG	60	64.7+1
Estone 37B	GGCAGAGGAGCTGAAGAAG	TGGTTGTCAGTGTGGCTATG	60	65.3
Estone 38	GCGGAGGGGATGCTACCT	GGGCCTGGGTTCTCAGACT	63	63.8/64.2+0.5
Estone 39	CCCAAGCCAGGAGTCTGAG	CTGTCTGGGTATGCCTGCTG	64	64.4
Estone 40	GCCCAATACCATCTCTCCAA	GCATTTCCACCTCCCCTAGT	63	59.2/61.3+1

APPENDICE B

Condizioni di amplificazione e di analisi DHPLC del gene *MYBPC3*.

AMPLIFICATO	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	T°C ann	T° C DHPLC
Esoni 1	GAAGGACAGGACCCCACTC	GCTCCCAATTGTAGACACC	64	seq. diretto
Esoni 2	GGTAGAGTATTACGTGAGGGGATGC	CTGGATGGATGGAGAGTCGCT	60	62
Esoni 3	CTTTCCTCATCCACAGCGGG	GCTTTTGAGACCYGCCCTGG	60	64.4
Esoni 4	TGGGAGGCGGAGCTTGCAATG	CCCCTTCCCACCCCAATGCTG	64	63
Esoni 5N	CAGCAGGACACTCCCAAG	TGTGCCTTCTAGGGCTCTCC	60	65.5
Esoni 6	ATTACAGGCCTGAGCCACCG	AGACCAGGACCCATGGGGAG	68	63.1/63.6
Esoni 7	TCTGAAGCCCCTTCCCCCAT	GGCTCCTGTGGGGGTTAGACT	55	63.7+2
Esoni 8	CAGGGCTGGGGATGATTTGC	AGGAGCAGGGATGGGAGTGGA	60	64.1+1.5
Esoni 9	CCACTCCACTCCCATCCTGC	ACAGTGCTGGGATTTGGAGCC	55	seq. diretto
Esoni 10	GGTCTACAGGTCGGCCCAA	CAGGAGAAGCCCAAGGCACA	62	63.6
Esoni 11	GGGTGGGGTCCAGGTCTTTGA	CCCTGTCCCTCTGCCCTTC	60	63.6+1
Esoni 12	AAGGGGCAGAGGGACAGGG	TCCTGTGTAGGGAAGGGCTAGC	60	62.5/64.6+1
Esoni 13	ACCTGGGCCCCAGCCACAG	GAGGCAAGGCTATGGGGGTC	62	64.2
Esoni 14-15	CTCTCCTTTTGTCTCGGGGCT	GGGTGAGCATGAGGGTTGGC	60	61.8/63.7
Esoni 16	CTGGGACCTGAGGATGTGGG	GGTGGGTGGGTGGCAAGTG	67	63.8+1
Esoni 17	GTTCCAGAAGCACGGGGCA	GTGGGGTGGGGGCTGAGG	60	63.9
Esoni 18	GGATTCAGGCCACCCACA	TCTGCCTCTGTCCACCTGTC	55	62.8+1.5
Esoni 19-20	CTGGGGTATCTGGCAAGGCC	GCGGAAAGTGAGCAGAACC	60	61.3/64.2+1
Esoni 21	TGACCTGTGCTCCTCCTGGCTCT	CTCTGCTGATTCTTCCACCC	60	61.3
Esoni 22	GGCAAGGTGGGCAGTGTGG	TGAAAGACAAACGATCCTCCTCC	62	seq. diretto
Esoni 23	TCCTGGGGTCTGACTTGGA	CTGAATGAGCGAACGGATG	55	64.3
Esoni 24	GCAACGTTACTCAAGGCCCTG	CCACCTTCCCTCGGATCTGTT	55	65+1
Esoni 25	AACAGATCCGAGGGAAGGTGG	TTTTTAACTGGGGAGGGGGC	62	65.3
Esoni 26	GATCTCCAGCTTCCCCAGGC	GGTGTCTCAACTTTCGGCAA	60	64.5+1.5
Esoni 27	ATCAGAGGAGTGGGCAGTGGG	CAAGGGCCTGGGGTGTCAAT	68	64.5
Esoni 28	AGCTCTCTGGCCTTGTCTCAA	TATAGCCTCTCTCCCTGGGG	62	63.3
Esoni 29N	CCCTTGAGTGATCCAGGTT	AAATGTGAGCTGTGGGTTGG	62	64.4
Esoni 30	TGGTTGGCAGGGGTGGGGTGG	GCCTAGCGAGGGTGCACGTGGG	64	seq. diretto
Esoni 31N	TGCTGATCTGAATCCCTCCA	CTAGGCCCTCTCCCTGTTC	62	62.3
Esoni 32	TGGGAACAGGGAGAGGGGCC	GCTCAACGTCTGGGGCCTGTG	68	62.2
Esoni 33	GATGTGTCTCCCTGGGTCCCTG	GAGGACAACGGAGCAAAGCCC	60	59.9
Esoni 34N	TGGAGGTGCGAGGTGAGG	TGGCCATCCCCAGGAGC	62	64.1
Esoni 35	GGCTGCAAGGGCACGGAC	CCACTCAGGACTGCCCGACAA	62	seq. diretto

APPENDICE C

Condizioni di amplificazione e di analisi DHPLC del gene *TNNT2*.

AMPLIFICATO	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	T°C ann	T° C DHPLC
Eson 8	GTCCTGGACACCCTCAGTCC	CCCACCTATGCTCTACCCCA	62	61.9
Eson 9	CAGAGGTCTTTTGCCTGCG	GCCTCACAAAAGGGATGGAG	62	61.3/62.3
Eson 10	GCGATGTCACCTTCTCCCTA	ATGAATAGAGAGGGGCCTGG	60	66.2+1
Eson 11	CCCAGAATCAGGGTTTCCAA	GACACCTCATTCTCAGGGC	62	seq. diretto
Eson 12	TTGCCTTTGTCTCCTGCCT	CTCTTCACTCCTCCCCTCCA	62	seq. diretto
Eson 13	GTTTGGGGAGGGTTAGGGG	CTCTGGTGGCTCACAGCAAG	62	62
Eson 14	GGAGGGCCCTTCTTACTGGAC	CCGGACCCAGTGAACCAGGAGGAG	68	62.6
Eson 15	CTCCTTCTCCTCCTGCACTG	GGGATAGCTGGAAGGTAGGG	60	61.3
Eson 16	GGGGGTGAAATGTGGGGCGGAGAA	GTGTGGGGGCAGGCAGGAGTGGTG	62	63.8

Condizioni di amplificazione e di analisi DHPLC del gene *TNNI3*.

AMPLIFICATO	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	T°C ann	T° C DHPLC
Eson 1	GTCCTGGACACCCTCAGTCC	CCCACCTATGCTCTACCCCA	63	seq. diretto
Eson 2	CAGAGGTCTTTTGCCTGCG	GCCTCACAAAAGGGATGGAG	63	63.1
Eson 3	GCGATGTCACCTTCTCCCTA	ATGAATAGAGAGGGGCCTGG	63	64.3/65.2
Eson 4	CCCAGAATCAGGGTTTCCAA	GACACCTCATTCTCAGGGC	63	62
Eson 5	TTGCCTTTGTCTCCTGCCT	CTCTTCACTCCTCCCCTCCA	63	64.7+1/66.7+1.5
Eson 6	GTTTGGGGAGGGTTAGGGG	CTCTGGTGGCTCACAGCAAG	63	seq. diretto
Eson 7	GGAGGGCCCTTCTTACTGGAC	CCGGACCCAGTGAACCAGGAGGAG	63	61.1/62.6+1/63.4+1
Eson 8	CTCCTTCTCCTCCTGCACTG	GGGATAGCTGGAAGGTAGGG	63	60.5/61.8+1

BIBLIOGRAFIA

Andersen PS, Havndrup O, Hougs L, Sørensen KM, Jensen M, Larsen LA, Hedley P, Bie Thomsen AR, Moolman-Smook J, Christiansen M, Bundgaard H. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Hum Mutat.* 2008.

Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 2002;11(20):2499-506.

Bagattin A, Veronese C, Bauce B, Wuyts w, Settimo L, Nava A, Ramazzo A, Danieli GA. Denaturing HPLC-based approach for detecting RYR2 mutations involved in malignant arrhythmias. *Clinical Chemistry.* 2004; 50(7):1148-1155.

