



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA**  
**SETTORE BIO-09**  
**CICLO XXVIII**

Tesi di Dottorato di Ricerca

**RICERCA DI MUTAZIONI NEL CANALE  
PACEMAKER HCN4 IN PAZIENTI AFFETTI DA  
DISTURBI DEL RITMO CARDIACO**

Dottorando: Dott.ssa Raffaella Milanese  
Matricola: R10116

Tutor: Prof. Dario DiFrancesco  
Dipartimento di Bioscienze  
Università degli Studi di Milano

Coordinatore: Prof. Michele Mazzanti

Anno Accademico 2014-2015

*Alla mia famiglia di ieri e di oggi*

<b>Abstract</b> .....	1
<b>Riassunto</b> .....	3
<b>Introduzione</b> .....	5
• Autoritmicità del cuore.....	5
• La corrente <i>I<sub>f</sub></i> nella fase di depolarizzazione diastolica lenta.....	7
• Principali patologie associate al ritmo cardiaco.....	8
• I canali HCN.....	12
• Proteine regolatrici dei canali HCN.....	17
• Mutazioni in hHCN4 ed alterazioni del ritmo cardiaco.....	18
• Sequenziamento di nuova generazione (NGS).....	21
<b>Scopo del lavoro</b> .....	23
<b>Materiali e metodi</b> .....	24
• Estrazione e quantificazione del DNA.....	24
• Amplificazione ed analisi del DNA.....	27
• Analisi dei frammenti amplificati.....	32
• Single-strand conformation polymorphism (SSCP).....	32
• Sequenziamento.....	35
• Mutagenesi e studi di espressione in vitro.....	36
• Exome sequencing.....	45
<b>Risultati</b> .....	50
<b>Discussione</b> .....	69
<b>Bibliografia</b> .....	81

## **ABSTRACT**

Cardiovascular diseases are widespread and they are a major cause of death in the western part of the world. Therefore, identifying their causes precisely with the aim of establishing a preventive and therapeutic strategy has become subject of research also for their social and economic impact. Many studies have now clearly established that the genetic characteristics of a person can be a background predisposing to the onset of various diseases including cardiac arrhythmias.

For example, various mutations in genes that code for ion channels are known and their accessory proteins that lead to the development of heart diseases such as the long QT syndrome and bradycardia. My laboratory of the PhD has shown a correlation between a specific mutation in the hHCN4 (Hyperpolarization-activate Cyclic Nucleotide-gated channel) and sinus bradycardia. The screening is a part of research of monogenic diseases and in particular the focus is on genes directly involved in the genesis of the rhythm (HCN channels) and on interacting proteins (CAV3, MiRP1, FLNA). In my thesis I performed a genetic screening in order to identify polymorphisms and mutations in the gene encoding for the hHCN4 pacemaker channel. The HCN4 protein channel is an isoform of the HCN family responsible of the  $I_f$  current. This channel is more expressed at the level of the sinus node, an anatomical region of the heart in which the source of the heart rhythm is located. SAN (sinus atrial node) cells are able to generate action potentials in an autonomous way that spread through the conduction system allowing the contraction of the heart. The current  $I_f$  plays a key role in the slow diastolic depolarization phase, where it leads the membrane potential to threshold values for a new action potential. The heart rate is determined by the duration of the diastolic depolarization phase: the principal current responsible is the  $I_f$  current. The genetic analysis was performed on the gene coding for the channel hHCN4 in patients with cardiac arrhythmias (sinus bradycardia, sinus tachycardia and atrial fibrillation) in order to identify genetic mutations causally related to the pathological phenotype. Among the

various polymorphisms we found, the attention was focused on the R524Q mutation in HCN4, identified in patients of the same family with inappropriate sinus tachycardia (IST): it is a non-conservative missense mutation in heterozygosis (located on exon 4, position 1571G> A mRNA, codon CGG in CAG). R524 is located in the initial part of the C-linker, an important region which connects the last transmembrane domain (S6) to CNBD and which has a function in modulating channel gating. To test whether the R524Q polymorphism affects biophysical properties of the HCN4 pacemaker channel and consequently determines sinus tachycardia in patients carrying the mutation, we conducted electrophysiological experiments in heterologous cells (HEK 293) transfected with plasmids expressing the gene respectively hHCN4 wild type, mutated homozygous and heterozygous (hHCN4 coexpression of plasmids with wild-type and mutated hHCN4 homozygous).

In some families that have inheritance of the disease, it was not possible to identify a mutation in HCN4. In collaboration with a specialized center that employs NGS (New Generation Sequencing) technology, the screening has been extended to other genes involved in heart disease. We selected two families: the first with bradycardia and atrial fibrillation, and the second with atrial fibrillation and tachycardia. The first experiments on probands have led to the identification of mutations that will be interesting to investigate in the future. In a vitro system we characterized the I57T mutation found in MiRP1, identified in the second family.

## RIASSUNTO

Le patologie cardiovascolari sono ampiamente diffuse e costituiscono una delle principali cause di morte nel mondo occidentale. Per il loro impatto socio-economico sono quindi oggetto di ricerche volte a identificarne con precisione le cause con il fine di stabilire una strategia terapeutica e preventiva. Molte ricerche hanno ormai chiarito come le caratteristiche genetiche di un soggetto possano costituire un background predisponente all'insorgenza di varie patologie tra cui le aritmie cardiache.

Ad esempio sono note varie mutazioni in geni che codificano per canali ionici e loro proteine accessorie che portano allo sviluppo di patologie cardiache come la sindrome del QT lungo e di bradicardia. Il laboratorio in cui ho svolto il dottorato ha dimostrato la correlazione tra una specifica mutazione riscontrata nel gene hHCN4 (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel) e la bradicardia sinusale familiare. Il mio lavoro di screening si inserisce nel contesto di ricerca delle patologie monogeniche ed in particolare l'attenzione è rivolta a geni direttamente coinvolti nella genesi del ritmo (canali HCN) e a proteine interagenti (CAV3, MiRP1, FLNA). Nel mio lavoro di tesi è stato effettuato uno screening genetico con lo scopo di identificare polimorfismi e/o mutazioni nel gene codificante per il canale pacemaker hHCN4. La proteina canale HCN4 è un'isoforma della famiglia HCN responsabile della corrente If; questo canale risulta maggiormente espresso a livello del nodo senoatriale, una regione anatomica del cuore in cui è situata la sorgente del ritmo cardiaco. Le cellule del NSA infatti sono in grado di generare potenziali d'azione in maniera autonoma, che si diffondono attraverso il sistema di conduzione permettendo la contrazione del cuore. La corrente If svolge il suo ruolo fondamentale nella fase di depolarizzazione diastolica lenta, dove porta il potenziale di membrana ai valori soglia per la formazione del potenziale d'azione. La frequenza cardiaca è determinata dalla durata della fase di depolarizzazione diastolica delle cellule del nodo senoatriale di cui la principale corrente responsabile è la corrente pacemaker If. L'analisi genetica è stata effettuata sul gene codificante per il canale hHCN4 in

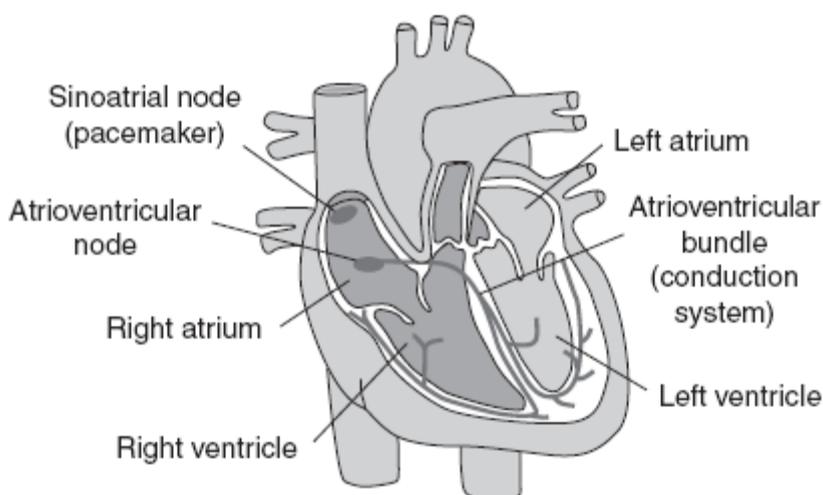
pazienti affetti da aritmie cardiache (bradicardia sinusale, tachicardia sinusale e fibrillazione atriale) al fine di individuare mutazioni genetiche correlate causalmente al fenotipo patologico. Tra i vari polimorfismi trovati l'attenzione è stata concentrata sulla mutazione R524Q della proteina HCN4, riscontrata in pazienti della stessa famiglia affetti da tachicardia sinusale inappropriata (TSI): si tratta di una mutazione missenso non conservativa in eterozigosi (collocata sull'esone 4, posizione 1571G>A dell'mRNA, codone CGG in CAG). R524 si trova nella parte iniziale del C-linker, importante regione che collega l'ultimo dominio transmembrana (S6) al CNBD e che ha una funzione modulatrice nel gating del canale. Per verificare se il polimorfismo R524Q influisce sulle proprietà biofisiche del canale pacemaker HCN4 e determina conseguentemente tachicardia sinusale nei pazienti portatori della mutazione, sono stati condotti esperimenti di elettrofisiologia su cellule eterologhe (HEK 293) trasfettate con plasmidi esprimenti rispettivamente il gene hHCN4 wild type, mutato in omozigosi ed in eterozigosi (coespressione di plasmidi con hHCN4 wild type e con hHCN4 mutato in omozigosi).

In alcune famiglie che presentano ereditarietà della patologia, non è stato possibile identificare una mutazione in HCN4. Con la collaborazione di un centro specializzato che impiega la tecnologia NGS (new generation sequencing) lo screening è stato ampliato ad altri geni coinvolti in patologie cardiache. Sono state selezionate due famiglie: la prima è composta da persone affette da bradicardia e fibrillazione atriale e la seconda da persone che presentano tachicardia e fibrillazione atriale. I primi esperimenti condotti sui probandi hanno portato all'identificazione di alcune mutazioni che in futuro sarà interessante indagare. Per ora è stata caratterizzata dal punto di vista elettrosiologico in un sistema in vitro la mutazione I57T trovata in MiRP1, identificata nella seconda famiglia.

# INTRODUZIONE

## *Autoritmicità del cuore*

Nei mammiferi l'origine e la regolazione del ritmo cardiaco hanno luogo nel nodo seno-atriale (NSA), che è una struttura specializzata localizzata nella parete posteriore dell'atrio destro in corrispondenza dello sbocco delle vene cave superiore ed inferiore (fig. 1). All'interno di questa regione sono presenti dei miociti specializzati, detti cellule pacemaker, dotati di particolari caratteristiche fisiologiche che permettono loro di generare spontaneamente e ritmicamente i potenziali d'azione. Grazie alla presenza di giunzioni comunicanti tra cellula e cellula (gap junctions), gli stimoli elettrici generati dalle cellule pacemaker si propagano al resto del cuore: l'onda di eccitazione diffonde velocemente (1m/s) ed in modo concentrico dal NSA agli atri, causandone la contrazione (sistole atriale). In seguito raggiunge il nodo atrio-ventricolare (NVA), unico punto di contatto elettrico tra gli atri ed i ventricoli e da qui si propaga al setto interventricolare attraverso delle fibre di conduzione specializzate appartenenti al fascio di His. Queste si continuano con le fibre del Purkinje, le quali formano una rete che permette la propagazione dell'impulso elettrico dall'apice alla base dei ventricoli, determinandone la contrazione (sistole ventricolare).



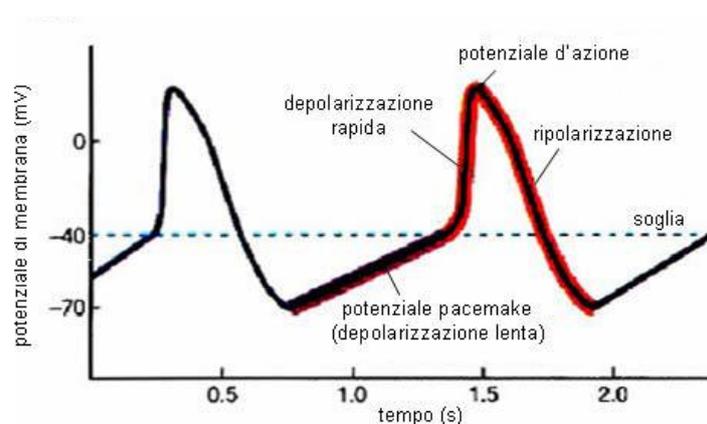
**Figura 1:** Posizione del nodo seno-atriale nel sistema di conduzione cardiaco

Il ritmo di contrazione imposto dal nodo seno-atriale è detto sinusale e corrisponde nel cuore umano ad una frequenza cardiaca compresa tra 60 e 100 battiti al minuto (bpm). In particolari condizioni patologiche in cui il NSA non è in grado di assolvere alla funzione di pacemaker, il cuore continua comunque a battere, anche se a ritmi notevolmente inferiori (40/60 bpm), grazie alla presenza di pacemaker ectopici, o ausiliari, rappresentati dal nodo atrio-ventricolare e dalle fibre del Purkinije. Il ritmo di questi pacemaker ectopici presenta un'attività che è intrinsecamente più lenta e pertanto viene di norma oscurata da quella del NSA.

I miociti cardiaci, essendo accoppiati elettricamente, formano un sincizio elettrico in cui quelli dotati di una frequenza più elevata impongono il proprio ritmo agli altri. L'instaurarsi di un ritmo ectopico non sinusale rappresenta un meccanismo salva vita nelle patologie in cui la funzionalità del nodo del seno è compromessa.

I miociti cardiaci possono essere distinti in: cellule autoritmiche (pacemaker) ed in cellule la cui funzione primaria è quella di contrarsi (miociti atriali e ventricolari).

Essi differiscono sia nella forma del potenziale d'azione, sia nelle correnti ioniche implicate nella generazione dello stesso potenziale, in quanto svolgono un diverso ruolo fisiologico.



**Figura 2:** Potenziale d'azione di una cellula seno-atriale

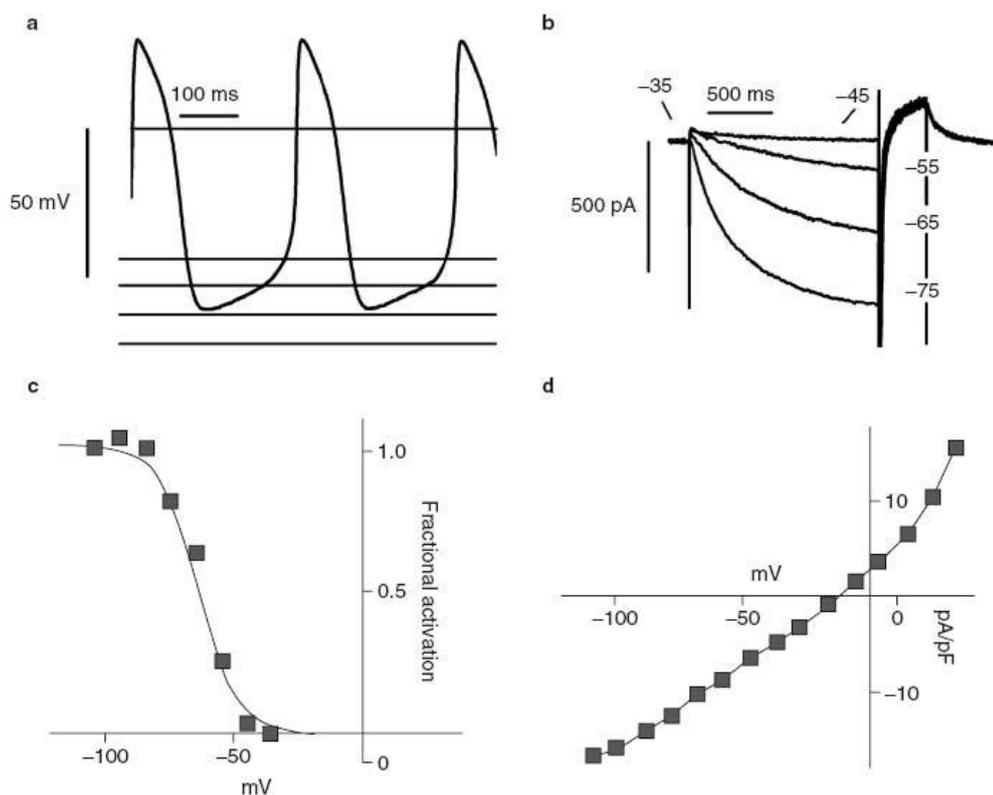
Tra le caratteristiche che contraddistinguono i potenziali d'azione generati dalle cellule pacemaker si trovano: la presenza di una fase di depolarizzazione diastolica lenta (o pacemaker) che porta il potenziale di membrana fino al valore soglia (-40 mV) per innescare il potenziale d'azione successivo; una fase di depolarizzazione rapida generata dalla corrente di  $\text{Ca}^{2+}$  entrante e l'assenza della fase di plateau, coerentemente con il fatto che esse non hanno un ruolo rilevante nel processo di contrazione e questa evidenza è confermata anche dalla scarsa organizzazione in sarcomeri di tali cellule.

### ***La corrente $I_f$ nella fase di depolarizzazione diastolica lenta***

La fase di depolarizzazione lenta sta alla base della generazione di potenziali d'azione ripetuti e quindi dell'autoritmicità delle cellule pacemaker. Attualmente è largamente riconosciuto che tra i vari processi cellulari che contribuiscono alla depolarizzazione diastolica lenta, la corrente  $I_f$  svolge un ruolo determinante. Tali proprietà sono:

- attivazione in iperpolarizzazione,
- cinetica di lenta attivazione e deattivazione,
- corrente mista di ioni  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  che determina un potenziale di inversione della corrente a circa -10/-20 mV.

La corrente  $I_f$  è stata inizialmente descritta nel nodo seno-atriale, dove ha una soglia di attivazione attorno ai -40/-45 mV e dove la metà dei canali sono aperti tra -65 e -70 mV (DiFrancesco, 1986). Sebbene essa assolva il ruolo fisiologicamente più importante a livello del NSA, è presente anche in altre cellule del sistema di conduzione che sono in grado di generare potenziali d'azione spontanei (miociti atrioventricolari, miociti delle fibre del Purkinje), dove si attiva a potenziali più negativi rispetto ai miociti senoatriali.