Bashyaam MD, Savithri Gr, Kumar MS, Narasimhan c, Nallari P. Molecular genetics of hypertrophic acrdiomyopathy. *J Hum Genet.* 2003;48 (2):55-64.

Burke AP, Farb a, Virmani R, Goodin J, Smialek JE. Sports-related and non-sports-related sudden cardiac death in young adults. *Am Heart J.* 1991; 121:568-75.

Corrado D , basso C, Schiavon M, Tiene G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med.* 1998; 339(6):364-9.

Davis JS, Hassanzadeh S, Winitsky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, Aletras AH, Wen H, Epstein ND. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell.* 2001;107:631-41.

Elliot PM, Gimeno JR, Thaman R. Historical trends survival rates in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2006; 92:785-791.

Fokstuen S, Lyle R, Munoz A, Gehrig C, Lerch R, Perrot A, Osterziel KJ, Geier C, Beghetti M, Mach F, Sztajzel J, Sigwart U, Antonarakis SE, and Blouin JL.

A DNA Resequencing Array for Pathogenic Mutation Detection in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Hum Mut* 2008; 29(6):879-885

Geier C, Perrot A, Ozcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, Van der Ven PF, Furst DO, Vonwald A, Von Hodenberg E, Nurnberg P, Scheffold T, Dietz T, Osterziel KJ. Mutation in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;107:1390-95.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac heavy myosin chain gene mutation. *Cell*. 1990;62:999-1006.

Greber-Platzer S, Marx M, Fleischmann C, Suppan C, Dobner M, Wimmer M. Beta-myosin heavy chain gene: mutations and hypertrophic cardiomyopathy in austrian children. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:141-48.

Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata h, Hohda S, Takahashi M, Hori H, Koga Y, Oka N, Imaizumi T, Yasunami M, Rimura.

Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 313:178–184.

Hwang T, Lee W, Kimura A, Satoh M, Nakamura T, Kim MK, Choi SK, Park JE. Early expression of a malignant phenotype of familial hypertrophic cardiomyopathy associated with a Gly716Arg myosin heavy chain mutation in a Korean family. *Am J Cardiol*. 1998;82:1509-13.

Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS,

Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, Sasazuki T. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet.* 1997;16:379-82.

Klues HG, Schiffers A, Maron BJ. Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: morphologic observations and significance as assessed by two-dimensional echocardiography in 600 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:1699-708.

Koyanagi T, Harad H, Nishi H, Kawai H, Yokota Y, Koga Y, Toshima H, Kimura A. Structural and functional aspects of cardiac β -myosin heavy chain gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 1996;94:I-84.

Krams R, Kofflard MJ, Dunker DJ, Von Birgelen C, Carlier S, Kliffen M, ten Cate F, Serruys PW. Decreased coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy is related to remodelling of the coronary microcirculation. *Circulation.* 1998;97:230-33.

Kubo T, Gimeno JR, Bahl A, Steffensen U, Steffensen M, Osman E, Thaman R, Mogensen J, Elliott PM, Doi Y, McKenna WJ. Prevalence, clinical significance, and genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy with restrictive phenotype. *Am Coll Cardiol.* 2007;49:2419-26).

Langaee T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutat Res.* 2005. 573(1-2):96-102.

Lazzeroni E, Picano E, Morozzi L, Maurizio AR, Palma G, Ceriati R, Iori E, Barilli A. Dipyridamole-induced ischemia as prognostic marker of future adverse cardiac events in a adult patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 1997;96:4268-72.

Marian AJ, Salek L, Lutucuta S. Molecular genetics and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy. *Minerva Med.* 2001;92:435-51.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 1997;350:125-33.

Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002;287:1308-1320

Maron BJ et Roberts WC. Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the ventricular septum of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1979;59:689.

Maron BJ et Roberts WC. Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the left ventricular wall of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1981;63:882-94.

Maron BJ et Spirito P. Impact of patient selection biases on the perception of hypertrophic cardiomyopathy and its natural history. *Am J Cardiol*. 1993;72:970-72.

Maron BJ, Bonow RO, Cannon RO, Leon MB, Epstein SE. Hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl Med*. 1987;316:780-89.844-52.

Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: echocardiographic analysis of 4,111 subjects the CARDIA study. *Circulation*. 1995;92:785-789.

Maron BJ, Nichols PF, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ. Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assesment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol*. 1984;53:1087-94.

Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural ("small vessels") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8:545-47.

McKenna W, Deanfield J, Faruqui A, England D, Oakley C, Goodwin J. Prognosis in hypertrophic cardiomyopathy: role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. *Am J Cardiol.* 1981;47:532-38.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16:1215.

Minamisawa S, Sato Y, Tatsuguchi Y, Fujino T, Imamura S, Uetsuka Y, Nakazawa M, Matsuoka R. Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(1):1-4.

Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baamdrup U, Borglum AD. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1999;103:R39-43.

Moolman JC, Corfield VA, Posen B, Ngumbela K, Seidman C, Brink PA, Watkins H. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):549-55.

Nanni L, Pieroni M, Chimenti C, Simionati B, Zimbello R, Maseri A, Frustaci A, Lanfranchi. Hypertrophic cardiomyopathy: two homozygous cases with 'typical' hypertrophic cardiomyopathy and three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309(2):391-8.

Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 1995; 57: A266.

Olivotto I, Gistri R, Petrone P, Pedemonte E, Vargiu D, Cecchi F. Maximum left ventricular thickness and risk of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(2):315-21.

Olivotto I, Girolami F, Ackerman M, Nistri s, Martijn Bos J, Zachara E, Ommen SR, Theis JL, Vaubel RA, Re F, Armentano C, Poggesi C, Torricelli F, Cecchi F.

Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83 (6): 630-638.

Tan L, Chen SN, Lombardi R, Nagueh SF, Shete S, Roberts R, Willerson JT, Marian AJ. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2007; 100:766-768.

Posch MG, Posch MJ, Perrot A, Dietz R, Ozcelik C. Variations in DSG2: V56M, V158G and V920G are not pathogenic for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008 Dec;5(12):E1.

Richard P, Charron P, Carrier R, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burbani M, Gueffet J-P, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajada M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for molecular diagnosis strategy. *Circulation.* 2003; 107:2227-2232.

Sanbe a, Nelson D, Gulick J, Setser E, Osinska H, Wang X, Hewett TE, Klevittsky R, Hayes E, Warshaw DM, Robbins J. In vivo analysis of an essential myosin light chain mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2000;87(4):296-302.

Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Mrumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;262:411-17.

Syrris P, Ward D, Asimaki A, Evans A, Sen-Chowdhry S, Hughes SE, McKenna WJ. Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of family disease. *Eur Soc Cardiol* 2007; 28:581-588.

Song La, Zoua Y, Wanga J, Wangb Z, Zhena Y, Loua K, Zhanga Q, Wanga X, Wanga H, Lia J, Huia R. Mutations profile in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta* 351 (2005) 209–216.

Sou RL, Vikstrom KL, Strauss M, Cohen C, Szent-Gyor AG, Lemwand LA. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J Mol Biol.* 1997; 266:317-330.

Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1997; 336(11):775-85.

Swynghedaw B. *Molecular Cardiology for the Cardilogist*, Kluber. 1998.

Tan YH, Liu H, Eu KW, Ang PW, Li WQ, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Soong R. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. *Pathology.*2008. 40(3):295–298.

Thierfeldr L, Watkins H, MacRae C, Lamas R, McKenna W, Vosberg HP, Seidman JG, Seidman CE. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a diseases of the sarcomere. *Cell.* 1994;77:701-12.

Tobacman LS. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol.* 1996; 58: 447-81.

Van Driest SL, Vasile, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(9):1903-10.

Vasile VC, Ommen SR, Edwards WD, Ackerman MJ. A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 345:998-1003.

Waldmuller S, Muller M, Rackebrandt K, Binner P, Poths S, Bonin M, Scheffold T. Array-Based Resequencing Assay for Mutations Causing Hypertrophic Cardiomyopathy. *Clinical Chemistry*. 2008; 54(4):682-687.

Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C genes on chromosom 11 caused familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*. 1995;11(4):434-37.

Woo A, Rokowski H, Liew JC, Zhao M-S, Liew C-C, Parker TG, Zeller M, Wigle ED. Mutation of the β -myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy critical functional sites determine prognosis. *Heart*.2003;89:1179-85.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001;17(6):439-74.