**Figura 3:** Illustrazione delle proprietà elettriche della corrente  $I_f$  espressa nel NSA: (a) potenziali d'azione spontanei registrati in un miocita del NSA di coniglio; (b) registrazione della corrente  $I_f$  a vari livelli di iperpolarizzazione; (c) curva di attivazione della corrente  $I_f$  ottenuta da un singolo miocita seno-atriale; (d) relazione tra voltaggio e corrente (completamente attivata) misurata in una singola cellula pacemaker.

### ***Principali patologie associate al ritmo cardiaco***

Il ritmo di contrazione cardiaco è generato dal NSA ed è detto ritmo sinusale. Normalmente nell'uomo adulto il ritmo oscilla tra i 60 e i 100 battiti per minuto (bpm), mentre diminuisce durante il sonno o aumenta durante lo sforzo fisico (può superare i 200 bpm, con un valore massimo dipendente dall'età). Esistono inoltre altri distretti cardiaci, quali il NAV e le fibre del Purkinje, capaci di generare il ritmo (detto ritmo ectopico o non sinusale) che possono intervenire, anche se a una frequenza minore, in caso di interruzione del ritmo sinusale.

Le alterazioni della fisiologia del ritmo (aritmie) sono piuttosto diffuse nella popolazione e si pensa che la loro origine possa essere dovuta a fattori ambientali e/o genetici. Si definiscono aritmie le alterazioni della

formazione e/o conduzione dell'impulso: questo si può generare in sedi diverse dal nodo del seno, nascere con una frequenza diversa o essere condotto in modo anomalo. Le aritmie possono essere suddivise in base all'effetto sulla frequenza: è possibile distinguere tachiaritmie (caratterizzate da una frequenza cardiaca aumentata) e le bradiaritmie (caratterizzate da una riduzione della frequenza cardiaca).

Le aritmie si manifestano generalmente con palpitazioni e pause nel normale ciclo cardiaco; meno comunemente mostrano sincopi, angina, insufficienza cardiaca o morte. Includono extrasistoli, fibrillazione atriale, tachicardie, bradicardie e blocchi di conduzione, sindrome del QT lungo.

La *bradiaritmia*, ossia quella condizione in cui vi è una riduzione del battito cardiaco (la condizione di bradicardia è data da una frequenza cardiaca inferiore a 60 bpm) può essere spiegata da due diversi meccanismi: il primo riguarda una disfunzione nella generazione dell'impulso a livello del nodo seno atriale, ed è comune nella vecchiaia, perché il tessuto autoritmico diventa fibrotico. Il secondo meccanismo, invece, prende in considerazione la mancata propagazione dell'impulso dal NSA a tutto il cuore: se questo meccanismo è in qualche modo alterato si arriva ad avere dei blocchi a vari livelli.

Una tipologia di bradiaritmia è la bradicardia sinusale: si tratta di una patologia in cui la frequenza cardiaca si abbassa drasticamente al di sotto dei 60 bpm; in un lavoro del 2006 del nostro laboratorio, è stata identificata una mutazione missenso in eterozigosi (S672R) nel canale HCN4 associata a bradicardia asintomatica familiare. La mutazione risulta essere autosomica dominante e nei 27 individui affetti la frequenza cardiaca media è di 52,2 bpm, mentre nei sani è di 73,2 bpm. (Milanesi et al., 2006)

Le *tachiaritmie*, ossia le condizioni in cui vi è un aumento del ritmo cardiaco, invece, comprendono una serie di sottogruppi con fenotipo più o meno grave. Tra i principali ricordiamo la tachicardia sinusale fisiologica e la tachicardia sinusale inappropriata.

Nella tachicardia sinusale fisiologica si assiste ad un'aumentata attività del NSA in risposta ad uno stress fisiologico ed è caratterizzata da un

aumento della pendenza nella fase di depolarizzazione nelle cellule del nodo del seno. La tachicardia sinusale inappropriata è una sindrome caratterizzata da ritmo sinusale molto veloce a riposo o con una attività fisica minima, o in entrambe le condizioni. Si presenta con sintomi quali palpitazioni, debolezza, fatica, vertigini e sincope. Spesso il ritmo è accelerato dopo un minimo esercizio fisico e il recupero del battito cardiaco è estremamente lungo. Mentre la tachicardia sinusale fisiologica, è spesso una condizione reversibile e transiente, con cause identificabili, la tachicardia sinusale inappropriata è una condizione che perdura a lungo e non è facilmente spiegabile. Non esiste uno specifico intervallo di frequenza cardiaca per i pazienti con tachicardia sinusale inappropriata, ma in genere essi presentano un ritmo sinusale di più di 100bpm al minuto, e nell'arco di 24 ore una media più alta di 90 bpm/min, non spiegabili da esigenze fisiologiche o da condizioni comunemente conosciute aumentare il ritmo cardiaco (caffaina, attività fisica, ecc.).

Per quanto riguarda l'epidemiologia della malattia, non ci sono dati certi in questo campo, e la maggior parte dei pazienti sono generalmente giovani donne. Gli episodi vengono manifestati improvvisamente e persistono per mesi o anni. La prognosi è solitamente benigna e le conseguenze a lungo termine sono poche; anche quelle segnalate in letteratura sono altrettanto esigue e il follow-up è limitato; la tachicardia sinusale inappropriata è raramente associata a cardiomiopatia indotta da tachicardia. (Olshanky et al., 2013)

La *fibrillazione atriale* (FA) è il più comune tipo di aritmia cardiaca ed è associata a una mortalità data da un'alterata emodinamica, progressive disfunzioni atriali e ventricolari e complicazioni trombo-emboliche. Si tratta di una condizione che affligge, secondo le stime, l'1-2% della popolazione generale europea e statunitense, ed è risultata in netta crescita dagli anni '90 ad oggi. È stato dimostrato che il fattore determinante dell'aumento della prevalenza di FA è l'innalzamento dell'età media. I fattori di rischio principali sono l'età e il sesso: infatti gli uomini hanno una probabilità 1.5 volte più alta di sviluppare un FA. Naturalmente, pregresse malattie o disfunzioni che affliggono il sistema

cardiovascolare non possono che essere fattori di rischio; anche l'esercizio fisico intenso, obesità, fumo di tabacco, consumo di alcol sono fattori di rischio comprovati.

I sintomi tipici della fibrillazione atriale sono simili a quelli di altre aritmie, e comprendono palpitazioni, debolezza, fatica, confusione, respiro accorciato, dolori al petto.

Il meccanismo patogenetico dell'FA è molto complesso e vi prendono parte una molteplicità di fattori che interagiscono tra loro tra cui la presenza di un focus ectopico in grado di generare impulsi indipendentemente dal NSA e blocchi o ritardi nella conduzione del segnale;

Nella maggior parte dei casi la fibrillazione atriale si presenta in concomitanza con altre malattie cardiache, ad esempio disfunzioni valvolari o insufficienza cardiaca; tuttavia in una percentuale di pazienti, circa 10-30%, non è possibile riscontrare in altre patologie la causa della FA: negli ultimi decenni si è presa in considerazione anche la possibilità che questa disfunzione sia correlata a mutazioni in geni codificanti proteine essenziali per la stabilità cardiaca, soprattutto nei canali ionici.

La *sindrome del seno malato* (Sick-Sinus Syndrome, SSS) è comunemente indicata per identificare varie condizioni patologiche legate alla incapacità del nodo del seno di generare frequenze cardiache che sono appropriate per i bisogni fisiologici di un individuo. I pazienti con SSS spesso presentano intolleranza all'esercizio, presincope o sincope per cui una corretta diagnosi rappresenta un'indicazione importante che prevede in circa il 50% dei casi un eventuale impianto di pacemaker.

Spesso disfunzioni del nodo del seno sono la conseguenza di una degenerazione strutturale o di un processo di rimodellamento dovuto a condizioni patologiche come la fibrillazione atriale, bradicardia sinusale, arresto sinusale, blocchi seno-atriali o periodi alternati di bradicardia e tachicardia. La maggior parte di queste disfunzioni è dovuta ad una degenerazione idiopatica del nodo del seno, specialmente in soggetti più anziani, oppure all'azione di agenti farmacologici. Inoltre sono stati descritti vari casi di famiglie con sindrome del seno malato a carattere ereditario (Barak et al., 2001).

## ***I canali HCN***

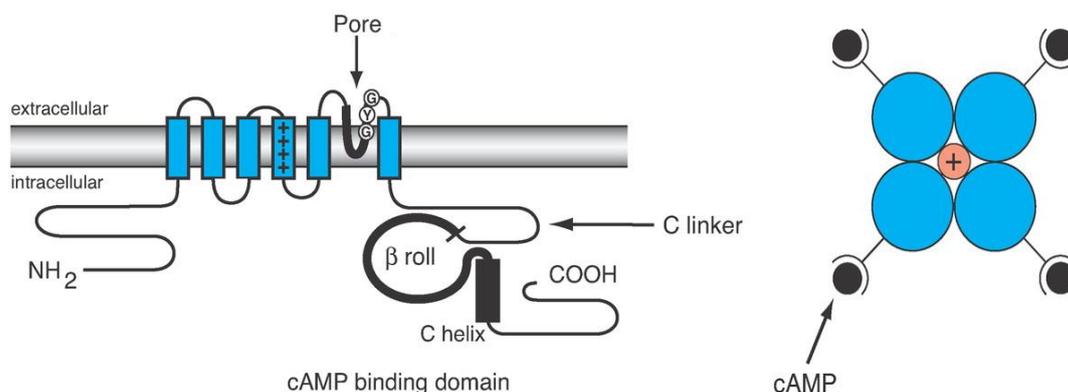
Un'analisi completa della presenza e della distribuzione della proteina HCN4 (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel) nel NSA è stata effettuata in un modello animale evidenziando una correlazione tra i livelli di espressione della proteina HCN4 e l'attività pacemaker (Brioschi et al., 2009). In particolare, come dimostrato tramite esperimenti di immunofluorescenza e di elettrofisiologia, l'espressione della proteina HCN4 è maggiore nella regione corrispondente alla porzione centrale del NSA mentre risulta meno abbondante man mano che ci si sposta verso la periferia. Questi risultati, in unione con il fatto che l'isoforma HCN4 risulta abbondantemente presente anche nel NSA nell'uomo, possono far concludere che questa proteina costituisce un marker molecolare delle cellule pacemaker del NSA. L'identificazione dei costituenti molecolari della corrente pacemaker (Santoro et al., 1998,) ed in particolare di HCN4 ha portato quindi ad ipotizzare che la presenza di mutazioni nella sequenza codificante di questo gene contribuisce, direttamente o indirettamente, allo sviluppo di quelle particolari forme di alterazioni del ritmo con causa non ancora identificata.

I geni che codificano per i costituenti molecolari della corrente "funny" sono stati clonati verso la fine degli anni '90 (Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1998). Sono i canali HCN e presentano due caratteristiche biofisiche fondamentali: la dipendenza di voltaggio e la modulabilità da parte dei nucleotidi ciclici.

In tutti i modelli animali finora studiati, sono state identificate quattro isoforme di canali HCN (HCN 1-4); nell'uomo i geni che codificano per queste quattro isoforme mappano su cromosomi diversi (Vaccari et al., 1999):

- *Hcn1* : cromosoma 5p12
- *Hcn2* : cromosoma 19p13.3
- *Hcn3* : cromosoma 1q22
- *Hcn4* : cromosoma 15q24-25

Studi di cristallografia a raggi X condotti su omologhi dei canali HCN suggeriscono che la forma attiva del canale sia costituita da quattro proteine che si assemblano tridimensionalmente generando un poro. Il canale ionico, una volta formato, permette il passaggio di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  attraverso la membrana.



**Figura 4:** A sinistra è indicata la topologia a livello della membrana di una singola subunità del canale HCN: i segmenti transmembrana S1-S6 (rettangoli azzurri), il segmento carico positivamente S4, il loop contenente la sequenza GYG formante il poro, il C-linker della regione carbossi-terminale, seguito da un dominio CNBD di 120 aminoacidi che consiste in un dominio  $\beta$ -roll e C-elica. Le estremità amino e carbossi terminali sono scarsamente conservate tra le isoforme. A destra schema dell'organizzazione tetrameriche del canale con indicati i quattro nucleotidi ciclici (cerchi neri) che si legano al canale promuovendone l'apertura.

La struttura di ogni subunità è caratterizzata dalla presenza di una regione transmembrana, di una regione N-terminale e di una C-terminale; quest'ultime sono entrambe rivolte verso l'ambiente intracellulare (Figura 4).

La regione transmembrana conferisce al canale caratteristiche fondamentali come la capacità di stabilizzarsi in membrana, la responsività a variazioni di voltaggio e la capacità di condurre specie ioniche. Tale regione è costituita da sei domini ad  $\alpha$ -elica (S1-S6) connessi da loop idrofilici disposti ad ansa che si affacciano sia sul versante interno sia sul versante esterno della cellula. Le caratteristiche idrofobiche delle porzioni transmembrana stabilizzano il canale in membrana grazie ad interazioni con la componente apolare del doppio strato lipidico.

I segmenti S5 e S6 ed il tratto compreso tra questi, chiamato segmento P, costituiscono la parete del poro del canale. Il segmento P presenta una

tripletta conservata nelle quattro isoforme della proteina costituita dagli amminoacidi glicina-tirosina-glicina (G-Y-G) e responsabile del filtro di selettività ionica. Il segmento S4 rappresenta la porzione del canale adibita a sensore del voltaggio. La capacità di questa struttura di rilevare cambiamenti nel potenziale di membrana è collegata alla presenza di amminoacidi carichi positivamente (due lisine, sette arginine e due istidine) che risentirebbero dello stimolo di iperpolarizzazione facilitando la transizione del canale verso lo stato aperto.

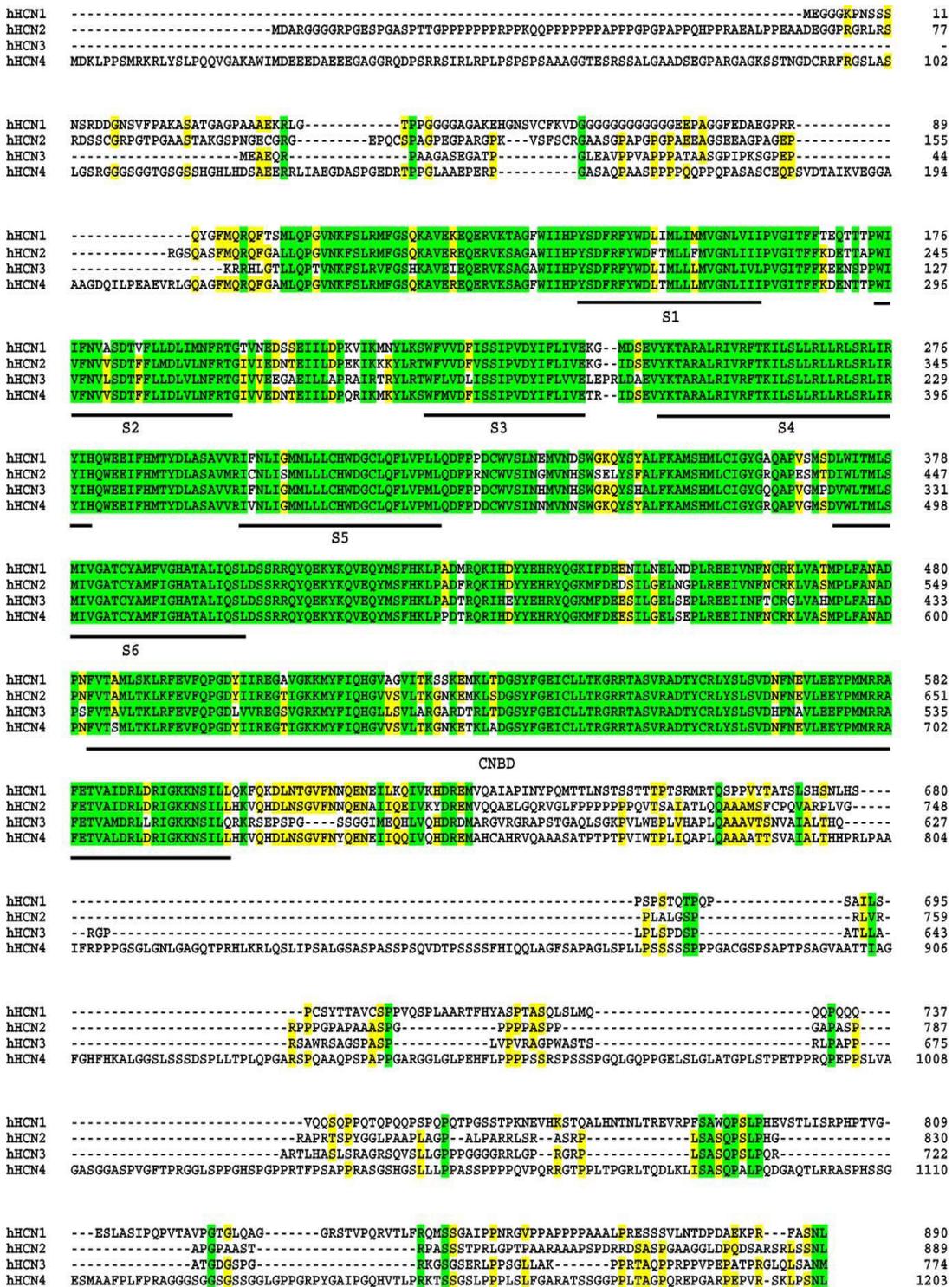
La porzione prossimale C-terminale media la regolazione dei canali HCN da parte dei nucleotidi ciclici cAMP e cGMP (Figura 4). Questa regione è caratterizzata dalla presenza del dominio CNBD (Cyclic Nucleotide Binding Domain) (costituito da circa 120 aa e con struttura a  $\beta$ -roll) e da una regione C-linker che connette il CNBD al segmento S6 (di circa 80 aa). Un modello (Craven et al., 2006) suggerisce che, in assenza di cAMP, il CNBD si comporta come un dominio strutturale autoinibitorio: tale fenomeno sembra essere dovuto all'interazione con il C-linker che limita la capacità del canale ad aprirsi in risposta alle variazioni di voltaggio. Al contrario, il legame del cAMP al CNBD, ne promuove variazioni conformazionali in grado di trasferirsi al C-linker e da qui ad altre regioni del canale, modificandone la struttura quaternaria e rimuovendo la restrizione imposta dall'interazione CNBD-C-linker.

La porzione distale C-terminale a valle del dominio CNBD, può essere coinvolta nel legame di numerose proteine scaffold che controllano il trafficking del canale attraverso i compartimenti subcellulari e, in particolari cellule, possono guidarne l'espressione in membrana (Biel et al., 2009).

La porzione N-terminale, infine, sembrerebbe conferire alle subunità del canale la capacità di tetramerizzare, requisito fondamentale per costituire un canale attivo (Tran et al., 2002).

L'analisi dei residui amminoacidi delle diverse isoforme HCN mostra un elevato grado di omologia nelle regioni comprese tra il segmento S1 e il CNBD (80-90%) mentre le principali differenze si osservano nelle regioni N-terminale (a monte di S1) e C-terminale (a valle del CNBD) (Figura 5).

Le differenze strutturali che si osservano nelle regioni terminali possono in parte spiegare le differenze funzionali delle quattro isoforme.



**Figura 5:** Regioni conservate tra le diverse isoforme HCN umane. Sequenze da UniProtKB/Swiss-Prot, sequence id.: O60741 (HCN1), Q9UL51 (HCN2), Q9P1Z3 (HCN3), Q9Y3Q4 (HCN4). Allineamento eseguito con software ClastalW 2.0.10. In giallo i residui aminoacidici conservati, in verde i residui comuni alle quattro isoforme.

Nel sistema cardiaco le quattro isoforme mostrano un pattern di distribuzione caratteristico a seconda delle diverse regioni considerate.

In generale è stato dimostrato che nel nodo seno-atriale (NSA) l'isoforma predominante è HCN4 (~80%) e che pertanto HCN1 (~18%) e HCN2 (~2%) contribuiscono in modo minoritario. In modo analogo al nodo del seno anche nelle fibre del Purkinje le isoforme maggiormente espresse sono HCN1 e HCN4 ma in questo caso il ruolo predominante è svolto da HCN1 (~49%) rispetto ad HCN4 (~40%). HCN2 è espressa a minimi livelli nel NSA e nelle fibre di Purkinje (rispettivamente 0.6% e 10% dell'mRNA totale) mentre costituisce l'isoforma maggiormente espressa nei miociti atriali e ventricolari (Shi et al., 1999). Per quanto riguarda HCN3 si è dimostrata la sua presenza nel ventricolo di topo (Mistrík et al., 2005).

Una volta identificati e clonati i geni dei canali HCN, è stato possibile esprimere le quattro isoforme in sistemi di espressione eterologa: gli esperimenti hanno mostrato che le diverse subunità possono coassemblare formando strutture sia omotetrameriche che eterotetrameriche, dando origine ad un'ampia varietà di isoforme di canali HCN con differenti proprietà funzionali (cinetica di attivazione, voltaggio dipendenza, diversa sensibilità ai nucleotidi ciclici).

Esperimenti di espressione delle singole isoforme in sistemi eterologhi, mostrano che la corrente HCN1 (Santoro et al.1998; Moroni et al., 2001) è caratterizzata da una cinetica di attivazione e deattivazione molto veloce ed è poco sensibile alla modulazione da parte del cAMP, mentre le correnti HCN2 e HCN4 hanno cinetiche più lente e sono più sensibili al cAMP. In particolare, HCN4 risulta essere il canale con la cinetica più lenta (Moroni et al., 2000; Altomare et al., 2001).

Esperimenti di espressione in sistemi eterologhi (ad esempio in cellule HEK293 oppure in oociti di *Xenopus laevis*) hanno dimostrato che le diverse isoforme possono assemblare tra loro formando strutture sia omotetrameriche che eterotetrameriche. Le caratteristiche di voltaggio-dipendenza e di sensibilità al cAMP di questi tetrameri sono qualitativamente simili, ma quantitativamente diverse, da quelle dei canali funny nativi presenti nel NSA (Altomare et al., 2003). D'altra parte, le

proprietà della corrente If nativa, variano sensibilmente a seconda del distretto cardiaco in cui questa corrente è espressa; cosa che si verifica anche all'interno dello stesso NSA (Boyett et al., 2000). Una possibile spiegazione per la presenza di questa variabilità funzionale potrebbe derivare dalla diversa composizione eteromultimerica del canale, dal suo stato di fosforilazione, dalla presenza di subunità accessorie e/o, molto probabilmente, dall'interazione del canale stesso con il differente "microenvironment" citoplasmatico che lo circonda nei vari tipi cellulari (Barbuti et al., 2004).

### ***Proteine regolatrici dei canali HCN***

I canali HCN oltre ad essere regolati dal potenziale di membrana e dai nucleotidi ciclici, interagiscono con proteine regolatrici come CAV3 e MiRP1 (Baruscotti et al., 2010, Biel et al., 2009).

Le Caveoline-3 (CAV3) sono proteine integrali di membrana presenti in gran quantità nei miociti cardiaci e scheletrici dove contribuiscono alla formazione di caveole che sono invaginazioni della membrana a forma di  $\Omega$ . L'organizzazione caveolare della membrana favorisce la co-localizzazione dei canali ionici, dei trasportatori, dei recettori, e di diverse altre proteine per assicurare un delineamento spaziale e temporale della trasduzione del segnale locale.

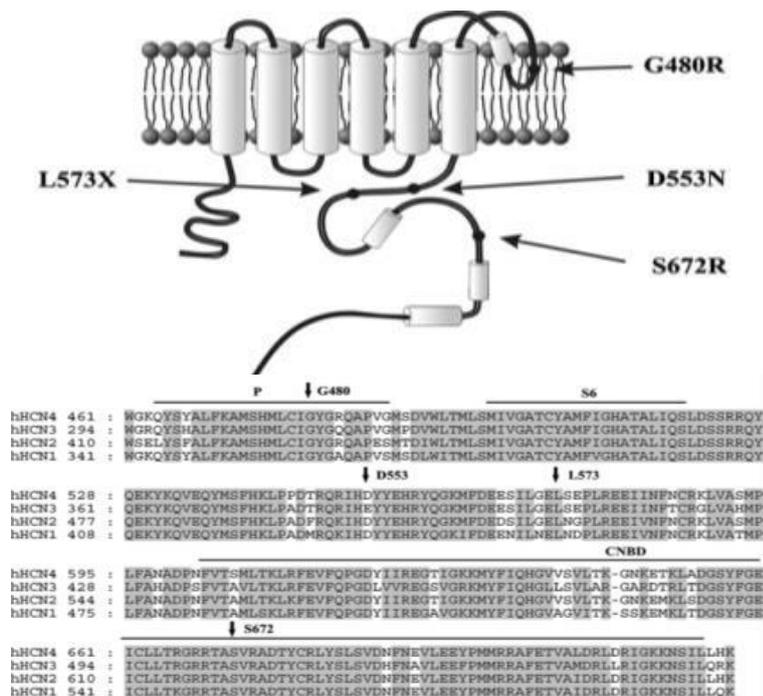
Nel cuore le CAV3 sono presenti in tutti miociti ed in particolare nelle cellule del nodo del seno. Difetti genetici di CAV3 sono stati associati sia con LQT9 e con improvvisa sindromi morte infantile.

CAV3 è una proteina di 151 amminoacidi che interagisce con varie proteine localizzate nella membrana plasmatica tra cui HCN4. È importante la localizzazione del canale HCN4 all'interno delle caveolae in quanto ne influenza le proprietà: l'utilizzo di un agente (metil- $\beta$ -ciclodestrina (M $\beta$ CD)), che disaggrega il colesterolo, causa uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali più positivi e un rallentamento delle cinetiche di deattivazione (Barbuti et al., 2004).

MiRP1 (Mink-Related Peptide 1, anche detta KCNE2) è una proteina transmembrana di 123 amminoacidi, presente soprattutto nella regione del nodo del seno e in minor quantità in atri e ventricoli, che interagisce con i canali HCN (Decher et al. 2003, Qu et al. 2004, Yu et al. 2004). MiRP1 influenza le proprietà dei canali HCN e diversi e controversi sono i dati in letteratura; la maggior parte di essi dimostrano questa interazione. In particolare il lavoro di Decher et Al., 2003 ha dimostrato che la co-espressione di HCN4 e MiRP1 in oociti di *Xenopus* e CHO porta ad un aumento della corrente passate per il canale, con un rallentamento nelle cinetiche di deattivazione e uno spostamento della velocità di mezza attivazione verso valori più negativi. Il lavoro successivo di Brandt et al. del 2009 condotto sull'interazione tra MiRP1 e i canali HCN ha confermato i dati del 2003.

### ***Mutazioni in hHCN4 ed alterazioni del ritmo cardiaco***

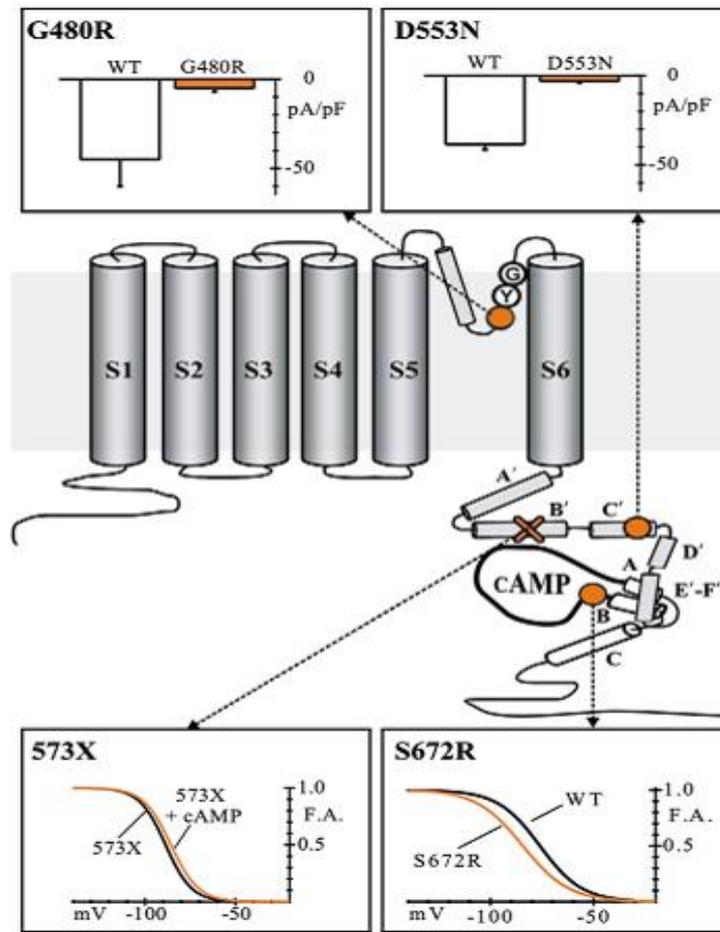
Le malattie causate da mutazioni nei geni che codificano per le subunità dei canali ionici sono indicate come "canalopatie". Le canalopatie cardiache determinano nel cuore anomalie nell'attività elettrica e dipendono nella maggior parte dei casi da alterazioni genetiche (mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni). A livello cardiaco le canalopatie includono: bradicardia, tachicardia sinusale, fibrillazione atriale, sindrome del QT lungo, sindrome di Brugada e morte improvvisa. Le mutazioni di hHCN4 caratterizzate in letteratura determinano come sintomo principale e comune bradicardia, con episodi di fibrillazione atriale, tachicardia, sincope e sindrome del QT lungo. (fig. 6).



**Figura 6:** Sono evidenziate alcune mutazioni del gene hHCN4 note in letteratura responsabili di bradicardia.

Un primo caso di mutazione genetica (mutazione nonsenso dominante negativa) è la delezione in eterozigosi di una singola base (1631delC) nell'esone 5 di Hcn4, che determina la formazione di un codone di stop e quindi di una proteina tronca (L573X) con la perdita di buona parte del C-terminale incluso il CNBD. Esperimenti di elettrofisiologia mostrano che è persa la modulazione da parte dell'AMPC (fig. 7), inoltre esperimenti di coespressione mostrano che la mutazione è dominante sul wild type. La L573X causa nel paziente bradicardia (valore medio di 41 bpm) e fibrillazione atriale. È normale il trafficking e l'espressione in membrana della proteina, mentre risulta più veloce la deattivazione del canale (Schulze-Bahr E et al., 2003).

Un secondo caso è la mutazione missenso D553N: si trova nell'esone 5 a livello del C-linker determinando una diminuzione del trafficking e una quasi completa assenza di corrente If (fig. 7). L'attivazione del canale è più veloce, mentre la deattivazione risulta più lenta rispetto al wild type. I pazienti affetti mostrano sincope ricorrente, bradicardia, sindrome del QT lungo e tachicardia ventricolare (Ueda K et al., 2004).



**Figura 7:** Mutazioni del gene hHCN4 associate ad aritmie. Al centro schema di una subunità di HCN4 con indicate le mutazioni puntiformi (G480R, D553N, and S672R) e la proteina tronca 573X. In alto: gli istogrammi mostrano la forte riduzione di densità di corrente osservata per le mutazioni G480R (a  $-100$  mV) e D553N (a  $-120$  mV). In basso a sinistra: l'AMPC non sposta la curva di attivazione verso potenziali più positivi in presenza della delezione 573X. In basso a destra: la mutazione S672R induce uno spostamento della curva di attivazione verso potenziali più negativi.

Un terzo caso è la mutazione missenso in eterozigosi S672R (esone 7) associata a bradicardia asintomatica familiare (Milanesi et al., 2006). La mutazione è autosomica dominante e nei 27 individui affetti la frequenza cardiaca media è di 52,2 bpm, nei sani è di 73,2 bpm. Tale mutazione è collocata a livello del CNBD, ma non influisce sulla modulazione da parte dell'AMPC. Negli esperimenti di elettrofisiologia invece emerge uno shift della curva di attivazione di 4,9 mV e di 8,4 mV verso potenziali più

negativi (fig.7) rispettivamente con l'espressione della mutazione in eterozigosi e in omozigosi con conseguente marcato calo di corrente If. Inoltre il canale si deattiva più lentamente, favorendo un'ulteriore diminuzione della frequenza cardiaca. La mutazione mima l'effetto di una bassa concentrazione di acetilcolina (~ 20 mM) e di una modesta stimolazione vagale. La sintesi e il trafficking del canale non risultano alterati.

La mutazione puntiforme G480R (esone 4) è collocata nel filtro di selettività GYG del poro di HCN4 e causa bradicardia asintomatica familiare: gli individui affetti hanno una frequenza cardiaca media inferiore a 55 bpm, i sani superiore a 63 bpm. La soglia di attivazione si sposta di ~ 40 mV verso potenziali più negativi con calo della corrente If (fig. 7); il *trafficking* e la sintesi diminuiscono notevolmente (Nof E et al., 2007).

Anche la mutazione missenso in eterozigosi A485V (esone 4) si trova nel poro, determina una diminuzione nella sintesi e nella funzionalità di HCN4 e causa nella maggior parte dei portatori bradicardia sinusale familiare con episodi di presincope. È stata individuata e studiata in tre famiglie non correlate tra loro. Differentemente dalla mutazione G480R, la A485V non si trova nel filtro di selettività GYG ed è caratterizzata da un marcato calo di corrente If (fig. 7); entrambe determinano un calo nella sintesi di HCN4 (Laish-Farkash A et al., 2010).

### ***Sequenziamento di nuova generazione (NGS)***

Nel campo dello screening genetico delle malattie cardiache l'obiettivo è quello di estendere la ricerca di mutazioni a più geni sia codificanti per canali ionici sia per proteine interagenti con essi o strutturali importanti a livello cardiaco, effettuando studi di screening genetici più ampliati: polimorfismi (SNPs) presenti in più geni nel loro insieme potrebbero determinare un fenotipo patologico.

Tutte le piattaforme di 'New Generation Sequencing' (NGS) disponibili presentano una caratteristica tecnologica comune: il sequenziamento

parallelo massivo di molecole di DNA amplificate in modo clonale o di singole molecole di DNA separate spazialmente in una cella a flusso ("flow cell"). Questa strategia rappresenta un cambiamento radicale rispetto al metodo di sequenziamento descritto da Sanger, che si basa sulla separazione elettroforetica di frammenti di lunghezza diversa ottenuti mediante singole reazioni di sequenziamento.

Poichè la procedura è parallela e massiva, tali piattaforme consentono di sequenziare da centinaia di milioni di paia di basi fino a miliardi di paia di basi di DNA in un'unica seduta analitica, a seconda del tipo di tecnologia NGS utilizzata.

L'identificazione della mutazione causativa, oltre a permettere di individuare eventuali familiari a rischio, facilita un preciso inquadramento clinico della patologia e, in alcuni casi, può aiutare nella definizione della prognosi e nella corretta scelta della terapia farmacologica o della strategia di prevenzione, quale l'impianto di un defibrillatore. In questi ultimi mesi abbiamo collaborato con il laboratorio di Genetica Molecolare dell'Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII di Bergamo che ha introdotto tecnologie di NGS per la diagnosi molecolare delle patologie cardiovascolari ed ha sviluppato e validato un pannello di geni per queste patologie estremamente eterogenee.

## **SCOPO DEL LAVORO**

In questo lavoro ho effettuato uno screening genetico di popolazione in pazienti affetti da alterazioni familiari del normale ritmo cardiaco. Il mio scopo è stato quello di identificare la presenza di eventuali mutazioni e polimorfismi all'interno della sequenza primaria della porzione codificante del gene hHCN4 che potessero essere coinvolte con lo sviluppo del fenotipo patologico del paziente. Questo screening ha analizzato diversi tipi di aritmie con possibile origine a livello del nodo senoatriale ed in particolare: bradicardia sinusale, tachicardia sinusale e fibrillazione atriale. Una volta individuate alterazioni nella sequenza genica, l'obiettivo è stato quello di caratterizzarle da un punto di vista funzionale e definirne il possibile coinvolgimento nella patologia.