Yu B, Sawnier NA, Caramins M, Yuan ZG, Saunderson RB, Pamphlett R, Richmond DR, Jeremy RW, Trent RJ. Denaturing high performance liquid cromatography: hight throughput mutation screening in familial hypertrophic cardiomyopathy and SNP genotyping in motor neurone disease. *J Clin Pathol*. 2005; 58 (5):479-485.

Tutte le informazioni di carattere generale sull'apparecchio DHPLC sono state tratte da: Preinstallation Guide for Trangenomic WAVE[®](2001).

RIASSUNTO

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è una patologia del miocardio caratterizzata da ispessimento del setto interventricolare e del ventricolo sinistro, anomalo orientamento delle fibre miocardiche (*disarray*) e fibrosi interstiziale. La patologia viene ereditata come carattere autosomico dominante, la sua frequenza nella popolazione è di circa lo 0.2% ed è considerata la principale causa di morte improvvisa soprattutto nei giovani.

Attualmente sono note più di 455 mutazioni causative, distribuite in geni diversi che codificano proteine del sarcomero, dei dischi Z o dei dischi intercalari. Le mutazioni patogene finora riportate nei geni *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3* rappresentano circa il 70% del totale.

Il presente studio ha messo a punto un protocollo di screening relativamente rapido e poco costoso per la ricerca di mutazioni in tali geni. Il nuovo protocollo, che implica l'amplificazione PCR degli esoni, o di loro segmenti, dei geni considerati e la successiva analisi mediante DHPLC e/o sequenziamento diretto, è stato utilizzato per individuare mutazioni nelle regioni codificanti dei quattro geni in questione, in 82 soggetti affetti da cardiomiopatia ipertrofica, 43 casi indice e 39 casi isolati. Sono state individuate in tutto 21 mutazioni in 24 pazienti.

Per valutare l'efficacia del nuovo protocollo, il DNA di 12 degli 82 pazienti è stato analizzato anche mediante chip a DNA recentemente sviluppati da Fokstuen S et al. (2008). In nessuno dei DNA analizzati mediante DNA chip sono state individuate variazioni diverse da quelle identificate mediante il metodo proposto da questo studio.

SUMMARY

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the major cause of sudden cardiac death, with about 0.2% frequency in the adult human population. The disease, inherited as autosomal dominant, is characterized by left ventricular hypertrophy, myocyte hypertrophy, fibre disarray and interstitial fibrosis. To date, over 455 mutations have been reported, targeting different genes encoding proteins of myocardial sarcomere, proteins of the z-disc and of the intercalated discs. Pathogenic mutations detected in the β -myosin heavy chain, myosin-binding protein C, troponin T and troponin I genes account for about 70% of the total.

The aim of this study is set-up a cost-effective, rapid and efficient method DHPLC-based for mutation screening in patients with hypertrophic cardiomyopathy. The protocol involve PCR amplification of exons or exon segments, denaturing high performance liquid chromatography of amplicons and direct sequencing.

Coding sequences (exons) of *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* and *TNNI3* genes have been screened for mutations in a series of 82 HCM patients (43 index cases and 39 isolated cases). Twenty-one mutations were identified in 24 patients.

The efficiency of the protocol was tested by analyzing DNA of 12 patients both by DHPLC and by HCM re-sequencing DNChip. No additional variations were detected by DNChip, if compared with those detected by DHPLC.

DHPLC analysis appears as a high-throughput, sensitive and specific method for mutation detection in patients with hypertrophic cardiomyopathy.

**ALTRE RICERCHE SVOLTE IN COLLABORAZIONE
NELL'AMBITO DELL'ATTIVITA' SCIENTIFICA
ATTINENTE AL DOTTORATO**

Durante il periodo in cui ho svolto il mio dottorato ho utilizzato le stesse metodiche di analisi impiegate per la ricerca di mutazioni in pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica anche in soggetti affetti da un'altra patologia cardiaca, la cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro, collaborando ad un progetto di ricerca di cui è responsabile la Dr.ssa Alessandra Rampazzo del Dipartimento di Biologia dell' Università di Padova.

Il lavoro ha implicato lo screening di quattro dei geni finora noti come responsabili della malattia: *PKP2*, *JUP*, *DSG2* e *DSC2*, in gruppi differenti di pazienti.

INTRODUZIONE

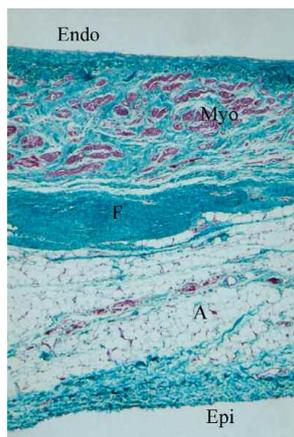
La cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVD/C, Arrhythmogenic Right Ventricular Displasia/Cardiomyopathy) è una malattia del muscolo cardiaco, ad eziologia ancora in parte sconosciuta, ereditata come un carattere autosomico dominante a penetranza incompleta (Marcus et al.,1982).

La caratteristica patologica principale è la progressiva perdita dei cardiomiociti del ventricolo destro, che vengono sostituiti da tessuto adiposo e fibroadiposo (Figure 1A e 2A). Questo porta ad un'alterata conduzione dell'impulso elettrico che può provocare aritmia, collasso cardiaco e morte improvvisa (soprattutto negli atleti).

La sostituzione fibroadiposa nel ventricolo sinistro è comune in una fase avanzata della malattia; colpisce preferenzialmente la parete posterolaterale, risparmiando il setto interventricolare.



1A



2A

Figura 1A: Reperto autoptico di cuore con evidenti infiltrazioni adipose in una porzione della parete del ventricolo destro (Indik et al., 2003).

Figura 2A: Preparato istologico di cuore con aree di tessuto fibroso (F) e adiposo (A) nelle zone dell'epicardio (Epi) e del miocardio con piccoli clusters di miociti rimanenti (Myo) vicino al limite dell'endocardio (Endo) (Indik et al., 2003).

L'espressione clinica variabile della malattia si pensa sia dovuta, in parte, alla sua ampia eterogeneità genetica. Tramite studi di linkage con marcatori microsatellite polimorfi del DNA e l'analisi di geni candidati in famiglie con ricorrenza di casi ARVC, sono stati individuati 12 loci indipendentemente implicati nella trasmissione della malattia; per 9 di questi è stato identificato il gene che, se mutato, determina l'insorgere della patologia (Tabella 1A).

Acronimo	Locus	referenza	Gene coinvolto	referenza
ARVD1	14q23-q24	(Rampazzo <i>et al.</i> , 1994)	TGFβ3	(Beffagna <i>et al.</i> , 2005)
ARVD2	1q42-q43	(Rampazzo <i>et al.</i> , 1995)	RYR2	(Tiso <i>et al.</i> , 2001)
ARVD3	14q12-q22	(Severini <i>et al.</i> , 1996)	sconosciuto	-
ARVD4	2q32.1-q32.3	(Rampazzo <i>et al.</i> , 1997)	sconosciuto	-
ARVD5	3p23	(Ahamad <i>et al.</i> , 1998)	TMEM43	(Merner <i>et al.</i> , 2008)
ARVD6	10p12-p14	(Li <i>et al.</i> , 2000)	sconosciuto	-
ARVD7	10q22	(Melberg <i>et al.</i> , 1999)	sconosciuto	-
ARVD8	6p24	(Rampazzo <i>et al.</i> , 2002)	DSP	(Rampazzo <i>et al.</i> , 2002)
ARVD9	12p11.21	(Gerull <i>et al.</i> , 2004)	PKP2	(Gerull <i>et al.</i> , 2004)
ARVD10	18q12.1-q12.2	(Pilichou <i>et al.</i> , 2006)	DSG2	(Pilichou <i>et al.</i> , 2006)
ARVD11	18q12.1-q12.2	(Syrris <i>et al.</i> , 2006)	DSC2	(Syrris <i>et al.</i> , 2006)
ARVD12	17q21	(Asimaki <i>et al.</i> , 2007)	JUP	(Asimaki <i>et al.</i> , 2007)

Tabella 1A: Loci mappati e geni implicati nella cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro. I riferimenti bibliografici riportati in corrispondenza di ciascun locus e gene sono reperibili in OMIM (www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM) in corrispondenza degli acronimi indicati.

Ad eccezione di RYR2 che codifica un canale del calcio presente sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico dei cardiomiociti responsabile della forma ARVD2, del TGF β 3 codificante per il fattore di crescita *Transforming Growth Factor β 3*, una citochina solubile appartenente alla superfamiglia TGF- β responsabile della forma ARVD1 e di TMEM43 che codifica per una proteina transmembrana altamente conservata nell'evoluzione, le cui funzioni sono ancora in gran parte sconosciute, responsabile della forma ARVD5, la maggior parte dei geni identificati, che, se mutati, sono responsabili di una delle forme di ARVC, codificano per proteine che costituiscono i desmosomi. Si è pertanto ipotizzato che le basi molecolari della malattia siano da attribuirsi ad alterazioni nella struttura e nella funzionalità di tali complessi giunzionali.

I desmosomi provvedono al mantenimento dell'integrità meccanica dei tessuti, in particolare di quelli sottoposti a stress meccanici, come il cuore e la pelle. Sono complessi multiproteici dinamici soggetti a segnali regolatori trascrizionali e post-trascrizionali e possono partecipare alla morfogenesi e differenziazione tissutale.

Sono costituiti da almeno tre distinte famiglie di geni: le caderine, le proteine armadillo e le plachine (Getsios et al., 2004).

La famiglia delle caderine è ulteriormente divisa in Desmogleine (Dsg1-4) e Desmocolline (Dsc1-3) (Whitlock et al., 2003); entrambe sono glicoproteine con un solo segmento transmembrana che mediano l'adesione calcio-dipendente cellula-cellula. Lo splicing alternativo delle Desmocolline porta alla formazione di due isoforme: a (lunga) e b (corta). Le proteine armadillo comprendono le Placoglobine e le Placofilline (PKP1-4), che sono caratterizzate da un numero variabile di ripetizioni di un motivo (ARM-motif) di circa 42aa (Bonne et al., 2003). La famiglia delle plachine infine include la desmoplachina I e II, la pectina, l'enveloplachina e la periplachina (Leung et al., 2002).

RISULTATI

Mediante DHPLC e sequenziamento diretto è stata eseguita la ricerca di mutazioni in quattro geni già noti per essere implicati nella cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro; in particolare nei geni *PKP2* e *JUP* che codificano rispettivamente la placofilina-2 e la placoglobina, proteine armadillo presenti nei desmosomi cardiaci e nei geni *DSG2* e *DSC2* che codificano le caderine cardiache desmogleina-2 e desmocollina-2.

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi per ciascun gene per ciascun gruppo di pazienti.

RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE *PKP2*

Lo screening per la ricerca di mutazioni nel gene *PKP2*, ha coinvolto 44 soggetti italiani affetti da ARVC, non imparentati tra loro; l'analisi genetica è stata successivamente estesa ai familiari dei casi indice risultati portatori di una o più mutazioni.

E' stato preso in considerazione il gene che codifica l'isoforma b della placofilina 2 derivante dalla trascrizione di tutti i 14 esoni del gene. Sono state individuate otto mutazioni in nove pazienti di cui sei non ancora note (Tabella 2A).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 1	c.145_148delCAGA	T50SfsX60
Esone 3	c.964_965delGGInsC	G322PfsX30
Esone 5	c.1214_1215InsT	L404LfsX5
Esone 6	c.1471C>T	R490W
Esone 7	c.1577C>T c.1655T>G	T526M F552C
Esone 9	c.1841T>C	L614P
Esone 10	c.2011delC	P671PfsX12

Tabella 2A: Mutazioni riscontrate nei 44 pazienti (in rosso sono riportate quelle non note in letteratura).

Lo screening ha inoltre identificato polimorfismi già noti in letteratura e variazioni ancora ignote ma presenti frequentemente nella popolazione italiana (Tabella 3A).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 1	c.209G>T c.76G>A	S70I D26N	- -
Esone 2	c.336+55C>T	-	nuovo
Esone 4	c.1170+65G>A c.1100T>C	- L366P	nuovo 1046116
Esone 8	c.1689-7InsT	-	nuovo
Esone 10	c.2145+44G>A	-	10772008
Esone 12	c.2300-20DelT c.2489+72_73DelGTInsA c.2489+14InsC	- - -	nuovo nuovo nuovo
Esone 13	c.2490-104C>G c.2490-56C>A	- -	6488092 6488091
Esone 14	c.2578-69G>A	-	nuovo

Tabella 3A: Polimorfismi riscontrati nel gene PKP2 in 44 pazienti.

c.145_148delCAGA→T50SfsX60 (esone 1)

La mutazione *frameshift* T50SfsX60, precedentemente descritta in letteratura (Gerull *et al.*, 2004), è stata individuata in due pazienti su 44 ed è determinata da una delezione di 4 nucleotidi (c.145_148delCAGA) nell'esone 1, che causa lo slittamento del modulo di lettura del gene e l'inserimento di un codone di stop prematuro. La proteina predetta risulta trunca a livello del dominio N-terminale. L'analisi genetica è stata estesa ai familiari dei due casi indice, allo scopo di valutare la segregazione della mutazione all'interno dei rispettivi nuclei familiari. Nella famiglia del paziente #2 (figura 3A) la delezione nucleotidica è stata riscontrata in eterozigosi in 1 soggetto affetto su 3 e in 4 individui apparentemente sani; la mutazione, quindi, non giustifica il fenotipo clinico di tutti gli affetti. Nell'ambito della famiglia del paziente #13 (figura 4A) la delezione è stata individuata in eterozigosi in 2 soggetti che presentano segni clinici compatibili con la malattia e in uno che, al momento, non sembra manifestare alcun sintomo riconducibile all'ARVC.

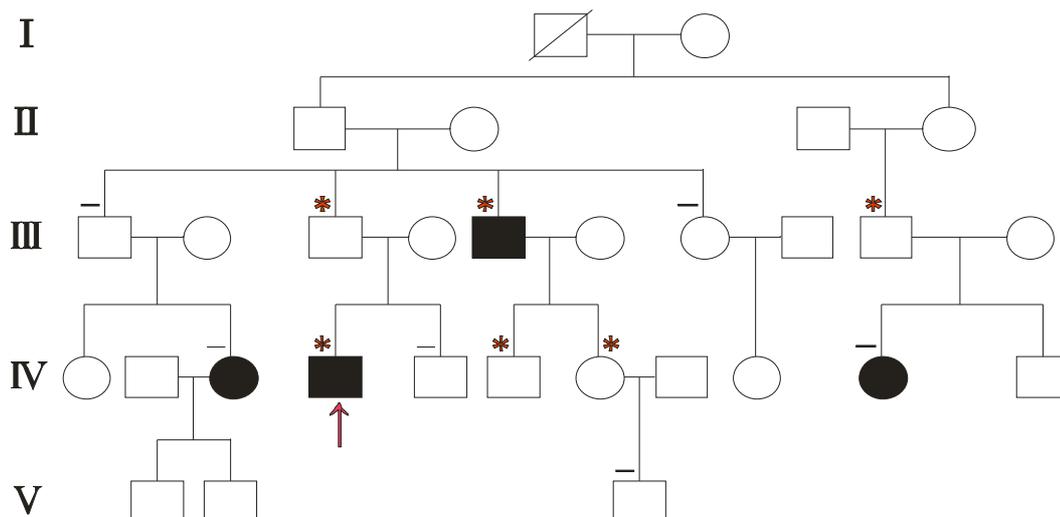


Figura 3A: Albero genealogico relativo alla famiglia del probando #2 (indicato dalla freccia) in cui è stata individuata la mutazione c.145_148delCAGA all'interno dell'esone 1. (* = mutazione riscontrata in eterozigosi; - = assenza di mutazione; mancanza di simbolo = soggetto non indagato). Il colore bianco o nero indica, rispettivamente, un individuo clinicamente non affetto o affetto.