Nei casi di familiarità della patologia aritmica e in assenza di una mutazione in HCN4 ho ampliato lo screening ad altri geni: la nostra attenzione si è rivolta alle nuove tecnologie in ambito di screening genetico definite New Generation Sequencing (NGS). Abbiamo dunque deciso di utilizzare tecnologie di NGS per la diagnosi molecolare di alcune malattie cardiovascolari analizzando un pannello di geni per investigare le basi genetiche delle disfunzioni cardiache.

## **MATERIALI E METODI**

Il materiale genetico è stato estratto a partire da sangue intero e da cellule della mucosa boccale di pazienti reclutati da collaborazioni con gruppi di ricerca ed enti ospedalieri.

Prima di procedere allo screening genetico i pazienti sono stati sottoposti alla firma di un consenso informato per l'autorizzazione al trattamento del materiale genetico.

### ***Estrazione di DNA da sangue intero***

Il materiale genomico è stato ottenuto utilizzando il kit commerciale Gentra® Puregene Blood Kit per l'estrazione di DNA da sangue intero.

Protocollo standard di purificazione a partire da 1 ml di sangue

Lisi cellulare

- Aggiungere 1 ml di sangue ad una provetta da 15 ml contenente 3 ml di "Red Blood Cells Lysis Solution". Capovolgere diverse volte la provetta ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Centrifugare per 2 minuti a 2000 g in modo tale che si formi il pellet di globuli bianchi, da cui verrà estratto il DNA.
- Prelevare il surnatante senza rimuovere il pellet di globuli bianchi, lasciando almeno 100 µl di liquido residuo.
- Agitare la provetta vigorosamente per risospendere le cellule nel liquido residuo.
- Aggiungere 1 ml di "Cell Lysis Solution" alle cellule risospese.

Trattamento con RNAsi

- Aggiungere 5 µl di RNase A Solution al lisato cellulare.
- Mischiare capovolgendo la provetta 25 volte e incubare a 37°C per 15 minuti.

### Precipitazione delle proteine

- Raffreddare il campione a temperatura ambiente.
- Aggiungere 333 µl di “Protein Precipitation Solution” al lisato cellulare e agitare vigorosamente per rendere uniforme la soluzione.
- Centrifugare a 2000 g per 5 minuti. Il precipitato proteico dovrebbe formare un pellet marrone scuro.

### Precipitazione del DNA

- Prelevare il surnatante contenente il DNA (evitando il pellet proteico) in una provetta da 15 ml contenente 1 ml di Isopropanolo al 100%.
- Capovolgere il campione diverse volte fino a quando il DNA risulta visibile sottoforma di un pellet bianco e trasferire il pellet in una provetta da 2 ml.
- Centrifugare a 13000 rpm per un minuto.
- Prelevare il surnatante e lasciare asciugare la provetta per 10 secondi su carta assorbente pulita. Aggiungere 1 ml di etanolo 70 % e capovolgere la provetta molte volte per lavare il pellet di DNA.
- Centrifugare a 13000 rpm per 1 minuto. Rimuovere attentamente l’etanolo.
- Lasciare asciugare il pellet per 10-15 minuti.

### Idratazione del DNA

- Aggiungere 200-300 µl di “DNA Hydration Solution” in base alla grandezza del pellet, cercando di dissolverlo con una pipetta.
- Reidratare il DNA mediante incubazione a 65°C per un’ora.
- Mantenere il DNA a 4°C oppure a -20°C o -80°C per la conservazione a lungo termine.

### ***Estrazione di DNA da un tampone boccale***

#### Lisi cellulare:

- Inserire il tampone recante le cellule della mucosa boccale del paziente in una provetta da 1,5 ml contenente 300 µl di “Cell Lysis Solution”.
- Aggiungere al campione 1,5 µl di Proteinasi K (20mg/ml) e agitare.
- Incubare il campione a 55°C per un’ora.

- Rimuovere il tampone dalla soluzione sfregandolo sulle pareti della provetta in modo da raccogliere il lisato cellulare.

#### Trattamento con RNasi

- Aggiungere 1,5  $\mu$ l di RNase A Solution al lisato cellulare.
- Mischiare capovolgendo la provetta 25 volte e incubare a 37°C per un'ora.

#### Precipitazione delle proteine

- Raffreddare il campione ponendolo in ghiaccio per 1 minuto.
- Aggiungere 100  $\mu$ l di "Protein Precipitation Solution" al lisato cellulare e agitare vigorosamente per 20 secondi per rendere omogenea la soluzione.
- Incubare in ghiaccio per 5 minuti.
- Centrifugare a 13000 rpm per 3 minuti (centrifuga HERMLE Z 230 MR). Il precipitato proteico deve formare un pellet bianco e spesso.

#### Precipitazione del DNA

- Prelevare il surnatante contenente il DNA (evitando il pellet proteico) in una provetta da 1,5 ml contenente 300  $\mu$ l di Isopropanolo al 100% e 0,5  $\mu$ l di "Glycogen Solution" (20 mg/ml).
- Mischiare capovolgendo la provetta 50 volte e incubare a temperatura ambiente per almeno 5 minuti.
- Centrifugare a 13000 rpm per 5 minuti. Il Dna forma un piccolo pellet sulla parete della provetta.
- Prelevare il surnatante e lasciare asciugare la provetta per 10 secondi su carta assorbente pulita. Aggiungere 300  $\mu$ l di etanolo 70% e capovolgere la provetta molte volte per lavare il pellet di DNA.
- Centrifugare a 13000 rpm per 1 minuto. Rimuovere attentamente l'etanolo.
- Lasciare asciugare il pellet per 10-15 minuti.

#### Idratazione del DNA

- Aggiungere 20-30  $\mu\text{l}$  di “DNA Hydration Solution” in base alla grandezza del pellet, cercando di dissolverlo con una pipetta.
- Reidratare il DNA mediante incubazione a  $65^{\circ}\text{C}$  per un’ ora
- Mantenere il DNA a  $4^{\circ}\text{C}$  oppure a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$  per la conservazione a lungo termine

### ***Quantificazione del DNA***

Per quantificare il DNA ottenuto abbiamo utilizzato sia lo spettrofotometro Ultrospec 1100 pro (Amersham Biosciences) che la corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%, comparando la banda di DNA genomico con quelle del marcatore 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

La concentrazione finale del DNA viene portata in genere a 50-100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  per le preparazioni successive.

### ***PCR (Polymerase Chain Reaction)***

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che consente di ottenere un elevato numero di copie di uno specifico frammento di DNA; essa si basa sulla reazione di replicazione in vitro del DNA catalizzata dall’enzima Taq polimerasi, una DNA polimerasi batterica resistente alle alte temperature. I primers sono sequenze oligonucleotidiche a singolo filamento di circa 20 nucleotidi, complementari alle estremità del frammento da amplificare che fungono da innesco alla sintesi: per la reazione servono un primer forward ( $5' \rightarrow 3'$ ) e un primer reverse ( $3' \rightarrow 5'$ ), ai quali la polimerasi aggiunge nucleotidi (dNTPs) in direzione  $5' \rightarrow 3'$ . Generalmente i primers hanno le seguenti caratteristiche:

- Lunghezza compresa tra le 15 e le 25 bp
- GC al 40-60 %
- Temperatura di melting ( $T_m$ ) simile e compresa tra  $50$  e  $60^{\circ}\text{C}$
- Elevata specificità per la sequenza di interesse
- Incapacità a formare strutture secondarie e dimerizzare

Il processo della PCR consta di tre steps principali ripetuti dalle 30 alle 40 volte attraverso l'utilizzo di un termociclatore:

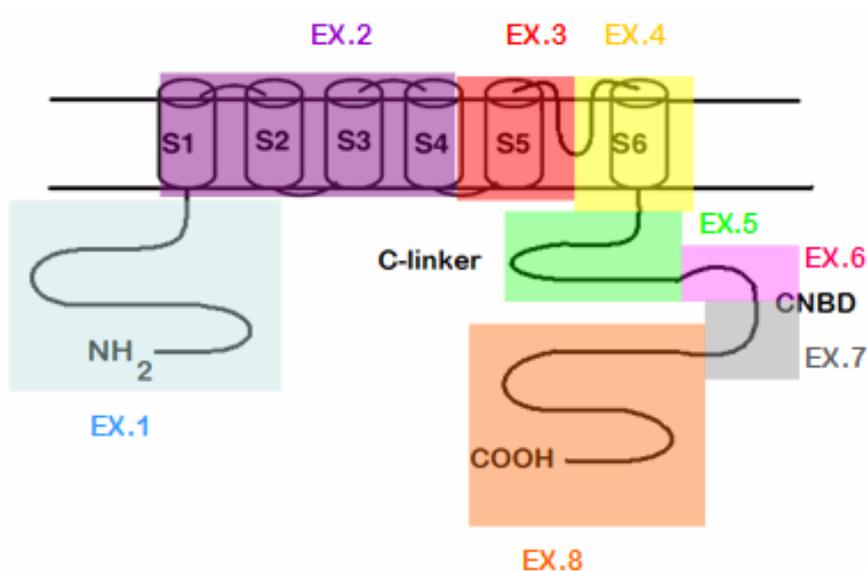
- **DENATURAZIONE:** avviene a 95°C. Durante questa fase avviene la rottura dei legami idrogeno tra le basi complementari in modo da separare le due eliche che compongono la sequenza stampo;
- **APPAIAMENTO O ANNEALING:** avviene ad una temperatura specifica per i due primers, generalmente compresa tra 50 e 60 °C; in questa fase i primers si legano alle singole eliche di DNA che fungeranno da template per la Taq polimerasi.
- **ESTENSIONE:** avviene a 72°C che è la temperatura ottimale per la Taq polimerasi, che allunga i filamenti aggiungendo dNTPs ai primers in direzione 5→'3'. La velocità di sintesi della Taq polimerasi è di circa 1 kb/min.

Generalmente viene utilizzato quindi il seguente schema:

<b>Step</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Numero di cicli</b>
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	2-5 min	1 ciclo
<b>Denaturazione</b>	95°C	30-40 sec	30-35 cicli
<b>Ibridazione</b>	50-70°C	30-40 sec	
<b>Polimerizzazione</b>	72°C	30-40 sec	
<b>Polimerizzazione finale</b>	72°C	10 min	1 ciclo

L'appaiamento rappresenta un punto critico per determinare la specificità della reazione: la temperatura di annealing corrisponde alla differenza tra le  $T_m$  (temperatura di melting) dei due primers meno 5°C. Ogni primer ha infatti una propria  $T_m$  che varia a seconda della lunghezza e del contenuto in GC: quanto più le  $T_m$  sono simili, tanto più efficiente è la reazione in quanto è possibile scegliere una temperatura di annealing a cui entrambi i primers si appaiano correttamente all'elica complementare.

Al fine di ottimizzare amplificazione e sequenziamento, gli otto esoni del gene hHCN4 sono stati divisi in più parti, che costituiscono gli ampliconi delle reazioni di PCR, come indicato in figura.



**Figura 8.** Rappresentazione schematica della struttura dei canali HCN. Nella tabella 2 si evidenziano i frammenti in cui sono stati suddivisi gli 8 esoni del gene HCN4

Per ogni reazione di amplificazione è stata utilizzata una mix di reazione la cui composizione è schematizzata nella tabella.

	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>
<b>DNA</b>	100 ng/μl	5 ng/μl
<b>PCR Buffer</b>	10X	1X
<b>GC-RICH solution</b>	5X	1X
<b>dNTPs</b>	100 mM (per ogni dNTP)	0,2 mM (per ogni dNTP)
<b>Oligo forward</b>	25 μM	1,25 μM
<b>Oligo reverse</b>	25 μM	1,25 μM
<b>Taq Polimerasi</b>	5U/μl	0.05 U/μl
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	Al volume finale di 20 μl	

**Tabella 1:** schema di mix di reazione

AMPLICONE	CONDIZIONI PCR (95°x5',...,72°x10',4°x1')		LUNGHEZZA (bp)	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
1.1	95°x30"	6 x 5 cicli	395	GCAAAGGACGCGTCCCC	GAAGCGCCTGCAGTCGC
	TD 64-54°x30"				
	72°x30"				
1.2	95°x35"	35 cicli	354	GCAAGTCCAGCACGAACGG	CCGGGAGGATCTGGTTCGC
	66°x35"				
	72°x35"				
1.3	95°x30"	35 cicli	330	GGACACCCTATCAAAGTGG	GGCAGGAAAGTTAACTCCGG
	65°x30"				
	72°x30"				
2.1	95°x30"	6 x 5 cicli	260	TCCTCTCTCTTCTCCTGGCGACT	TTAATCCGCTGCGGGTCCAG
	TD 64-54°x30"				
	72°x30"				
2.2	95°x40"	35 cicli	280	GTGGTGGAGGACAACACAGA	CAAGAGGTTGCACTGACCA
	68°x40"				
	72°x40"				
3	95°x35"	35 cicli	315	CCAGGGCAGGGAAAGTGGC	CAAGTCCACATCTCGCCACC
	66°x35"				
	72°x35"				
4	95°x30"	35 cicli	295	TTCCCTCTCATCCACTGTCCC	GACCAATGTGCGGGTGCTCC
	66°x30"				
	72°x30"				
5	95°x30"	35 cicli	353	GGAACCAAGTTTAGCCAGGA	ACACGGGAAGGAGGTGGT
	62°x30"				
	72°x30"				
6.1	95°x30"	30 cicli	166	GTGTCCAATCCACCCTGT	CCTTCCCGGATGATGTAGTC
	58°x30"				
	72°x30"				
6.2	95°x35"	35 cicli	192	AGCTGCGTTTCGAGGTCTT	GGGAGCAGCTGCCCTGTC
	66°x35"				
	72°x35"				
7.1	95°x30"	30 cicli	149	AGGCTGTGCATGCCTCAT	ACTCCTCCAGCACCTCATTG
	58°x30"				
	72°x30"				
7.2	95°x30"	35 cicli	249	GACACCTACTGCCGCTCTA	CAGAACAAGAACAGGCACTCA
	62°x30"				
	72°x30"				
8.1A	95°x30"	30 cicli	172	CTGCACCTGATCTCCTTCC	CATCTCCGGTCATGCTG
	58°x30"				
	72°x30"				
8.1B	95°x30"	30 cicli	185	GGAGAATGAGATCATCCAGCA	GGTGGTGGGTGAGGGCTA
	58°x30"				
	72°x30"				
8.2	95°x30"	35 cicli	236	CGTCATCTGGACCCCGCTGAT	CCACCTGGGACGGGCTGCTG
	68°x30"				
	72°x30"				
8.3	95°x30"	35 cicli	314	GGCTGCAGTCCCTGATCCC	GCCTGGCTGCAGCGGGG
	68°x30"				
	72°x30"				
8.4	95°x30"	6x5 cicli	349	TCCACAAGGCGCTGGGTGG	CTGAGACCTCCTCGGGGAG
	TD 70-60°x30"				
	72°x30"				
8.5	95°x30"	35 cicli	261	GTCCCTTGTGGCAGGGGC	GGCTGAGACGCGGAGATGAG
	68°x30"				
	72°x30"				
8.6	95°x30"	30 cicli	275	CCAGGACCTCAAGCTCATCT	CTCTTGCCCCAAACAAAGAC
	58°x30"				
	72°x30"				
8.7	95°x30"	30 cicli	198	TCCTCAGGTTCTTTGCCACC	AAGGAAGAAGGAAGGGAGAG
	58°x30"				
	72°x30"				

**Tabella 2:** vengono riportate le sequenze dei primers e le condizioni di PCR utilizzate per amplificare ogni singolo frammento.

### ***Elettroforesi su gel di agarosio:***

Per verificare la resa del processo di amplificazione e le dimensioni dei frammenti ottenuti, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Tale tecnica è classicamente utilizzata per analizzare i saggi di amplificazione degli acidi nucleici. Il gel, contenente una matrice porosa, permette la migrazione in campo elettrico del DNA carico negativamente verso il polo positivo. La velocità di migrazione è correlata alle dimensioni dei frammenti di DNA: i frammenti più corti migrano a velocità maggiori. La polvere di agarosio viene sciolta, portandola ad ebollizione, in soluzione tampone TAE 1X (Tris Base 40 mM, EDTA 1 mM, acido acetico 20 mM, pH8), utilizzata anche come tampone di corsa. Per consentire la visualizzazione degli acidi nucleici viene aggiunto bromuro di etidio (0,5 µg/ml), una molecola planare che si intercala tra le basi del DNA ed emette luce fluorescente quando irradiata con luce ultravioletta. 3 µl di ogni campione sono diluiti in 7 µL di acqua Milli-Q® e 2 µL di loading dye (6X) (Fermentas™) e caricati uno per ogni pozzetto. Al fine di valutare la lunghezza del frammento amplificato, è stato caricato, parallelamente ai campioni, 1 µL di marcatore a peso molecolare noto da 100 bp (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas™). La corsa elettroforetica viene effettuata a circa 90-100 V per 20-40 minuti a temperatura ambiente: quindi il gel viene controllato al transilluminatore.

### ***Purificazione del prodotto di PCR***

Per poter sequenziare l'amplificato ottenuto da PCR sono necessari circa 10-20 ng di DNA purificato per ogni 100 paia di basi. Per purificare i prodotti di PCR è stato utilizzato il kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), seguendo questo protocollo:

- Unire 100 µl di reazione di PCR a 200 µl di Buffer NT.
- Caricare il campione in una colonnina di purificazione e centrifugare per 1' a 13000 rpm. Eliminare la soluzione depositata nella provetta di raccolta.

- Per lavare la membrana, aggiungere 600  $\mu$ l di Buffer NT3 contenente etanolo e centrifugare per 1' a 13000 rpm. Eliminare la soluzione depositata.
- Asciugare la membrana per rimuovere le tracce di etanolo attraverso centrifuga per 2' a 13000 rpm.
- Posizionare la colonnina in una provetta sterile da 1,5 ml. Eluire il DNA dalla membrana con 15-50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O MQ, centrifugando per 1' a 13000 rpm.

La resa di purificazione è stata verificata su gel di agarosio e in caso di bande aspecifiche abbiamo isolato la banda di interesse e ne abbiamo estratto il DNA. Abbiamo utilizzato il kit NucleoSpin Extract II, seguendo il protocollo di estrazione del DNA da gel di agarosio:

- Con una lametta sterile tagliare la banda di DNA da purificare sotto una fonte di luce UV e riporla in una provetta da 1,5 ml.
- Aggiungere 200  $\mu$ l di Buffer NT per ogni 100 mg di gel e incubare a 50°C fino a che il gel non sia completamente dissolto.
- Seguire i passaggi da 2 a 5 del precedente protocollo.

### ***SSCP (Single-strand conformation polymorphism)***

La SSCP (Single-strand conformation polymorphism) è una tecnica di biologia molecolare che permette di discriminare eventuali sostituzioni nucleotidiche nel singolo filamento di DNA evidenziandole sotto forma di pattern differenti rispetto al campione wild type con un'accuratezza dell'85%. La tecnica consiste nell'elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide di campioni di DNA a singolo filamento, cui segue una fase di colorazione argentea del gel per la visualizzazione delle bande. La corsa elettroforetica in condizioni non denaturanti attraverso le maglie del gel permette la separazione dei diversi pool conformazionali: differenze puntiformi a livello della sequenza nucleotidica variano la conformazione

secondaria del filamento e la sua capacità di correre attraverso il gel. La colorazione del gel permette di distinguere, confrontando i pattern di corsa dei campioni, i profili wild type da quelli mutati. Frammenti di DNA anche con una sola sostituzione nucleotidica hanno una migrazione elettroforetica differente dal frammento con sequenza normale. La tecnica prevede una fase di preparazione del gel di poliacrilammide e di caricamento del gel con i campioni di DNA precedentemente amplificati mediante PCR, colorati con loading buffer e denaturati, seguita da una seconda fase, successiva alla corsa elettroforetica verticale, in cui viene eseguita la colorazione argentea per la visualizzazione delle bande.

Per la realizzazione della SSCP è necessario l'utilizzo delle seguenti soluzioni:

- Loading Buffer (L.B.): per un volume totale di 50 mL si utilizzano 49 mL di formammide (agente denaturante), 1 mL di EDTA 0,5 M pH 8, 50 mg di blu di bromofenolo (colorante) e 50 mg di xilene cianolo. Si conserva a 4 °C ed è necessario per la colorazione dei campioni di DNA.
- Acrilammide (30%): per un volume di 1000 mL si utilizzano 295.2 g di acrilammide, 4.65 g di N,N'-metilen-bis-acrilammide (sostanza in grado di stabilire i legami crociati tra le molecole di acrilammide) , e 1000 mL di acqua Milli-Q. Si conserva a 4 °C.
- Acrilammide (6%): per un volume di 1000 mL si utilizzano 200 mL di acrilammide al 30%, 100 mL di TBE 10x, acqua Milli-Q fino a volume. Si conserva a 4 °C.
- TBE 10x: per un volume di 1000 mL si utilizzano 108 g di Trizma base, 55 g di acido borico, 40 mL EDTA 0,5 M pH 8 e acqua Milli-Q fino a volume. Si utilizza nella preparazione dell'acrilammide al 6% e come tampone per la corsa elettroforetica. Si conserva a 4 °C.
- APS (ammonio persolfato): ammonio persolfato al 10 % in acqua Milli-Q, si conserva a 4 °C. È iniziatore della reazione di polimerizzazione.

- TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina): è il catalizzatore della polimerizzazione dell'acrilammide. Si conserva a 4 °C.
- Etanolo (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH): si utilizza in soluzione al 10% in acqua distillata per lavare il gel di poliacrilammide nella prima fase della colorazione argentica. Si conserva a temperatura ambiente.
- Acido nitrico (HNO<sub>3</sub>): si utilizza all'1% e si ottiene da 15,39 mL di HNO<sub>3</sub> al 65% in 1 L di acqua distillata. Si conserva a temperatura ambiente.
- Nitrato d'argento (AgNO<sub>3</sub>): si utilizza in concentrazione 12 mM ottenuta da 6 mL di AgNO<sub>3</sub> 1 M in 1 L di acqua distillata. Si conserva a temperatura ambiente.
- Carbonato di sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): se ne utilizzano 29.68 g in 1 L di acqua distillata e alla soluzione nel momento dell'utilizzo si aggiungono 480 µL di formaldeide al 40%. Si conserva a 4 °C e permette la visualizzazione delle bande.
- Acido acetico (CH<sub>3</sub>COOH): si utilizza in soluzione al 10% in acqua distillata e permette di fermare la colorazione. Si conserva a 4 °C.

Filtrare con filtro da 0,22 µm 80 mL di acrilammide al 6% ed aggiungere 800 µL di APS 10% e 40 µL di TEMED, tale soluzione viene versata tra due vetri ben puliti con isopropanolo e separati dagli spacers da 0,35 mm. Dopo che il gel è stato lasciato polimerizzare per un'ora, i vetri vengono posti nell'apparato per elettroforesi (Hoefer SQ3 Sequencer, Amersham Biosciences™), a cui viene aggiunto 1 L di TBE 1x (10% in acqua distillata del 10x). Con il pettine vengono formati i pozzetti, dove verranno caricati i prodotti di PCR. Vengono inizialmente caricati 2 µL di L.B. in ogni pozzetto e viene fatta migrare la precorsa per circa 30' a 25 W. I prodotti di PCR, a cui è stato aggiunto in rapporto 1:1 il loading buffer, vengono denaturati a 95 °C per 10', posti in ghiaccio e caricati nei pozzetti in un volume variabile tra i 5 e i 15 µL in base alla quantità di DNA ottenuto nella PCR. Viene fatta partire la corsa elettroforetica a 25-30 W e il DNA viene fatto migrare per un tempo proporzionale alla lunghezza del frammento considerato.

Terminata la corsa, viene effettuata la colorazione silver staining.

I vetri vengono separati e il gel viene coperto da etanolo al 10% per 5' e successivamente ossidato con la soluzione di acido nitrico all'1% per 3'. Il gel, sciacquato con acqua distillata per pochi secondi, viene coperto poi dalla soluzione di nitrato di argento 12 mM per 20'. Dopo un rapido lavaggio con acqua distillata, il gel viene ridotto dalla soluzione di carbonato di sodio con formaldeide, cambiando la soluzione riducente ogni volta che diventa scura e incubando il gel fino a quando l'immagine raggiunge l'intensità desiderata. Il processo di riduzione viene bloccato aggiungendo acido acetico glaciale al 10% per 2'. Infine il gel viene lavato con acqua distillata per pochi secondi e poi ricoperto con carta cromatografica 3MM (Whatman™) e pellicola trasparente, quindi viene essiccato su apparato Slab Gel Drier Hoefer (Amersham Biosciences™) per 40' a 70 °C.

### ***Sequenziamento dei prodotti di amplificazione:***

I prodotti di amplificazione purificati sono stati sequenziati da un laboratorio esterno (Bio-Fab Research, Roma): vengono inviati 13 ng di DNA del campione da analizzare per le prime 100 bp e 10 ng per ogni 100 pb successive, e 10 pmoli di primer in un volume finale di 10 µL.

Il processo di sequenziamento è basato su una reazione di polimerizzazione mediante l'utilizzo di 4 didesossinucleotidi terminatori (ddNTPs), marcati con 4 fluorocromi diversi, e una DNA polimerasi termostabile, che facilita l'incorporazione dei ddNTPs nella catena del DNA in formazione. I ddNTPs sono così definiti in quanto mancano del gruppo idrossile in posizione 3', coinvolto nella formazione del legame fosfodiesterico tra due nucleotidi adiacenti nella molecola di DNA. L'incorporazione di un ddNTP al posto di un normale dNTP causa l'arresto della reazione di polimerizzazione. Terminata la reazione di polimerizzazione, grazie ad un rilevatore laser che eccita le molecole fluorescenti, è possibile conoscere i ddNTPs incorporati nella catena di DNA e, quindi, risalire alla sequenza nucleotidica di interesse, attraverso

la lettura dell'elettroferogramma ottenuto. Ogni picco identifica in modo univoco una base azotata, indicando la successione delle basi presenti nella sequenza. La lettura dell'elettroferogramma viene automaticamente effettuata dal software di sequenziamento. L'analisi delle sequenze viene effettuata con programmi quali Chromas Lite (per la lettura dell'elettroferogramma) e da GeneDoc (per l'allineamento delle sequenze forward e reverse del campione in questione in confronto al wild type dell'esone in analisi).

### ***Creazione del plasmide hHCN4 recante la mutazione RQ:***

Il cDNA del gene hHCN4 mutato (4545 G>A) è stato ottenuto utilizzando il vettore d'espressione pcDNA 1.1 (8331 bp, Invitrogen) contenente il cDNA del gene hHCN4 wild type. La mutazione trovata è stata introdotta utilizzando il kit commerciale QuikChange® Site Directed Mutagenesis (Stratagene) con i seguenti primer e il successivo protocollo:

Forward: g4545a ctggactcctcccagcgccagtaccag

Reverse: g4545a ctggtactggcgctgggaggagtccag

È stata preparata la seguente mix per la mutagenesi del plasmide wild type (tab. 3):

	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>
<b>Buffer</b>	10X	1X
<b>Vettore d'espressione pcDNA 1.1-HCN4 wt</b>	5 ng/ $\mu$ L	0,2 ng/ $\mu$ L
<b>Primer forward</b>	100 ng/ $\mu$ L	2,5 ng/ $\mu$ L
<b>Primer reverse</b>	100 ng/ $\mu$ L	2,5 ng/ $\mu$ L
<b>dNTP mix</b>	100 mM	2 mM
<b>Oligo reverse</b>	25 $\mu$ M	1,25 $\mu$ M
<b>DNA polimerasi PfuTurbo</b>	2,5 U/ $\mu$ l	0,05 U/ $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	Al volume finale di 50 $\mu$ l	

**Tabella 3:** Mix per mutagenesi

La reazione di mutagenesi ha seguito le seguenti condizioni (tab. 4):

<b>Cicli</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	95 °C	30 sec
18	95 °C	30 sec
	55 °C	1 min
	68 °C	8 min 30 sec
1	68 °C	7 min

**Tabella 4:** condizioni di PCR per la mutagenesi

La durata dell'estensione per 18 cicli a 68 °C viene calcolata in base alla lunghezza del plasmide: 1 minuto per ogni kb di lunghezza del plasmide.

I plasmidi wild type sono stati eliminati utilizzando l'endonucleasi DpnI che riconosce il DNA metilato.

Il plasmide mutato è stato processato con due endonucleasi di restrizione (HindIII e BssHII), attendendosi bande di 2274 e 6057 bp, in modo che la prima contenga la mutazione desiderata e gli stessi enzimi di restrizione sono stati impiegati per effettuare i tagli nel costrutto plasmidico contenente il gene hHCN4 wild type. Verificata la corretta lunghezza delle bande attese su gel di agarosio all'1%, è stata effettuata la ligazione tra le bande del plasmide wt da 6057 bp e quella contenente la mutazione da 2274 bp, utilizzando la DNA ligasi T4 (Invitrogen™). In questo modo si è certi che il frammento da 6057 bp non contenga errori di replicazione non desiderati. Successivamente è stato sequenziato il plasmide nelle zone di interesse per verificare la presenza della mutazione introdotta.

### ***Trasformazione batterica:***

Per ottenere un elevato numero di copie del plasmide ricombinante pcDNA 1.1 (8331 bp), recante la mutazione g4545a (R524Q), è stato necessario eseguire la trasformazione batterica utilizzando come cellule ospiti i batteri competenti E. Coli XL1-Blue. Il plasmide ricombinante contiene un marcatore selettivo che conferisce alla cellula batterica la resistenza all'antibiotico ampicillina (ampR).

Per la trasformazione delle cellule batteriche sono stati effettuati i seguenti passaggi:

- Aggiunta di 10 µL di plasmide mutato alle cellule competenti
- Incubazione in ghiaccio per 30 minuti
- Shock termico: incubazione a 42°C per 30 secondi in un bagnetto termostato e successivo passaggio in ghiaccio per 2 minuti
- Aggiunta di 0,5 mL di terreno di crescita LB medium (Sigma-Aldrich®) senza antibiotico
- Incubazione in agitazione (220 rpm) a 37°C per 1 ora

- Trasferimento di 250  $\mu\text{L}$  di cellule su piastra Petri ( $\varnothing = 100 \text{ mm}$ ) con terreno di crescita LB-agar addizionato con ampicillina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
- Incubazione delle cellule in termostato a 37°C overnight.

### **Cracking:**

Per confermare la corretta inserzione della banda recante la mutazione nel plasmide è stato necessario effettuare il cracking batterico:

- Prelevare con un puntale le singole colonie dalla piastra
- Risospendere ogni colonia in una provetta con 25  $\mu\text{L}$  di acqua MilliQ e prelevarne un'aliquota e metterla in una falcon contenente 300  $\mu\text{L}$  di terreno LB con ampicillina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
- Aggiungere alla provetta 25  $\mu\text{L}$  di soluzione di cracking per liberare il DNA il plasmidico dai batteri, agitare per 30 secondi e caricare su gel di agarosio all'1-1,5%.

La soluzione di cracking è stata preparata nel seguente modo:

- Idrossido di sodio (NaOH) 10 N 10  $\mu\text{L}$
- EDTA 0,5 M 100  $\mu\text{L}$
- SDS 10X 500  $\mu\text{L}$
- Glicerolo 100% 500  $\mu\text{L}$
- H<sub>2</sub>O sino a volume di 5 mL

### **Estrazione del DNA plasmidico**

Per estrarre il DNA plasmidico dal clone batterico selezionato è stato utilizzato il kit di purificazione NucleoSpin® Plasmid Mini Prep (Macherey-Nagel®) secondo il seguente protocollo:

- Centrifugare le colture batteriche a circa 4000 x g per 10 minuti.

- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet batterico in 250  $\mu\text{L}$  di Buffer A1 (buffer di lisi) trasferendo poi il tutto in provette da 1,5 mL.
- Aggiungere 250  $\mu\text{L}$  di Buffer A2 (buffer di lisi) e risospendere invertendo la provetta per 6-8 volte.
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti finchè il lisato non appare chiaro.
- Aggiungere 300  $\mu\text{L}$  di Buffer A3 (buffer di lisi) e risospendere invertendo la provetta per 6-8 volte.
- Centrifugare a 11000 x g per 5 minuti per far precipitare il lisato.
- Trasferire il surnatante nella colonnina di purificazione (NucleoSpin™ Plasmid Column).
- Centrifugare a 11000 x g per 1 minuto e scartare il liquido dalla provetta di raccolta, il DNA si lega alla membrana di silice.
- Aggiungere 600  $\mu\text{L}$  di Buffer A4 (buffer di lavaggio preaddizionato con etanolo), centrifugare a 11000 x g per 1 minuto e scartare il liquido dalla provetta di raccolta.
- Centrifugare a 11000 x g per 2 minuti per eliminare i residui di buffer.
- Trasferire la colonnina in una nuova provetta da 1.5 mL e aggiungere 50  $\mu\text{L}$  di acqua MilliQ lasciando in incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto.
- Centrifugare a 11000 x g per 1 minuto per eluire il DNA plasmidico legato alla membrana di silice della colonnina.

Dopo aver quantificato il DNA plasmidico estratto, questo è trattato con l'endonucleasi di restrizione KpnI, che permette di verificare se la ligazione è avvenuta in maniera corretta: su gel di agarosio all'1% sono attese due bande di 3098 e 5233 bp.

Il DNA plasmidico estratto è stato infine sequenziato secondo metodo Sanger (Bio-Fab Research™, Roma).

## **Trasfezione**

Come sistema eterologo per lo studio di espressione in vitro della mutazione R524Q sono state utilizzate cellule renali embrionali umane (HEK 293, Human Embryonic Kidney 293 cells) che non esprimono in maniera endogena il canale HCN4.

Le cellule HEK 293 sono state coltivate in terreno di mantenimento costituito da DMEM + GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen™), addizionato con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen™) e 1% di Pen-Strep (penicillina 100 U/mL, streptomicina 0,1 mg/mL) (Sigma-Aldrich®).

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37° C con una percentuale di CO<sub>2</sub> al 5%.

Il giorno prima della trasfezione le cellule vengono staccate dalla piastra con tripsina (1/10 del volume del terreno) e, dopo averle centrifugate e risospese in 2 mL di terreno, vengono ripiastrati 40 ul delle stesse in Petri da 35 mm di diametro.

L'esperimento di trasfezione transiente su cellule HEK 293 è stato effettuato seguendo il protocollo standard del sistema FuGENE® HD (Roche®) ed utilizzando il reagente in un rapporto di 3:1 rispetto al DNA plasmidico.

Le cellule HEK 293 sono state trasfettate con in tre diversi modi: una piastra è trasfettata con un 1 µg di plasmide contenente il canale hHCN4 wild type, la seconda con 1 µg di plasmide contenente il canale hHCN4 con mutazione R524Q e la terza con 0,5 µg di plasmide wt e 0,5 µg di plasmide con canale hHCN4 con mutazione R524Q.

Le cellule sono state trasfettate anche con un plasmide portatore di GFP (Green Fluorescent Protein) per la selezione delle cellule durante gli esperimenti di elettrofisiologia.

Per ogni piastra da 35 mm contenente le cellule HEK 293 da trasfettare sono stati effettuati i seguenti passaggi:

- Preparare una mix con 1 µg di DNA plasmidico wt o omo (per l'eterozigote: 0,5 µg omo + 0,5 µg wt) e 0,3 µg di DNA plasmidico portatore di GFP in 100 µL di terreno senza siero.
- Aggiungere 3,9 µL di FuGENE® HD (reagente di trasfezione).
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente.

Dopo aver sostituito il terreno con 900 µL di nuovo terreno, sono stati aggiunti 100 µL della mix precedentemente preparata.

Le piastre così ottenute sono state mantenute in incubatore a 37°C (CO<sub>2</sub> al 5%) overnight.

### ***Creazione dei costrutti plasmidici contenenti MiRP1WT e MiRPI57T***

Il cDNA di hMiRP1 WT è stato clonato in pIRES2-EGFP, un plasmide che contiene la sequenza codificante per la green fluorescent protein (GFP). Le cellule esprimenti il MiRP1 potranno essere facilmente selezionate per gli esperimenti di patch-clamp, in quanto risulteranno verdi se poste sotto un microscopio dotato di lampada ad UV.