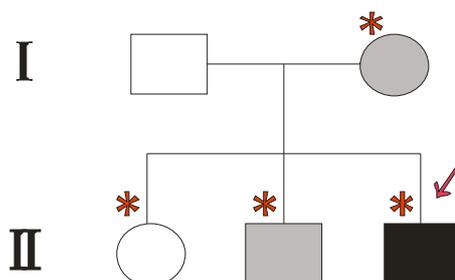


Figura 4A: Albero genealogico relativo alla famiglia del probando #13 (indicato dalla freccia) in cui è stata individuata la mutazione c.145_148delCAGA all'interno dell'esone 1. (* = mutazione riscontrata in eterozigosi; mancanza di simbolo = soggetto non indagato). Il colore bianco o nero indica, rispettivamente, un individuo clinicamente non affetto o affetto; il grigio si riferisce alla presenza di segni clinici compatibili con la malattia.

c.964_965delGGInsC→G322PfsX30 (esone 3)

Il cambiamento G322PfsX30 non è descritto in letteratura ed è dovuto alla delezione di due G e l'inserzione di una C all'interno dell'esone 3 (c.964_965delGGInsC) (figura 5A); la conseguente alterazione del modulo di lettura del gene comporta l'addizione di 30 amminoacidi prima di un codone di stop prematuro (figura 6A). La proteina tronca predetta manca di tutti i domini *Arm*. Dal sequenziamento del DNA di 110 individui sani, la delezione/inserzione è risultata assente in tutti i soggetti analizzati ed è stata classificata come mutazione.

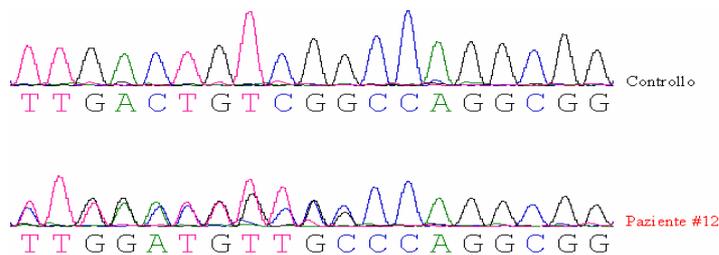


Figura 5A: Confronto tra l'elettroferogramma di un controllo sano (in alto) e quello del probando #12 (in basso) in cui è stata identificata la variazione c.964_965delGGInsC all'interno dell'esone 3. Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando il *primer reverse*.



Figura 6A: Allineamento tra il cDNA di un controllo sano (in alto) e quello del probando #12 (in basso) in cui è stata identificata la variazione c.964_965delGGInsC nell'esone 3. La delezione/inserzione nucleotidica (cerchiata in rosa) causa lo slittamento del modulo di lettura del gene e l'aggiunta di 30 amminoacidi (in rosso) prima di un codone di stop prematuro (*).

c.1214_1215InsT→L404LfsX5

Anche questa variazione, causata dall'inserzione di un nucleotide all'interno dell'esone 5 (c.1214_1215InsT) (figura 7A), è una nuova mutazione in quanto non è riportata in letteratura e non è stata riscontrata nel DNA di 210 soggetti sani (420 cromosomi), in seguito ad analisi DHPLC (figura 7A). Il *frameshift*, conseguente all'inserzione nucleotidica, determina l'introduzione nel gene di un codone di stop prematuro (figura 8A) e la formazione di una proteina tronca a livello del secondo dominio *Arm*.

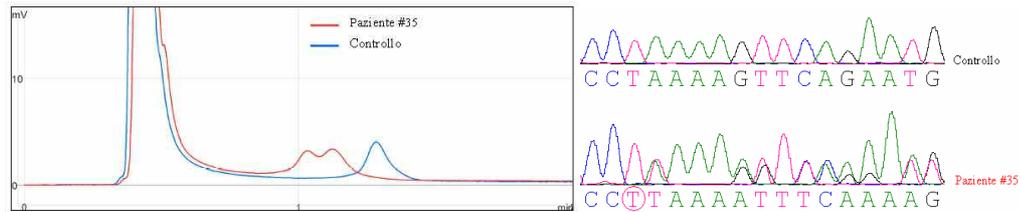


Figura 7A: Risultato dell'analisi cromatografica e del sequenziamento del paziente con variazione c.1214_1215InsT all'interno dell'esone 5; il nucleotide inserito è cerchiato in rosa.

Controllo

c. 1185 CGTGGCATCCTCAAGCTTCTGCAGCTCCTAAAAGTTCAGAAATGAA
R G I L K L L Q L L K V Q N E

Paziente #35

c. 1185 CGTGGCATCCTCAAGCTTCTGCAGCTCCTTAAAAGTTCAGAAATGA
R G I L K L L Q L L K S S E *

Figura 8A: Allineamento tra il cDNA di un controllo sano (in alto) e quello del probando #35 (in basso) in cui è stata identificata la variazione c.1214_1215InsT nell'esone 5. L'inserzione nucleotidica (cerchiata in rosa) causa lo slittamento del modulo di lettura del gene e l'aggiunzione di 5 amminoacidi (in rosso) prima di un codone di stop prematuro (*).

c.1471C>T→R490W (esone 6)

La variazione missenso Arg490Trp, individuata nel paziente #18, è dovuta ad un cambiamento nucleotidico all'interno dell'esone 6 (c.1471C>T) e coinvolge un residuo appartenente ad una sequenza di 44 amminoacidi, tra il secondo e il terzo dominio *Arm* della proteina; tale sequenza non è presente nell'isoforma a della placofilina 2, in quanto lo *splicing* alternativo del trascritto rimuove l'esone 6. Il sequenziamento del DNA di 110 soggetti sani non ha rilevato la presenza della sostituzione nucleotidica identificata nel caso indice.

c.1577C>T→T526M (esone 7)

Il cambiamento nucleotidico c.1577C>T all'interno dell'esone 7 (figura 9A) comporta una variazione amminoacidica missenso (Thr>Met) in un residuo conservato evolutivamente, localizzato nel quarto dominio *Arm* della proteina. La sostituzione nucleotidica non è stata riscontrata in 110 controlli della popolazione italiana.



Figura 9A: Profilo di eluizione ed elettroferogramma relativo al probando #18 in cui è stata identificata la variazione c.1577C>T (cerchiata in rosa) all'interno dell'esone 7.

c.1655T>G→F552C (esone 7)

Questa variazione, come la precedente, deriva da un cambiamento nucleotidico nell'esone 7 (c.1655T>G) (figura 10A), è di tipo missenso (Phe>Cys) e coinvolge un residuo conservato tra le specie (figura 11A), appartenente al quarto dominio *Arm* della proteina.

Anche in questo caso, l'analisi del DNA di 110 soggetti sani, mediante DHPLC, non ha mostrato un profilo cromatografico sovrapponibile a quello del caso indice. La stessa variazione è stata riscontrata anche nel fratello del paziente interessato che, al momento, risulta asintomatico.

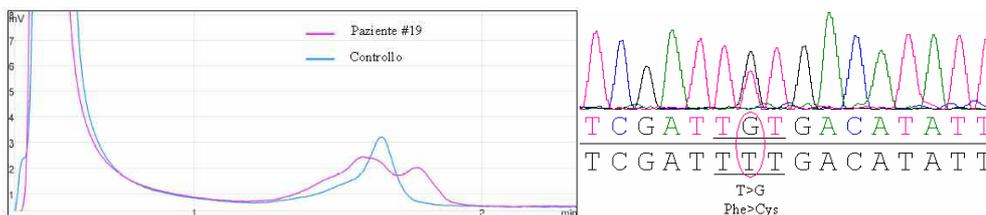


Figura 10A: Elettroferogramma relativo al probando #19 in cui è stata identificata la variazione c.1655T>G (cerchiata in rosa) all'interno dell'esone 7.

	T526M	F552C	
Homo sapiens	LLTLTENIII PF SGW PEGDY PKANGLLDF	D	NP_004563
Mus musculus	LLTLTESVII PF SGW PEGDY PKANGLLDF	D	NP_080439
Rattus norvegicus	LLTLTESVII PF SGW PEGDY PKANGLLDF	D	XP_001065241
Canis familiaris	LLLILTENIII PF SGW PEGDY PKANGLLDF	D	XP_543739
Bos taurus	LLLILTENIII PF SGW PEGDY PKANGLLDF	D	NP_001077198
Gallus gallus	LHTLTEAVLI PC SGW PDRDY PKS SVLPED	D	XP_416362
Xenopus laevis	LKPLTQTIII PS SGW GEGEYSKSSALTDSD	D	NP_001085350

Figura 11A: Allineamento ottenuto con ClustalW di una porzione di sequenza amminoacidica della placofilina 2 in diverse specie; a destra sono riportati i *GenBank Accession numbers*. In giallo e in verde è evidenziata la conservazione dei due residui amminoacidici interessati dalle mutazioni T526M e F552C, rispettivamente.

c.1841T>C→L614P (esone 9)

La sostituzione nucleotidica c.1841T>C è stata individuata all'interno dell'esone 9 nel paziente #41 (figura 12A) e comporta un cambiamento amminoacidico missenso (Leu>Pro) a livello del quinto dominio *Arm* della proteina, in un residuo altamente conservato tra le specie (figura 13A), appartenente al motivo LxNLS caratteristico delle ripetizioni *Arm*. La variazione non è presente nel database dei polimorfismi né in 110 individui sani della popolazione di controllo.