Abbiamo estratto il cDNA di MiRP1 da pCI-neo, il plasmide nel quale MiRP originariamente è stato clonato, e tagliato il plasmide pIRES2-EGFP vuoto con l'enzima di restrizione EcoRI.

La digestione con EcoRI (Thermo Scientific) è stata effettuata a 37° per 10' seguiti da 5' ad 80°. Quindi abbiamo caricato le digestioni su un gel di agarosio 1% (fig.17), e tagliato le bande di interesse. Le abbiamo eluite utilizzando il kit Macherey-Nagel PCR clean-up/ gel extraction, che permette di estrarre il DNA dai gel di agarosio, secondo il protocollo riportato dal kit.

### ***Ligazione***

La ligazione è il processo mediante il quale, grazie all'attività di una Ligasi (Thermo Scientific) due parti di DNA vengono saldate; nel nostro caso vogliamo inserire la banda contenente il gene del MiRP1 WT, in un vettore (pIRES2-eGFP). Il vettore "vuoto" è lungo 5308bp, la banda contenente il

MiRP1 invece è 800bp. Secondo le istruzioni, si usano 90 ng di vettore e una quantità variabile di banda, a seconda della sua lunghezza; per ottenere un rapporto 1:1 banda/vettore, il calcolo da fare è il seguente:

$$\text{ng banda} = 90\text{ng vettore} \times \frac{\text{lunghezza banda}}{\text{lunghezza vettore}} \rightarrow 90 \times (800/5308) = 13.56 \text{ ng}$$

Decidiamo di ottenere un rapporto 1:5 vettore/banda.

Una volta terminata la reazione, si trasforma il costrutto così ottenuto utilizzando delle cellule competenti di *Escherichia coli*, chiamate DH5 $\alpha$ , in grado di accettare DNA plasmidico esterno.

Il giorno seguente si estrae il DNA plasmidico e si verifica che la ligazione sia avvenuta correttamente sia con una digestione di controllo che tramite sequenziamento.

### ***Tagli di controllo con enzimi di restrizione BlnI e BamHI***

Decidiamo di effettuare dei tagli con enzimi di restrizione al fine di verificare la corretta inserzione della banda contenente il cDNA di MiRP1 nel vettore pIRES2-EGFP: utilizziamo BlnI, che riconosce un sito di restrizione all'interno del gene MiRP1, e BamHI, che taglia all'interno della sequenza del pIRES2-EGFP; calcolando la lunghezza delle bande attese dopo il taglio si ottiene: una banda a 626 bp e un'altra a 5482, se il frammento si è inserito correttamente; in caso contrario ne avrò una a 236 bp e un'altra a 5872 bp. Le condizioni in cui è avvenuta la reazione sono: 37°C per 7 minuti.

La corretta inserzione di MiRP1 è stata validata tramite sequenziamento. Per la mutagenesi di MiRP1 I57T abbiamo utilizzato il KitQuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies): dobbiamo modificare la sequenza aminoacidica di MiRP1 di una timina con una citosina in posizione 170, che determina il cambiamento del codone ATT

→ ACT, portando al cambiamento aminoacidico I→T. Questo è permesso da primers specifici che recano la sequenza mutata; abbiamo utilizzato questi primers, in particolare (in grassetto è possibile identificare la base mutata):

Forward: 5'-TCCTGTACCTCATGGT**G**ATGACTGGAATGTTCTCTTTC-3'

Reverse: 5'-GAAAGAGAACATTCCAGTCATCACCATGAGGTACAGGA-3'

La PCR è stata eseguita con i seguenti parametri:

<b>Cicli</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	95 °C	1 min
18	95 °C	50 sec
	55 °C	50 sec
	68 °C	6 min 30 sec
1	68 °C	7 min

**Tabella 5:** condizioni di PCR per la mutagenesi

La mutagenesi è stata verificata tramite sequenziamento presso la ditta Bio-Fab di Roma.

### ***Analisi elettrofisiologica della mutazione MiRP1 I57T in cellule CHO***

Per analizzare l'impatto di MiRP1 I57T sulla corrente generata dal canale hHCN4 abbiamo co-espresso transientemente i costrutti in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary), un sistema eterologo molto usato nell'ambito della ricerca biomedica e farmaceutica. In particolare le nostre tre condizioni sperimentali consistono in :

- ✓ Controllo: CHO esprimenti hHCN4 e pIRES2 EGFP "Vuoto" (che non contiene il cDNA di MiRP1);
- ✓ MiRP1 WT: CHO esprimenti hHCN4 e MiRP1 WT;
- ✓ MiRP1 I57T: CHO esprimenti H4 e MiRP1 i57T;

48 ore dopo la trasfezione abbiamo condotto degli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell per valutare l'effetto di MiRP1 WT e mutato sulla densità di corrente e sulla voltaggio dipendenza del canale hHCN4.

## ***Sequenziamento di nuova generazione***

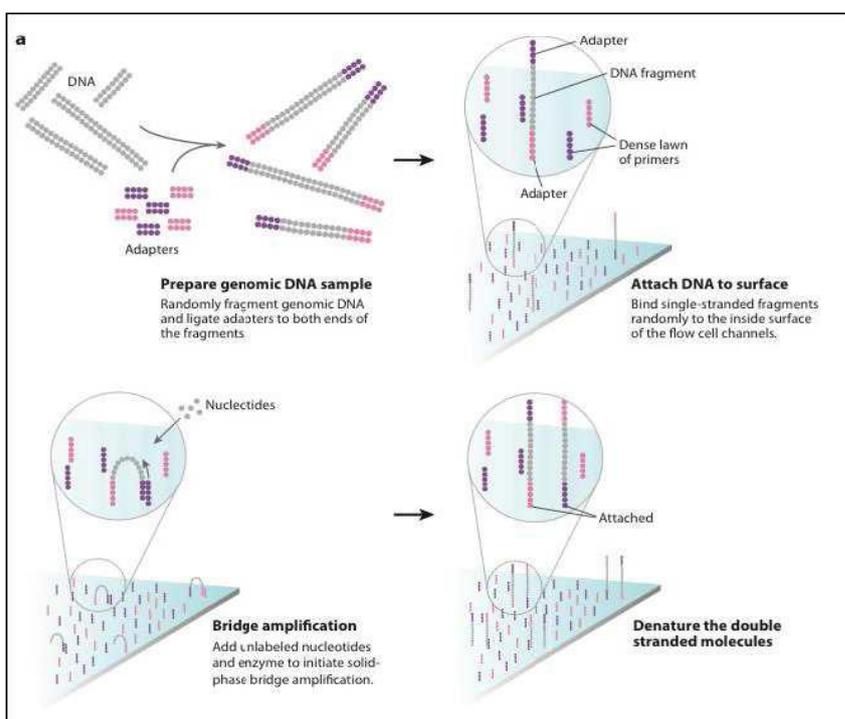
### ***(Next Generation Sequencing)***

Il Progetto Genoma Umano finanziato nel 1990 ha avuto l'obiettivo di determinare i tre miliardi di paia di basi che costituiscono il genoma umano. Ci sono voluti dieci anni per produrre una prima bozza di risultati (Lander, Linton et al., 2001) e ulteriori tre anni per completare il progetto. Durante la fase finale del progetto e i primi anni successivi, sono stati avviati numerosi studi tra cui il Progetto Internazionale HapMap ed il 1000 Genomes Project. Il primo progetto mira a sviluppare una mappa delle variazioni di sequenza del DNA umano (International HapMap Project). Il secondo si è concentrato sul sequenziamento di genomi di almeno mille partecipanti anonimi, di gruppi etnici diversi per fornire una adeguata variabilità genetica umana (Genomes). Entrambi i progetti sono stati accompagnati dalla necessità di un sequenziamento rapido, completo, affidabile ed economico di interi genomi e hanno portato allo sviluppo di nuove tecnologie di sequenziamento.

Di conseguenza, il numero di dati relativi al sequenziamento, archiviati in banche dati pubbliche, è aumentato significativamente nel corso degli ultimi anni ed è destinato a crescere ancora più velocemente. Visto che le macchine NGS per ogni corsa generano milioni di sequenze da leggere, la difficoltà nel sequenziamento è spostata dalla generazione della sequenza alla gestione e analisi dei dati. Il volume di dati rappresenta oggi una sfida importante per l'archiviazione, il backup e, soprattutto, l'analisi.

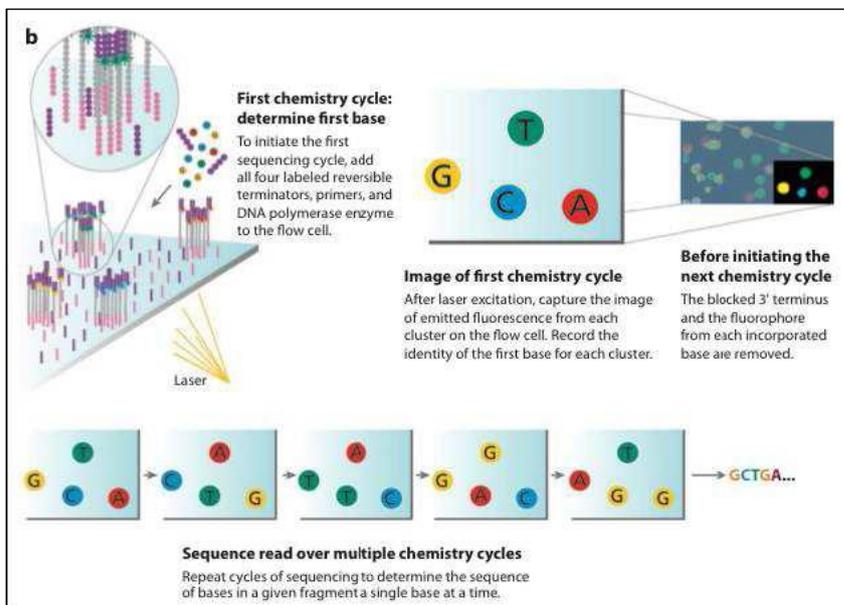
Tra le varie piattaforme di lavoro il laboratorio di Genetica Molecolare dell'Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII di Bergamo utilizza la

tecnologia Illumina. Questa è in grado di sequenziare la libreria di DNA ottenuta attraverso la tagmentazione che prevede la generazione di frammenti a singolo filamento in maniera random a cui vengono legati degli adattatori, ottenendo così frammenti di lunghezza fino a di diverse centinaia di coppie di basi (bp). Gli adattatori inseriti sono complementari alle sequenze presenti sulla flowcell di sequenziamento e, durante la cosiddetta fase di “Cluster Generation” avviene un’amplificazione a ponte delle sequenze target arricchite. (Mardis 2008) (Fig.9).



**Figura 9:** Illumina Genome Analyzer “Solexa” Workflow

In questo approccio, primers di PCR sono legati ad un substrato solido da un linker flessibile in modo tale che tutti gli ampliconi derivanti da ogni singola molecola durante l'amplificazione rimangono immobilizzati e raggruppati in un unico luogo fisico sul supporto stesso.



**Figura 10:** Illumina Genome Analyzer “Solexa” Workflow.

Sulla piattaforma Illumina, “l’amplificazione a ponte” avviene grazie all’alternanza tra cicli di estensione mediati da polimerasi e cicli di denaturazione con formamide. Ne risulta quindi la formazione di clusters, ognuno dei quali consiste in circa mille cloni amplificati. Dopo la generazione dei clusters, gli ampliconi sono a singolo filamento (linearizzazione) e un primer di sequenziamento viene ibridato ad una sequenza universale (adattatori) fiancheggiante la regione di interesse. Ogni ciclo di sequenza consiste nell’estensione di una singola base con una DNA polimerasi modificata e una miscela di quattro nucleotidi. La lunghezza delle sequenze lette sono limitate da molteplici fattori che causano il decadimento del segnale e il defasamento, come scissione incompleta delle etichette fluorescenti o frazioni di terminazione. Il tipo di errore dominante è la sostituzione, anziché inserzioni o delezioni. La media del tasso di errore è nell’ordine di 1-1,5%, ma le basi di maggiore precisione con un tasso di errore di 0.1% o meno, possono essere identificate attraverso metriche di qualità associate a ciascuna base-call. La creazione di una banca dati delle SNV comuni degli esoni umani, come il dbSNP, il Progetto HapMap, il 1000 Genomes Project e altri dati di sequenziamento dell’esoma permette ai ricercatori di controllare e

distinguere se le SNV identificate possono essere o meno patogenetiche. Questo si è dimostrato efficace sia per filtrare un numero consistente di varianti con bassa probabilità di essere causative, sia nel riconoscere quelle varianti potenzialmente causative delle malattie mendeliane.

Nonostante la diminuzione dei costi di sequenziamento, le spese di routine per ottenere e analizzare i genomi completi di un gran numero di individui rimangono molto elevati (Hedges, Burges et al. 2009). Il sequenziamento di tutte le regioni codificanti del genoma, indicato anche come exome sequencing, è il candidato promettente: l'esoma costituisce circa l'1% del genoma umano richiedendo la sequenza di sole 30 Mb circa, il whole exome sequencing è solo 1/20 rispetto al whole genome sequencing.

I polimorfismi dei singoli nucleotidi (SNPs) che si verificano nelle regioni codificanti, sono le cause più comuni per le malattie mendeliane (Horner, Pavesi et al. 2010). Esistono molte patologie che sono di interesse sostanziale perché l'identificazione delle loro basi genetiche fornisce importanti conoscenze sui meccanismi della malattia, pathway proteici e potenziali bersagli terapeutici. L'identificazione delle variazioni del singolo nucleotide, SNVs, per molte malattie è limitata da molteplici fattori che diminuiscono il potere delle tradizionali strategie di clonazione posizionale e spesso limita l'analisi a geni candidati identificati a priori. Al contrario, l'approfondito risequenziamento di tutti i geni umani per la scoperta di varianti alleliche potrebbe identificare i geni coinvolti nella patologia.

In questa parte del mio lavoro sono state selezionate due famiglie che abbiamo ritenuto interessante indagare ulteriormente: la prima è composta da persone che presentano bradicardia e fibrillazione atriale e la seconda da persone che presentano tachicardia e fibrillazione atriale. Abbiamo estratto il DNA genomico da sangue o dalla mucosa boccale dei probandi delle due famiglie e, dopo la preparazione dei campioni (tagmentazione, arricchimento e sequenziamento) si è proceduto con l'analisi bioinformatica.

Le sequenze sono state allineate verso il genoma umano di riferimento (GRCh37/hg19) e quindi sono state processate applicando diversi tipi di

filtraggio che, a seconda dei casi, sono stati utilizzati in maniera sequenziale o indipendentemente l'uno dall'altro.

Tutte la varianti potenzialmente patogenetiche identificate sono state confermate tramite sequenziamento Sanger su una diversa aliquota di DNA del paziente.

## RISULTATI

La corrente I<sub>f</sub> è essenziale nella generazione e nel controllo della frequenza cardiaca, quindi eventuali alterazioni nei geni codificanti per i canali hHCN ed in particolare dell'isoforma hHCN4 potrebbero essere causa di patologie cardiache. Allo scopo di trovare polimorfismi e/o mutazioni nel gene hHCN4, è stato effettuato lo screening della sequenza codificante di tale gene in pazienti affetti da aritmie: bradicardia sinusale (n = 111), tachicardia sinusale (n = 40) e fibrillazione atriale (n = 17).

Il materiale genetico è stato ottenuto da sangue e saliva attraverso estrazione con kit commerciale Gentra® Puregene Blood Kit. Gli 8 esoni del gene hHCN4 sono stati suddivisi in 20 ampliconi e amplificati mediante reazioni di PCR. Per individuare le mutazioni è stata utilizzata la SSCP, che prevede la corsa elettroforetica degli amplificati, previa denaturazione, in gel di poliacrilammide al 6%. I pattern di corsa di ogni campione, visibili in seguito a colorazione "silver staining", sono diversi a seconda della mobilità elettroforetica del frammento a singola elica; la presenza di un pattern di corsa diverso da quello del frammento wild type indica la possibile presenza di una mutazione, verificata poi tramite sequenziamento.

Nell'analisi del gene hHCN4 è stata posta l'attenzione su polimorfismi e/o mutazioni osservate nelle regioni codificanti e nelle zone introniche fiancheggianti l'esone.

Di seguito è riportata la sequenza della regione codificante di hHCN4 (riferimento gene: ID: 10021, riferimento mRNA: NM 005477.1; riferimento proteina: NP 005468.1), indicando nella sequenza tutti gli SNPs individuati nei pazienti studiati (fig. 11).