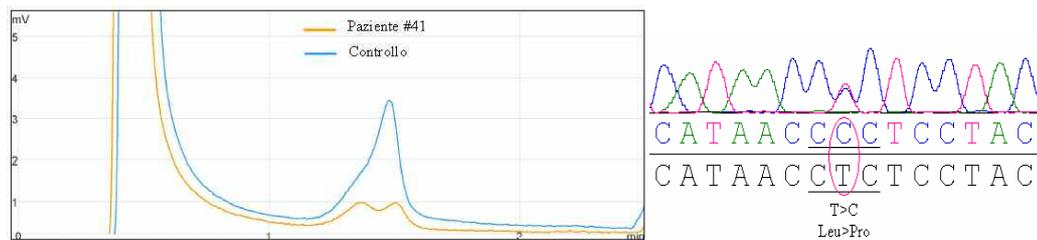


Figura 12A: Profilo di eluizione ed elettroferogramma relativo al probando #41 in cui è stata identificata la variazione c.1841T>C (cerchiata in rosa) all'interno dell'esone 9.

Homo sapiens	KATENCVCILHNLSYQLEAE	NP_004563
Mus musculus	KATENCVCILHNLSYQLEAE	NP_080439
Rattus norvegicus	KATENCVCILHNLSYQLEAE	XP_001065241
Canis familiaris	KATENCVCILHNLSYQLEAE	XP_543739
Bos taurus	KATENCVCILHNLSYQLEAE	NP_001077198
Gallus gallus	KATENCVCILHNLSYQLEVE	XP_416362
Xenopus laevis	KATENCVCILHNLSYQLEAE	NP_001085350

Figura 13A: Allineamento ottenuto con ClustalW di una porzione di sequenza amminoacidica della placofilina 2 in diverse specie; a destra sono riportati i *GenBank Accession numbers*. Il residuo coinvolto dalla mutazione missenso L614P è evidenziato in giallo e appartiene al motivo LxNLS (in fucsia) caratteristico delle ripetizioni *Arm*.

c.2011delC→P671PfsX12 (esone 10)

La mutazione P671PfsX12, determinata dalla delezione di una singola base nell'esone 10 (c.2010delC), è descritta in letteratura (Dalal *et al.*, 2006) ed è stata individuata in due pazienti in seguito ad analisi DHPLC e successivo sequenziamento del DNA. L'alterazione del modulo di lettura, conseguente alla perdita del nucleotide, comporta l'introduzione di un codone di stop prematuro dopo 12 aminoacidi e la proteina predetta risulta trunca a livello del quinto dominio *Arm*.

L'analisi genetica è stata successivamente estesa ai familiari del caso indice risultato portatore della mutazione e in tutti i soggetti analizzati è stata riscontrata la presenza della delezione; dall'indagine clinica dei membri della famiglia è emerso che il padre del paziente è affetto e uno dei due fratelli mostra segni clinici minori compatibili con l'ARVC, mentre l'altro risulta al momento asintomatico (figura 14A).

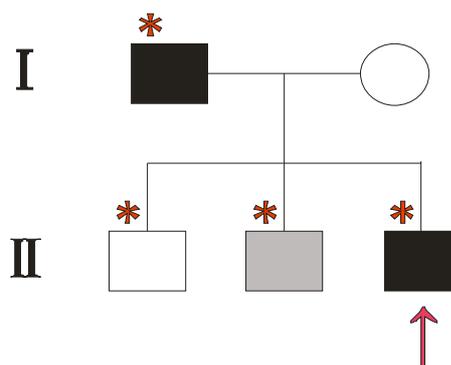


Figura 14A: Albero genealogico relativo alla famiglia del probando #16 (indicato dalla freccia) in cui è stata individuata la mutazione c.2011delC all'interno dell'esone 10 (* = mutazione riscontrata in eterozigosi; mancanza di simbolo = soggetto non indagato). Il colore bianco o nero indica, rispettivamente, un individuo clinicamente non affetto o affetto; il grigio si riferisce alla presenza di segni clinici compatibili con la malattia.

RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE *JUP*

Lo screening per la ricerca di mutazioni nel gene *JUP*, che codifica la Placoglobina, è stato effettuato in 110 pazienti con sintomatologia tipica dell'ARVC/D. L'analisi del gene *JUP* è stata svolta mediante DHPLC e sequenziamento diretto. Il gene *JUP* è costituito da 14 esoni, mentre la proteina corrispondente è costituita da 745 aminoacidi. Lo screening ha individuato due mutazioni nuove, riportate in tabella 4A.

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 5	c.897 A>G	N299S
Esone 8	c.Es8-2 A>T	-

Tabella 4A: Mutazioni riscontrate in 110 pazienti.

Sono stati individuati polimorfismi già noti in letteratura e variazioni ancora ignote ma presenti frequentemente nella popolazione italiana (Tabella 5A).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 1	c.-88 C>T	-	4796702
Esone 3	c.213T>C c.405 C>T c.425 G>A	D71D D136D R142H	7405731 17850807 41283425
Esone 5	c.Es5+6 T>C c.Es5+17 C>T	- -	novo 12942034
Esone 12	c.Es12+22 A>G c.1943 G>A	- V648I	7216034 nuovo
Esone 14'UTR	c.2089 >T	M697L	12937241
Esone 14A	c.2565 C>T	-	4627408

Tabella 5A: Polimorfismi riscontrati nel gene JUP in 110 pazienti.

c.897 A>G→N299S (esone 5)

Il sequenziamento del frammento relativo all'esone cinque in seguito alla presenza di un doppio picco nel profilo cromatografico ha portato all'individuazione della sostituzione N266S nel paziente #35.

Il cambiamento non è radicale dal punto di vista dell'aminoacido, ma tale variazione non è stata riscontrata in 110 individui della popolazione di controllo ed interessa un residuo molto conservato tra i mammiferi (Figura 15A).

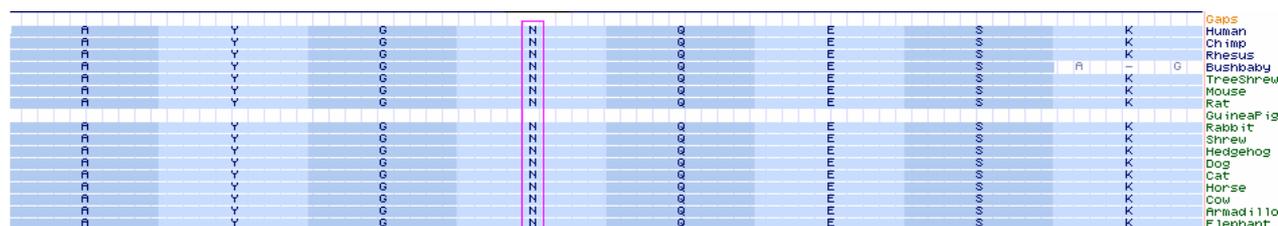


Figura 15A: Allineamento della sequenza aminoacidica della placoglobina contenente la sostituzione aminoacidica N299S nei mammiferi.

Inoltre il paziente in cui tale sostituzione è stata riscontrata risulta negativo per la ricerca di mutazioni negli altri geni noti coinvolti nella cardiomiopatia aritmogena.

c.Es8-2 A>T (esone 8)

L'analisi cromatografica relativa all'amplificato dell'esone otto ha evidenziato la presenza di un doppio picco nel DNA del paziente#22 ed il successivo sequenziamento ha rilevato la presenza della sostituzione c.Es8-2 A>T (Figura 16A).