## hHCN4-cDNA

ctg (L12L)

atggacaagctgccgccgtccatgcgcaagcggctctacagcctcccgcagcaggtgggggccaaggcg  
M D K L P P S M R K R L Y S L P Q Q V G A K A  
tacctgttcgacggcggcaggtacgcgttcgccgagatgtcggagggcgctcgtccacccccggttcgcg

gag (G36E)

tggatcatggacgaggaagaggacgccgaggaggaggggggccgggggcccgaagaccccagccgagc  
W I M D E E E D A E E E G A G G R Q D P S R R 46  
acctagtacctgctccttctcctgcggtcctcctcccccgccccggcggttctggggtcggcgctcc

agcatccgggtgcgggcactgccctcgccctccccctcggcgggcgggggtggcacggagtcccggagc  
S I R L R P L P S P S P S A A A G G T E S R S 69  
tcgtaggccgacgccggtgacgggagcgggagggggagcccgggcgcccaccgtgctcagggcctcg

tcggcctcggggcagcggacagcgaagggccggcccggcgggcgggcaagtccagcacgaacggcgac  
S A L G A A D S E G P A R G A G K S S T N G D 92  
agccgggagccccgctcgctgtcgcttcccggccggggcgccgcccgttcaggtcgtgcttgccgctg

tgcaggcgcttccgcgggagcctggcctcgctgggcagccggggcgggcggcagcggcgccaggggagc  
C R R F R G S L A S L G S R G G G S G G T G S 115  
acgtccgcaaggcgccctcggaccggagcgaccctcggccccgcccgcgtcgccgctgcccctcg

ggcagcagtcacggacacctgcatgactccgcgaggagcggcggtcatcgccgagggcgacgcgtcc  
G S S H G H L H D S A E E R R L I A E G D A S 138  
ccgtcgtcagtgctgtggacgtactgaggcctcctcgcgcccagtagcggctcccgcgtgcgcagg

(P152P) ccg

ccccggcagggacaggacgccccaggcctggcgggcggagcccgagcggccccggcgccctcggcgagccc  
P G E D R T P P G L A A E P E R P G A S A Q P 161  
gggcccgtcctgtcctgcggggggtccggaccgcccggctcgggctcggggggcggggagccgcgtcggg

gcagcctcggccgcccggccccagcagccaccgagccggcctccgcctcctgagcagccctcgggtg  
A A S P P P P Q Q P P Q P A S A S C E Q P S V 184  
cgtcggagcggcgggcgggggtcgtcgggtggcgtcggccggaggcggagacgtcgtcgggagccac

gacaccgctatcaaagtggagggaggcggcgtgcccggcaccagatcctcccggaggccgaggtgccc  
D T A I K V E G G A A A G D Q I L P E A E V R 207  
ctgtggcgatagtttacctccctccgcgcccagggcgtggtctaggagggcctcgggtccacgcg

ctggggcaggccggcttcatgcagcggcagttcggggccatgctccaaccgggggtcaacaaattctcc  
L G Q A G F M Q R Q F G A M L Q P G V N K F S 230  
gaccgggtccggccgaagtacgtcgcggtcaagccccgggtacgaggttggggcccagttgtttaagagg

ctaaggatgttcggcagccagaaaagcgtggagcgcgaacaggagaggggtcaagtcggccggattttgg  
L R M F G S Q K A V E R E Q E R V K S A G F W 253  
gattcctacaagccgtcgggtctttcggcacctcgcgcttgcctcctcccagttcagccggcctaaaacc

attatccaccctacagtgacttcagattttactgggacctgacctgctgctgctgatggtggaaac S1  
I I H P Y S D F R F Y W D L T M L L L M V G N 276  
taataggtggggatgtcactgaagtctaaaatgaccctggactgggtacgacgacgactaccaccctttg

ctgattatcattcctgtgggcatcaccttcttcaaggatgagaacaccacaccctggattgtcttcaat S2  
L I I I P V G I T F F K D E N T T P W I V F N 299  
gactaatagtaaggacaccctagtggaagaagttcctactcttgtggtgtgggacctaacagaagtta

gtgggtgtcagacacattcttctcatcgacttggctcctcaactccgcacagggatcgtgggtggaggac  
V V S D T F F L I D L V L N F R T G I V V E D 322  
caccacagtctgtgtaagaaggagtagctgaaccaggagttgaaggcgtgtccctagcaccacctctg

aacacagagatcatcctggaccgcagcggattaaaatgaagtacctgaaaagctgggttcatggtagat **S3**  
N T E I I L D P Q R I K M K Y L K S W F M V D 345  
ttgtgtctctagtaggacctgggcgtcgcctaattttacttcatggacttttcgaccaagtaccatcta

ttcatttctccatccccgtggactacatcttctcattgtggagacacgcatcgactcggaggtctac  
F I S S I P V D Y I F L I V E T R I D S E V Y 368  
aagtaaaggaggttaggggacactgatgtagaaggagtaacacctctgtgcgtagctgagcctccagatg

aagactgcccgggcccctgcgcatgtccgcttcacgaagatcctcagcctcttacgcctgttacgcctc **S4**  
K T A R A L R I V R F T K I L S L L R L L R L 391  
ttctgacgggcccgggacgcgtaacaggcgaagtgttcttaggagtcggagaatgctggacaatgctggag

tcccgctcattcgatatattcaccagtgggaagagatcttccacatgacctacgacctggccagcgc  
S R L I R Y I H Q W E E I F H M T Y D L A S A 414  
agggcgagtaagctatataagtggtcacccttctctagaagggtgactggatgctggaccgggtcgcgg

gtgggtgcgcatcgtgaacctcatcggcatgatgctcctgctctgccactgggacggctgctcagttc **S5**  
V V R I V N L I G M M L L L C H W D G C L Q F 437  
caccacgcgtagcacttggagtagccgtactacgaggacgagacgggtgacctgcccagcgacgtcaag

ctggtaacctatgctacaggacttccctgacgactgctgggtgtccatcaacaacatggtgaaactcc  
L V P M L Q D F P D D C W V S I N N M V N N S 460  
gaccatgggtacgatgtcctgaagggactgctgacgacctacaggtagttgttaccacttgttgagg

tgggggaagcagtactcctacgcgctcttcaaggccatgagccacatgctgtgcatcggctacggg  
**PORO**  
W G K Q Y S Y A L F K A M S H M L C I G Y G R 483  
accccttctgcatgaggatgctgcgagaagtccgggtactcgggtgtacgacacgtagccgatgcccgcc

caggcgcggcgtgggcatgtccgacgtctggctcaccatgctcagcatgatcgtgggtgccacctgctac **S6**  
Q A P V G M S D V W L T M L S M I V G A T C Y 506  
gtccgcgggcaccgctacaggctgcagaccgagtggtacgactcgtactagcaccacgggtggacgatg

gccatgttcattggccacgccactgccctcatccagtcctggactcctcccggcgcagtagcaggaa  
**(L520L)** ttg **ca** **(R524Q)** **C-Linker**  
A M F I G H A T A L I Q S L D S S R R Q Y Q E 529  
cggtagaagtaaccggtgctggtgacgggagtaggtcaggacactgaggagggccgctgcatggtcctt

aagtacaagcaggtggagcagtagcatgtcctttcacaagctcccggccgacaccggcagcgcacccac  
K Y K Q V E Q Y M S F H K L P P D T R Q R I H 552  
ttcatgttctgaccctcgtcatgtacaggaaagtgttcgagggcgggctgtgggcccgtcgcgtaggtg

gactactacgagcaccgctaccagggcaagatgttcgacgaggagagcactcctgggagcagtaagcag  
D Y Y E H R Y Q G K M F D E E S I L G E L S E 575  
ctgatgatgctcgtggcgatggtcccgttctacaagctgctcctctcgtagaccgcctcgattcgtc

ccctgcccggaggagatcatcaactttaactgtcgggaagctgggtggcctccatgccactgtttgccaa  
P L R E E I I N F N C R K L V A S M P L F A N 598  
ggggacgccctcctctagtagttgaaattgacagccttcgaccaccggaggtacgggtgacaaacggtta

**CNBD**

cgggaccccaacttcgtgacgtccatgctgaccaagctgcgtttcgaggcttccagcctggggactac  
A D P N F V T S M L T K L R F E V F Q P G D Y 621  
cgctgggggttgaagcactgcaggtacgactggttcgacgcaaagctccagaaggtcggacccctgatg

atcatccgggaaggcaccattggcaagaagatgtacttcatccagcatggcgtgggtcagcgtgctcacc  
I I R E G T I G K K M Y F I Q H G V V S V L T 644  
tagtaggccttccgtggtaaccgttcttctacatgaagtaggtcgtaccgcaccagtcgcacgagtgg

aagggaacaaggagaccaagctggccgacggctcctactttggagagatctgcctgctgaccggggc  
K G N K E T K L A D G S Y F G E I C L L T R G 667  
ttcccggttctcctctggttcgaccggctgccgaggatgaaacctctctagacggacgactgggccccg

cgcgacagccagcgtgagggccgacacactactgccgcctctactcgtgagcgtggacaacttcaat  
R R T A S V R A D T Y C R L Y S L S V D N F N 690  
gccgctgtcggtcgcactcccggctgtggatgacggcggagatgagcactcgcacctgttgaagtta

gaggtgctggaggagtacccatgatgcgaagggccttcgagaccgtggcgtggaccgctggaccgc  
E V L E E Y P M M R R A F E T V A L D R L D R 713  
ctccacgacctcctcatggggtactacgttcccggagctctggaccgcgacctggcggacctggcg

attggcaagaagaactccatcctcctccacaaagtccagcagcactcaactccggcgtcttcaactac **C-TER**  
I G K K N S I L L H K V Q H D L N S G V F N Y 736  
taaccgttcttcttgaggtaggaggaggtgtttcaggctcgtgctggagttgaggccgcagaagttgatg

caggagaatgagatcatccagcagattgtgcagcatgaccgggagatggcccactgcgcgcaccgcgtc  
Q E N E I I Q Q I V Q H D R E M A H C A H R V 759  
gtcctcttactctagtaggtcgtctaacacgtcgtactggccctctaccgggtgacgcgcgtggcgcag

caggctgctgcctctgccaccccaacccccacgcccgtcatctggaccccgtgatccaggcaccactg  
Q A A A S A T P T P T P V I W T P L I Q A P L 782  
Gtccgacgacggagacggtggggttgggggtcggggcagtagacctggggcactaggtccgtggtgac

caggctgccgctgccaccacttctgtggccatagccctcaccaccaccctcgccctgcctgctgccatc  
Q A A A A T T S V A I A L T H H P R L P A A I 805  
gtccgacggcgacggtggtgaagacaccggtatcgggagtggtgggtgggagcggacggacgacggtag

ttccgcccctccccaggatctgggctgggcaacctcgggtgccgggcagacgccaaggcactgaaacgg  
F R P P P G S G L G N L G A G Q T P R H L K R 828  
aaggcgggaggggtcctagacccgacctgtggagccacggcccgtctgcggttccgtggactttgcc

ctgcagtccctgatcccttctgcgctgggctccgcctcgcccggcagcagcccgtcccagggtggacaca  
L Q S L I P S A L G S A S P A S S P S Q V D T 851  
gacgtcagggactagggaaagacgcgacccgaggcggagcggcggtcgtcgggcaggggtccacctgtg  
cca **(P852P)**

ccgtcttcatcctccttccacatccaacagctggctggattctctgccccgctggactgagcccactc  
P S S S S F H I Q Q L A G F S A P A G L S P L 874  
ggcagaagtaggaggaaggtgtaggtgtcgcaccgacctaaagacgggggcgacctgactcgggtgag

ctgccctcatccagctcctccccacccccggggcctgtggctccccctcggtcccacaccatcagct  
L P S S S S S P P P G A C G S P S A P T P S A 897  
gacgggagtaggtcagaggaggggtggggggccccggacaccgagggggagccgaggggtgtggtagtcga

ggcgtagccgccaccaccatagccgggtttggccacttccacaaggcgtgggtggctccctgtcctcc  
G V A A T T I A G F G H F H K A L G G S L S S 920  
ccgcatcggcgggtggtatcggcccaaaccggtgaaggtgtccgcgaccaccgagggacaggagg

tccgactctcccctgctcaccggcgtgcagccaggcggccgctccccgcaggctgccagccatctccc  
S D S P L L T P L Q P G A R S P Q A A Q P S P 943  
aggctgagagggggacgagtgggggcagctcggctccgcgggcagggggcgtccgacgggtcggtagagg

gcgccacccggggcccggggaggcctgggactcccggagcacttccctgccacccccaccctcatccaga  
 A P P G A R G G L G L P E H F L P P P P S S R 966  
 cgcggtgggccccgggcccctccggaccctgagggcctcgtgaaggacggtgggggtgggagtaggtct

tccccgtcatctagccccgggcagctgggcccagcctcccggggagttgtccctaggtctggccactggc  
 S P S S S P G Q L G Q P P G E L S L G L A T G 989  
 aggggcagtagatcggggcccgtcgaccggctcggaggggcccctcaacagggatccagaccggtgaccg

ccaactgagcagccagagacacccccacggcagcctgagccgcccgtcccttgtggcaggggctctggg  
 P L S T P E T P P R Q P E P P S L V A G A S G 1012  
 ggtgactcgtgcggtctctgtgggggtgccgtcggactcggcggcaggggaacaccgtccccggagacc

ggggcttcccctgtaggctttactccccgaggaggtctcagccccctggccacagcccaggcccccca  
 G A S P V G F T P R G G L S P P G H S P G P P 1035  
 ccccgaaagggacatccgaaatgaggggctcctccagagtcggggggaccggtgtcgggtccgggggt

agaaccttcccagagtgcctccgccccgggcctctggctcccacggatccttgctcctgccacctgcatcc  
 R T F P S A P P R A S G S H G S L L L P P A S 1058  
 tcttgaagggtcacggggcggggcccggagaccgaggggtgcttaggaacgaggacggtggacgtagg

agccccaccaccccaggtccccagcgcggggcacacccccgctcacccccggccgctcaccag  
 S P P P P Q V P Q R R G T P P L T P G R L T Q 1081  
 tcggggggtggtgggtccagggggtcgcggccccgtgtgggggagtgggggccgggagtggtg

gacctcaagctcatctccgctctcagccagcctgcctcaggacggggcgagactctccgagagcc  
 D L K L I S A S Q P A L P Q D G A Q T L R R A 1104  
 ctggagttcgagtagaggcgcagagtcggtcgggacggagtcctgccccgctctgagaggcgtctcgg

gtg (M1113V)  
 tccccgcaactcctcaggggagtcctatggctgccttcccgtcttcccagggtgggggtggcagcggg  
 S **P** H S S G E S **M** A A F **P** L F P R A G G G S G 1127  
 aggggcgtaggagtcctcaggtaccgacggaaggcgagaagggtcccgacccccaccgtcggcc

ggcagtgaggagcagcgggggctcgtccccctgggagggcctatggtgccatccccggccagcagtc  
 G S G S S G G L G P P G R P Y G A I P G Q H V 1150  
 ccgtcaccctcgtcggccccggagccagggggaccctccgggataccacggtaggggcccgtcgtgacg

actctgcctcgggaagacatcctcaggttctttgccacccccctctgtctttgtttggggcaagagccacc  
 T L P R K T S S G S L P P P L S L F G A R A T 1173  
 tgagacggagccttctgtaggagtcacaagaacggtgggggagacagaacaacccccgttctcgggtg

tcttctggggggccccctctgactgctggaccccagagggaaacctggggccaggcctgagccagtgccg  
 S S G G P P L T A G P Q R E P G A R P E P V R 1196  
 agaagacccccgggggagactgacgacctgggggtctcccttgacccccggtccggactcgggtcacg

cca (P1200P)  
 tccaaactgcccgtccaatctatga  
 S K L **P** S N L - 1203  
 aggtttgacggcaggttagatact

**Figura 11:** Sequenza codificante del gene hHCN4. Evidenziati in giallo gli SNPs individuati nello *screening* con la corrispondente sostituzione aminoacidica. In due tonalità di grigio sono i diversi esoni, bordati in nero i segmenti transmembrana, bordato in rosa il poro, in *bold* il CNBD (Ludwig et al. 1999)

Abbiamo confrontato i nostri risultati con la banca dati di SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) di NCBI (dbSNPs), che raccoglie informazioni su

tutti i polimorfismi documentati all'interno di vari organismi. Gli SNPs sono definiti come variazioni specifiche di una singola base presenti nel genoma di un individuo e con una frequenza maggiore dell'1% all'interno di una popolazione. Il database riporta, per il gene hHCN4, una serie di variazioni presenti nella regione codificante, localizzate principalmente nella zona N- e C-terminale. Inoltre sono riportati anche numerosi polimorfismi negli introni e nel 3'UTR. Nel database sono presenti degli SNPs che abbiamo individuato frequentemente negli individui del nostro screening. Alcuni di questi SNPs ricorrono frequentemente in tutti gli individui dello screening, compresi i controlli. Altri SNPs sono stati identificati solo in alcuni casi isolati. Nei casi in cui abbiamo individuato uno SNP non-sinonimo nella sequenza codificante di HCN4 e la famiglia del probando ha dato il consenso per estendere l'analisi genetica ad altri membri, abbiamo verificato se vi fosse cosegregazione della variante mutata con la patologia all'interno della famiglia. L'analisi genetica svolta ha portato all'identificazione di 8 polimorfismi nella sequenza codificante di hHCN4 in un totale di 168 pazienti (tab. 5): 5 sostituzioni nucleotidiche individuate non determinano un cambio aminoacidico (sinonime), mentre 3 danno origine ad una tripletta che codifica per un aminoacido diverso (non sinonime), mutazione missenso. Le sostituzioni individuate si localizzano negli esoni 1 (n=3), 4 (n=2) e 8 (n=3).

Nell'esone 1 a livello dell'N-terminale sono state trovate due variazioni sinonime (L12L e P152P) e un missenso (G36E). L12L (leucina) e P152P (prolina) sono state trovate rispettivamente in un paziente bradicardico e in un tachicardico. G36E (glicina > glutammato) è stata riscontrata in 9 pazienti affetti da bradicardia, in 2 pazienti tachicardici e in altrettanti colpiti da fibrillazione atriale.

Nell'esone 4 a livello del sesto segmento transmembrana (S6) è stata trovata una variazione sinonima (L520L), mentre a livello del C-linker è stata individuato il missenso non conservativo R524Q (approfondito in seguito). L520L è un polimorfismo riscontrato in 13 bradicardici, 4 tachicardici e 3 pazienti affetti da FA, oltre che in controlli sani. Nell'esone 8, che include tutto il C-terminale, sono state trovate due variazioni

sinonime (P852P e P1200P). P852P (prolina) è stata riscontrata in due pazienti affetti da TS e in uno colpito da FA, mentre P1200P (prolina) è stata ritrovata nelle varie tipologie in molti pazienti.

Le variazioni aminoacidiche risultano presenti nella banca dati degli SNPs. Alcuni di questi SNPs sono presenti in individui appartenenti a tutti e tre i tipi di patologie e anche in alcuni controlli sani. Altri SNPs sono stati individuati in più di una patologia, mentre alcuni sono stati identificati in un solo individuo affetto da una patologia specifica.