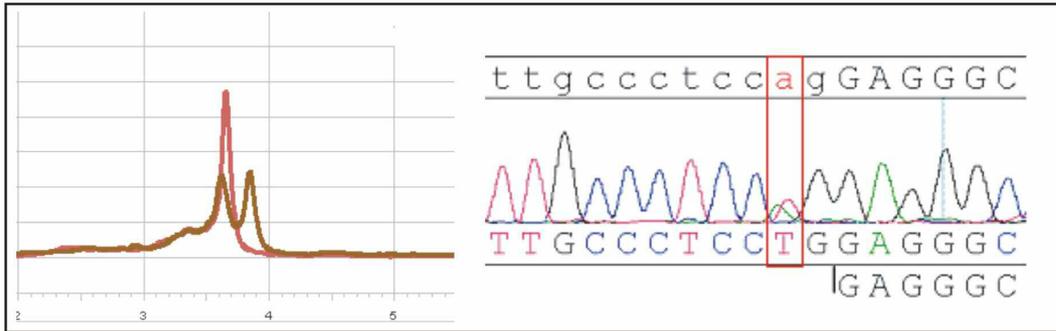


Figura 16A: Profilo cromatografico ed elettroferogramma del paziente con muazione Es8-2 A>T.

La variazione non è stata riscontrata in 110 individui della popolazione di controllo ed interessa il classico dinucleotide si *splicing* AG estremamente conservato tra le specie (Figura 17A).

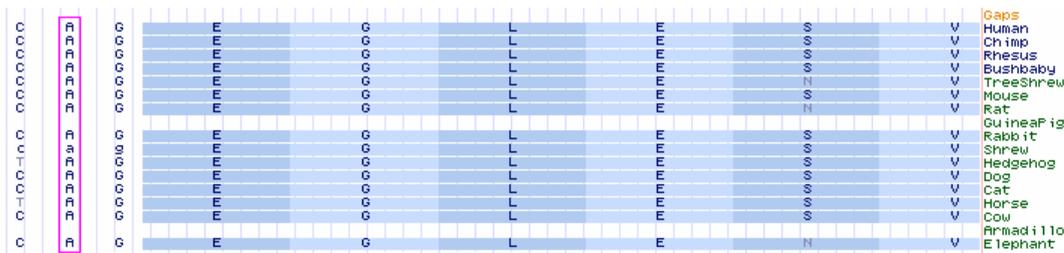


Figura 17A: Allineamento della sequenza nucleotidica della placoglobina contenente la sostituzione Es8-2 A>T nei mammiferi.

Anche in questo caso il paziente non presenta mutazioni negli altri geni noti coinvolti nella cardiomiopatia aritmogena.

Non è stato però possibile effettuare ulteriori analisi per verificare le conseguenze a livello trascrizionale di tale variazione, in quanto la placoglobina non è espressa nei linfociti.

RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE *DSG2*

Il gene *DSG2* è costituito da 15 esoni e codifica l'unica isoforma cardiaca della desmogleina lunga 1118 aminoacidi.

La ricerca di mutazioni è stata condotta mediante DHPLC e sequenziamento diretto in 78 soggetti affetti da cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro.

Sono state riscontrate quattro mutazioni nuove in cinque pazienti (Tabella 6A).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica
Esone 6	c.689 A>G	E230G
Esone 13	c.1912 G>A	G638R
Esone 14	c.2033 G>C	G678A
Esone 15	c.2773 C>T	P925S

Tabella 6A: Mutazioni riscontrate in 78 pazienti nel gene *DSG2*.

L'analisi ha individuato polimorfismi già noti in letteratura e variazioni ancora ignote ma presenti frequentemente nella popolazione italiana (Tabella 7A).

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esone 1	c.Es1+74 C>G	-	nuovo
	c.Es1+114 G>T	-	nuovo
	c.Es1+135 G>T	-	nuovo
Esone 2	c.Es2+86 G>A	-	2276149
	c.Es2+108 C>T	-	9807377
Esone 7+8	c.861 C>T	N287N	2230233
	c.866 A>G	I293V	2230234
	c.Es8+16 C>A	-	3737378
Esone 9	c.Es9+149 G>A	-	nuovo
Esone11	c.Es11+68 T>C	-	nuovo
Esone 14	c.2137 G>A	E713K	nuovo
	c.2318 G>A	R773K	2278792
Esone 15	c.2505 A>G	T835T	1042769
	c.3321 T>C	V1107V	1791235

Tabella 7A: Polimorfismi riscontrati nel gene *DSG2* in 78 pazienti.

c.689 A>G→E230G (esone 6)

Un profilo cromatografico anomalo è stato riscontrato nell'amplificato relativo all'esone 6 nel DNA del paziente #10. Il successivo sequenziamento diretto del frammento ha rilevato la presenza della sostituzione c.689 A>G che porta alla sostituzione aminoacidica missenso E230G.

Un residuo di acido glutammico viene sostituito con uno di glicina, neutro e polare, in una regione molto conservata tra i mammiferi (Figura 18A).

□

Human	I	Y	T	T	S	V	T	L	D	R	E		
Rhesus	I	Y	T	T	S	V	T	L	D	R	E		
Mouse	I	Y	T	T	S	F	T	L	D	R	E		
Dog	I	Y	T	T	S	F	T	L	D	R	E		
Horse	I	Y	T	T	S	V	A	L	D	R	E		
Armadillo	I	Y	A	S	A	-	-	T	T	L	D	R	E

Figura 18A: Allineamento della sequenza aminoacidica della desmogleina-2 contenente la sostituzione aminoacidica E230G nei mammiferi.

Tale variazione non è riportata nel database dei polimorfismi e non è stata riscontrata in 120 individui sani della popolazione di controllo.

c.1912 G>A→G638R (esone 13)

In seguito a sequenziamento dell'amplificato corrispondente all'esone tredici che presentava un profilo cromatografico anomalo rispetto al controllo sia nel paziente #13 che #76, è stata individuata la variazione G638R.

Il cambiamento aminoacidico è drastico in quanto un residuo di glicina neutro e polare viene sostituito con uno di arginino basico in una regione conservata tra i mammiferi (Figura 19A).

□

Mammal Cons	[Conservation bar chart]												
Gaps					9				3				
Human	L	M	C	H	C	G	K	G	A	K	G	F	T
Rhesus	L	M	C	H	C	G	K	G	G	K	G	F	T
Mouse	L	I	C	H	C	G	G	G	A	K	G	F	T
Dog	L	M	C	H	C	G	E	G	A	K	G	F	T
Horse	L	M	C	H	C	G	E	G	A	K	G	F	T
Armadillo	L	T	C	H	S	G	K	G	A	K	G	F	T
Opossum	L	L	C	H	C	G	G	G	A	H	G	F	T

Figura 19A: Conservazione del residuo aminoacidico G638 tra i mammiferi.

Questa sostituzione non risulta presente nel dbSNP e non è stata riscontrata in 120 individui sani della popolazione di controllo.

c.2033 G>C→G678A (esone 14)

Un quadruplo picco è stato individuato nel profilo di eluizione del paziente #77 nell'amplificato relativo all'esone 14, ed il successivo sequenziamento ha rilevato la sostituzione nucleotidica c.2033 G>C che porta alla variazione dissenso G678A (Figura 20A).

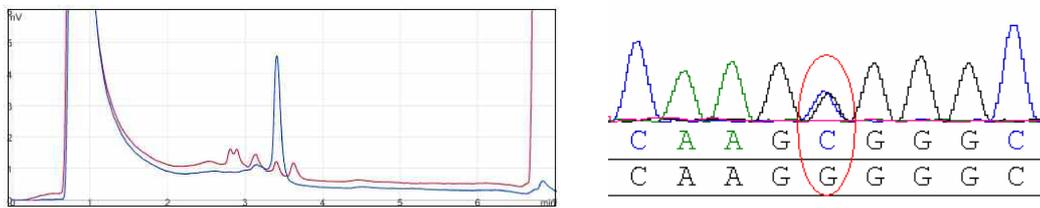


Figura 20A: Profilo di eluizione e risultato del sequenziamento del paziente con sostituzione G678A.

Pur coinvolgendo un aminoacido non conservato in tutte le specie (Figura 21A), questa variazione non è stata trovata in nessuno dei 200 individui sani della popolazione di controllo; inoltre lo stesso aminoacido in posizione 678 risulta essere coinvolto in un cambiamento già noto in letteratura (G678fsX681) (Pilichou et al., 2006) per cui questo potrebbe indicare che tale sito sia suscettibile a mutazione.

human	D	Q	G	G	S	L
mouse	D	H	A	E	S	S
rat	D	H	V	E	N	S
rabbit	D	H	G	E	N	L
dog	D	H	G	E	S	V

Figura 21A: Allineamento che mostra la conservazione dell'amminoacido in posizione 678.

c.2773 C>T→P925S (esone 15)

Un pattern di eluizione anomalo rispetto al controllo è stato rilevato nell'amplificato dell'esone quindici nel paziente #9 ed il successivo sequenziamento del frammento ha rilevato la presenza della sostituzione nucleotidica c.2773 C>T che porta alla variazione missenso P925S.

Tale cambiamento non noto nel database dei polimorfismi non è stato riscontrato in 120 controlli e coinvolge un residuo abbastanza conservato (Figura 22A).

Human	V	S	S	R	Q	A	Q	K	V	A	T	P	L	P
Rhesus	V	S	S	R	Q	A	Q	K	V	A	T	P	L	P
Mouse	V	S	S	R	Q	S	Q	K	V	V	P	P	C	-
Dog	V	S	S	R	Q	G	H	K	V	A	T	L	L	P
Horse	V	S	S	W	Q	G	Q	K	V	P	R	P	L	P
Armadillo	A	S	S	R	H	S	Q	K	V	A	T	P	L	P

Figura 22A: Allineamento che mostra la conservazione dell'amminoacido in posizione 925.

Un residuo di prolina neutro ed idrofobico viene sostituito con uno di serina, neutro e polare.

RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE *DSC2*

Il gene *DSC2* codifica la proteina desmosomale desmocollina di cui esistono due isoforme cardiache chiamate “a” e “b”, prodotte dallo *splicing* alternativo dello stesso gene e che differiscono solo per la lunghezza del dominio C-terminale.

Sono stati sottoposti ad analisi genetica nel gene *DSC2* 22 soggetti affetti da cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro.

Non è stata individuata alcuna mutazione, ma sono stati individuati alcuni polimorfismi già descritti nei database o presenti nella popolazione italiana di controllo (Tabella 8A):

Amplificato	Variazione nucleotidica	Variazione aminoacidica	dbSNP rs#
Esoni 2	c.Es2-155 G>A c.111 A>G	- L37L	28379678 nuovo
Esoni 15	c.2326 A>G c.Es15-22 G>A	I776V -	1893963 1790682

Tabella 8A: Polimorfismi riscontrati nel gene *DSC2* in 22 pazienti.

Nel gene *PKP2* lo screening di mutazioni ha evidenziato la presenza di 8 mutazioni in 9 pazienti di cui sei non ancora note; le sostituzioni missenso individuate in vari esoni (R490W, T526M, F552C, L614P) non sono conservative, in quanto comportano il cambiamento di un amminoacido con un altro chimicamente differente; inoltre, i residui coinvolti sono conservati evolutivamente e localizzati in domini proteici funzionali, come le ripetizioni Arm, che fungono da siti di legame per le altre componenti desmosomali, e il dominio N-terminale, necessario per la corretta localizzazione della proteina a livello della placca desmosomale.

Le variazioni da inserzione/delezione di nucleotidi (T50SfsX60, G322PfsX30, L404LfsX5, P671PfsX12) introducono uno slittamento nel modulo di lettura del gene, determinando l'inserimento di un codone di stop prematuro; la proteina tronca predetta manca di alcuni o tutti i domini Arm, portando ad un effetto più drastico sul prodotto genico.

La ricerca di mutazioni nel gene *JUP* ha portato all'individuazione di 2 mutazioni in 110 pazienti; la prima N299S porta ad un cambiamento non conservativo dell'aminoacido in un dominio molto conservato della proteina, inoltre poiché il paziente che la presenta risulta negativo per la ricerca di mutazioni negli altri geni noti associati all' ARVC potrebbe avere un ruolo nella patogenesi della malattia.

La variazione intronica c.Es8-2 A>T, interessa il classico dinucleotide di *splicing* AG, molto conservato tra i mammiferi. Non è stato possibile però verificare le conseguenze a livello trascrizionale di questa variazione poiché la placoglobina non risulta espressa nei linfociti.

Anche in questo caso il paziente in cui la variazione è stata riscontrata risulta negativo per la ricerca di mutazioni negli altri geni noti associati all' ARVC.

L'analisi genetica nel gene *DSG2* ha rilevato la presenza di 4 mutazioni nuove in 5 pazienti.

Si tratta in tutti i casi (E230G, G638R, G678A e P925S) di variazioni missenso che interessano aminoacidi conservati tra i mammiferi, situati in particolari domini funzionali della proteina. La prima cade nel secondo dominio extracellulare della desmogleina-2 deputato al legame cellula-cellula calcio-dipendente; G638R e G678A interessano invece il dominio di ancoraggio intracellulare; infine P925S si trova nel dominio LD che insieme ad altri domini

situati nella porzione C-terminale, sembra determinare ruoli specifici delle desmogleine nell'assemblaggio e organizzazione dei desmosomi (Dusek et al., 2006).

La ricerca di mutazioni nel gene *DSC2* non ha portato alla rilevazione di alcuna mutazione in 22 pazienti.

Secondo i dati della letteratura, in pazienti affetti da cardiomiopatia aritmogena, il gene *PKP2* ha una frequenza di mutazione del 26%, il gene *DSG2* del 10% mentre i geni *JUP* e *DSC2* risultano raramente interessati da mutazioni.

Dallo screening effettuato, il gene *PKP2* è risultato mutato in 9/44 pazienti con una frequenza del 20%, il gene *JUP* in 2/110 (1.8%), il gene *DSG2* in 5/78 pazienti (6.4%) mentre il gene *DSC2* in nessuno dei 22 soggetti analizzati.

Queste frequenze tuttavia danno solo una stima suggestiva della distribuzione delle mutazioni nei quattro geni considerati; infatti, contrariamente a quelle riportate nello studio descritto sulla cardiomiopatia ipertrofica, non possono essere considerate indicative della effettiva distribuzione nella popolazione, poiché lo studio non ha riguardato un singolo gruppo di casi selezionati, ma una serie di pazienti il DNA dei quali in qualche caso era già stato sottoposto a screening per alcuni geni implicati nella cardiomiopatia aritmogena, in altri non era stato mai indagato. I risultati saranno disponibili alla fine della ricerca che è attualmente ancora in corso.

BIBLIOGRAFIA

- Bonne S., Gilbert B., Hatzfeld M., Chen X., Green K.J., van Roy F.
Defending desmosomal plakophilin-3 interactions. *Journal of Cellular Biology* 2003, 161: 403-416.
- Dalal D, Molin LH, Piccini J, Tichnell C, James C, Bomma C, Prakasa K, Towbin JA, Marcus FI, Spevak PJ, Bluemke DA, Abraham T, Russell SD, Calkins H, Judge DP. Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2. *Circulation* 2006; 113:1641-9.
- Gerull B., Heuser A., Wichter T., Paul M., Basson C.T., McDermott D.A., Lerman B.B., Markowitz S.M., Ellinor P.T., MacRea C.A., Peters S., Grossmann K.S., Drenckhahn J., Michely B., Sasse-Klaassen S., Birchmeier W., Dietz R., Breithardt G., Schulze-Bahr E., Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nature Genetics* 2004, 36: 1162-1164.
- Getsios S., Huen A.C., Green K.J. Working out the strength and flexibility of desmosome. *Nature Review Molecular cell biology* 2004, 5: 271-281.
- Indik J.H., Marcus F.I. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Displasya. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal* 2003, 3: 148-156.
- Leung C.L., Green K.J., Liem R.K. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends in Cell Biology* 2002, 12: 37-45.
- Marcus F.I., Fontaine G.H., Guiraudon G., Frank R., Laurenceau J.L., Malergue C., Grosoguet Y. Right ventricular dysplasia : a report of 24 adult cases. *Circulation* 1982, 65: 384-398.

Pilichou K., Nava A., Basso C., Beffagna G., Baucé B., Lorenzon A., Frigo G., Vettori A., Valente M., Towbin J., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2006, 113: 1171-1179.

Whitlock N.R. Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six distinct genes: characterization of mouse DSG4, DSG5 and DSG6. *The journal of investigative dermatology* 2003, 120: 970-980.