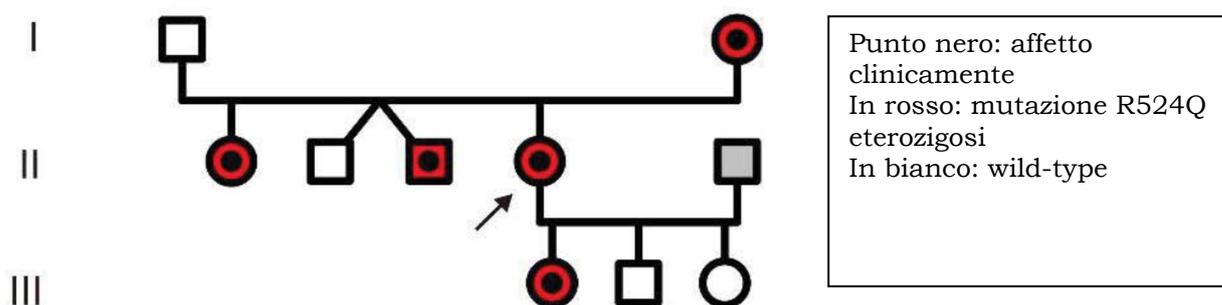
Posizione	Esone	Posizione nell'mRNA	Eventuale cambio aminoacidico	N° di SNPs nei pazienti dello screening			presenza nei dbSNP
				B.S. n=111	T.S. n=40	F.A. n=17	
<b>N-TER</b>	<b>1</b>	36 <b>C&gt;G</b>	<b>L12L</b>	1			rs201193660 (0,3%)
		108 <b>G&gt;A</b>	<b>G36E</b>	9	2	2	rs62641690 (6,13%)
		456 <b>C&gt;G</b>	<b>P152P</b>		1		-
<b>S6</b>	<b>4</b>	1558 <b>C&gt;T</b>	<b>L520L</b>	13	4	3	rs200033529 (8,56%)
<b>C-linker</b>		1571 <b>G&gt;A</b>	<b>R524Q</b>		1		rs199852438 (0,002%)
<b>C-TER</b>	<b>8</b>	2556 <b>G&gt;A</b>	<b>P852P</b>		2	1	rs117819825 (2,76%)
		3337 <b>A&gt;G</b>	<b>M1113V</b>	4	2		rs142735148 (2,47%)
		3600 <b>A&gt;G</b>	<b>P1200P</b>	14	5	2	rs529004 (14,04%)

**Tabella 5:** Elenco degli SNPs individuati nello *screening* su pazienti affetti da bradicardia sinusale (B.S.), tachicardia sinusale (T.S.) e fibrillazione atriale (F.A.). È indicata la localizzazione della mutazione in HCN4.

È stata individuata una mutazione in eterozigosi, la R524Q (collocata sull'esone 4, posizione 1571G>A dell'mRNA, codone CGG>CAG), che presenta familiarità (fig.12). Si tratta di una mutazione missenso non

conservativa che porta alla sostituzione di un'arginina (R) (aminoacido carico basico) in una glutammina (Q) (aminoacido polare neutro), determinando quindi la perdita di una carica positiva. R524 si trova nella parte iniziale del C-linker, importante regione che collega l'ultimo dominio transmembrana (S6) al CNBD.

La mutazione è stata riscontrata inizialmente in una sola paziente (probando con familiarità) affetta da tachicardia sinusale (F2, 4).



**Figura 12 :** Albero genealogico della famiglia in studio caratterizzata da tachicardia sinusale. Legenda: □ Maschio; ○ Femmina; F: generazione. F2, freccia: probando

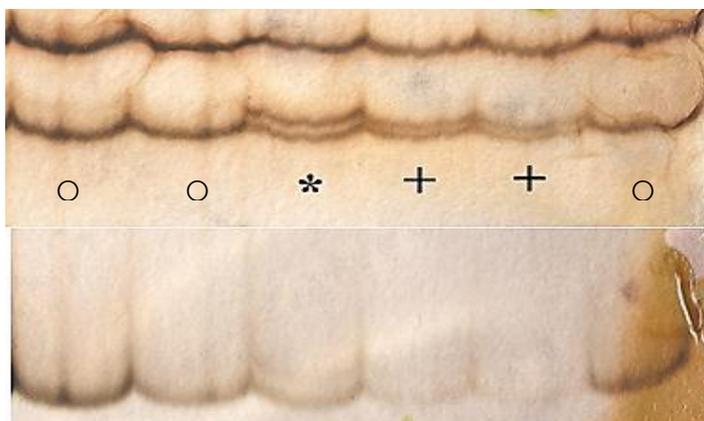
L'elettrocardiogramma Holter mostra una frequenza cardiaca tendenzialmente elevata con fasi di spiccata tachicardia sinusale (183 b.p.m), alterna periodi caratterizzati da tachicardia sinusale alternati a mesi di ritmo sinusale normofrequente e benessere soggettivo.

In seguito lo screening è stato esteso anche agli altri membri della famiglia (n=7, escluso F2, 5 perché esterno alla famiglia), riscontrando la mutazione in altri 4 famigliari, 3 dei quali affetti clinicamente: F1, 1 non è portatore della mutazione, non ha malattie cardiovascolari e l'elettrocardiogramma a riposo è nella norma; F1, 2 è portatore della mutazione e l'ECG a riposo mostra la presenza di tachicardia sinusale (100 bpm); F2, 1 è portatore della mutazione e l'elettrocardiogramma Holter mostra degli eventi rapidi con una frequenza cardiaca accelerata (fino a 145 bpm); F2, 2 non presenta una storia di patologia cardiologica e

non è portatore della mutazione; F2, 3 (gemello di F2, 2) è portatore della mutazione ed ha un complesso quadro clinico con episodi di sindrome bradi-tachi; F3, 1 è portatore della mutazione, questa ragazza, figlia del probando, presenta all'Holter segni di tachicardia anomala non correlati ad alcun tipo di stress; F3, 2 e 3 non sono portatori della mutazione e non presentano una storia di patologia cardiologica.

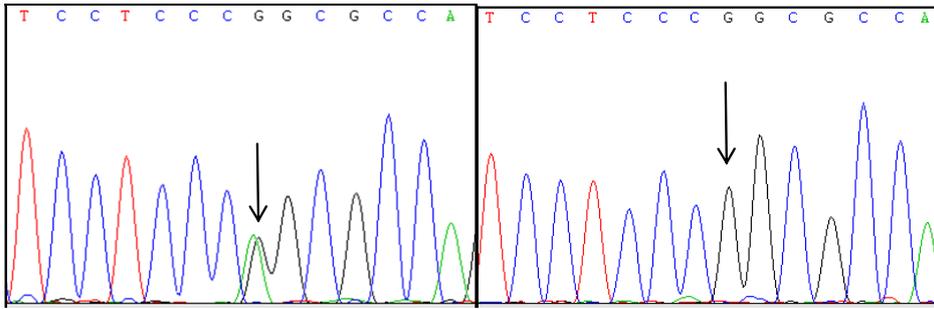
La stessa mutazione è risultata assente in 200 controlli su DNA di persone sane non imparentate con la famiglia in studio; nei controlli è stato rilevato il polimorfismo L520L (sinonimo) che non ha correlazioni con nessuna patologia. Sia per quanto riguarda lo studio della mutazione R524Q nella famiglia che per l'analisi dei controlli è stata effettuata un'analisi PCR-SSCP seguita da sequenziamento per confermare la presenza della mutazione.

Nella figura 13, rappresentante il risultato della SSCP, si possono notare tre differenti pattern di corsa: pattern wild type (○), pattern della mutazione in eterozigosi R524Q (\*) e pattern della mutazione in eterozigosi della mutazione L520L (+).



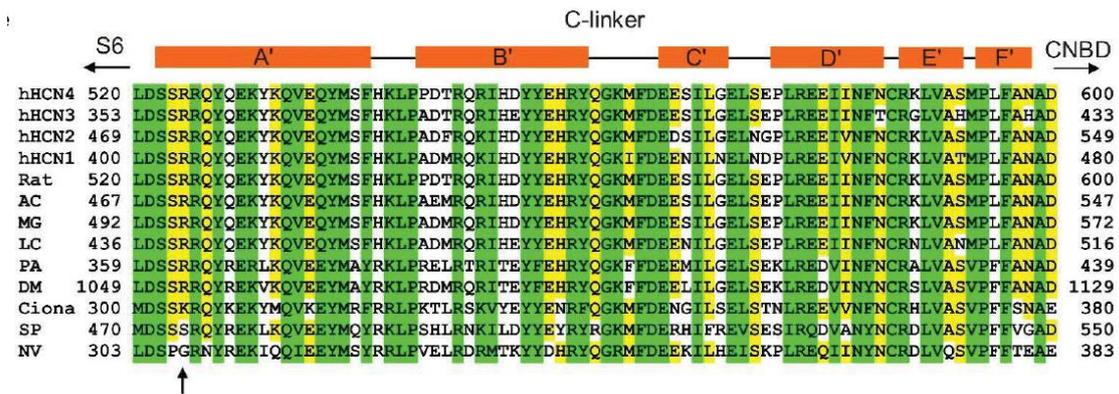
**Figura 13:** Pattern di corsa su SSCP di campioni *wild type* (○), eterozigote per R524Q (\*) ed eterozigote per L520L (+).

Nella figura 14, rappresentante l'elettroferogramma, si nota il doppio picco (indicato dalla freccia) della mutazione in eterozigosi R524Q (fig. 14, A), assente invece nel wild type (fig. 14, B).



**Figura 14:** A. Sequenziamento di un eterozigote per R524Q, la freccia indica la transizione G>A B. Sequenziamento di un *wild type*, la freccia indica l'assenza della transizione.

La mutazione R524Q è risultata molto interessante, è conservata nelle varie isoforme e nelle regioni omologhe delle varie specie.



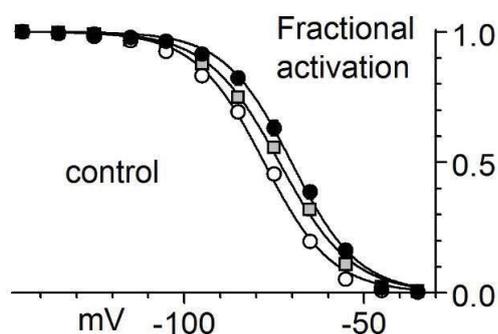
**Figura 15:** Allineamento della regione del C-linker delle varie isoforme di HCN e delle regioni corrispondenti in specie diverse: **Rat**, *Rattus norvegicus*; **AC**, *Anolis carolinensis*; **MG**, *Meleagris gallopavo*; **LC**, *Latimeria chalumnae*; **PA**, *Panulirus argus*; **DM**, *Drosophila melanogaster*; **Ciona**, *Ciona intestinalis*; **SP**, *Strongylocentrotus purpuratus*; **NV**, *Nematostella vectensis*. In rosso le  $\alpha$ -eliche.

Pertanto si è deciso di procedere all'espressione eterologa del canale HCN4 mutato in omozigosi ed eterozigosi per registrazioni mediante esperimenti di patch clamp in configurazione whole-cell.

I primi esperimenti di elettrofisiologia hanno evidenziato che la corrente disponibile aumenta nel wt-R524Q e, in maniera più marcata, nel R524Q

rispetto al wt. I potenziali di mezza attivazione ( $V_{1/2}$ ), calcolati utilizzando l'equazione di Boltzmann, risultano essere:

Condizione	Valore medio $V_{1/2}$ (in mV) $\pm$ SEM
HCN4 wt (n=6)	-77.8 $\pm$ 0.4 mV
HCN4 wt-R524Q (n=4)	-73.6 $\pm$ 1.0 mV
HCN4 R524Q (n=5)	-70.2 $\pm$ 0.6 mV



**Figura 16:** Potenziali di mezza attivazione misurati nelle Hek293 per le tre condizioni: HCN4wt (cerchio bianco), eterozigote (cerchio grigio) e mutato (cerchio bianco).

I successivi esperimenti di elettrofisiologia, che non sono trattati in questa tesi, hanno dunque portato complessivamente all'identificazione di una nuova mutazione in HCN4 che è il primo esempio di "gain-of-function" associata ad un fenotipo tachicardico e più in generale ad un meccanismo che lega HCN4 alle tachiaritmie cardiache

A causa delle proprietà dei canali mutati R524Q, i nostri dati supportano l'idea che gli individui portatori di questa mutazione sono in uno stato permanente di più alta attivazione del normale canale e/o in associazione dell'accelerazione del ritmo.

## NGS

L'identificazione della mutazione causativa, oltre a permettere di individuare eventuali familiari a rischio, facilita un preciso inquadramento clinico della patologia e, in alcuni casi, può aiutare nella definizione della

prognosi e nella corretta scelta della terapia farmacologica o della strategia di prevenzione, quale l’impianto di un defibrillatore. In questi ultimi mesi ci siamo rivolti al laboratorio di Genetica Molecolare dell’Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII di Bergamo che ha introdotto tecnologie di NGS per la diagnosi molecolare delle patologie cardiovascolari ed ha sviluppato e validato un pannello di geni per queste patologie estremamente eterogenee.

ABCC9	CALR3	EMD	JUP	LAMA4	MYPN	SCN1B	TCAP
ACTA1	CASQ2	ENG	KCNA5	LAMP2	NEXN	SCN3B	TGFB3
ACTC1	CAV1	FHL1	KCND3	LDB3	NPPA	SCN4B	TMEM43
ACTN2	CAV3	FHL2	KCNE1	LMNA	NRAS	SCN5A	TMPO
AKAP9	CBL	FKTN	KCNE2	MAP2K1	PDLIM3	SGCA	TNNC1
ALK1	CHRM2	FLT1	KCNE3	MAP2K2	PKP2	SGCB	TNNI3
ANK2	CRYAB	FXN	KCNH2	MYBPC3	PLN	SGCD	TNNT2
ANKRD1	CSRP3	GATAD	KCNJ2	MYH6	PRKAG2	SGCG	TPM1
BAG3	CTF1	GJA5	KCNJ5	MYH7	PTPN11	SHOC2	TRDN
BMPR2	DES	GLA	KCNJ8	MYL2	RAF1	SMAD9	TRIM63
BRAF	DMD	GPD1L	KCNK3	MYL3	RBM20	SNTA1	TRPM4
CACNA1C	DSC2	HCN4	KCNQ1	MYLK2	RIT1	SOS1	TTN
CACNA2D1	DSP	HRAS	KRAS	MYOT	RYR1	SYNE1	TTR
CACNB2	DTNA	JPH2	LAMA2	MYOZ2	RYR2	TAZ	VCL

**Tabella 6:** Sono indicati i geni del pannello analizzati

Per identificare le varianti causative sono stati applicati diversi tipi di filtraggio che, a seconda dei casi, sono stati utilizzati in maniera sequenziale o indipendentemente l’uno dall’altro: il filtraggio clinico, genetico e funzionale.

Il filtraggio clinico si basa inizialmente sul sospetto clinico principale per cui la ricerca di varianti potenzialmente causative viene concentrata su eventuali geni specifici, nel nostro caso HCN4.

Quando questi geni sono risultati negativi per mutazioni causative vengono selezionati una serie di possibili geni candidati anche sulla base delle manifestazioni cliniche del paziente. In questo modo vengono selezionati diversi gruppi di geni che possono essere associati alla patologia con diversi gradi di probabilità. Con questo approccio può essere identificata una variante apparentemente patogenetica in un gene non strettamente correlato alle presentazioni cliniche del paziente che deve essere studiata e analizzata.

Con il filtraggio genetico sono selezionate innanzitutto le varianti che segregano con il fenotipo all'interno della famiglia.

Dopo aver analizzato il probando verranno studiati i genitori o i parenti prossimi, e le varianti saranno filtrate in base al modello di ereditarietà sospettato dall'anamnesi familiare. Per le patologie dominanti si applica un modello de novo per cui saranno eliminate tutte le varianti ereditate dai genitori sani. Per patologie recessive l'analisi verrà concentrata su mutazioni in omozigosi delle quali i genitori sono entrambi portatori, oppure sulla presenza di due mutazioni in eterozigosi non alleliche nello stesso gene (eterozigosi composta) o in geni diversi associati alla stessa patologia (doppia eterozigosi).

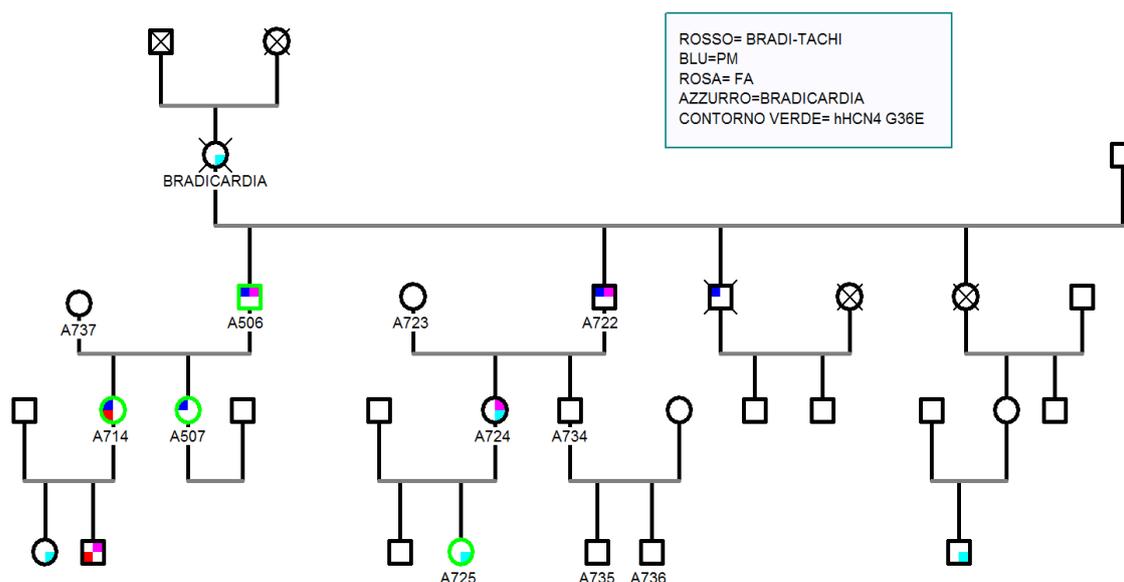
Verrà quindi effettuato un confronto con i databases pubblici (es. dbSNP) per valutare la frequenza allelica delle varianti identificate. Verranno mantenute per i successivi approfondimenti solo le varianti assenti nei databases o presenti con un MAF (mean allele frequency, frequenza con cui una data variante si verifica in una popolazione)  $< 1\%$  nel caso di sospetto di patologia a trasmissione autosomica dominante o con un MAF  $< 3\%$  nel sospetto di patologia a trasmissione autosomica recessiva.

Il filtraggio funzionale considera solo le varianti con un effetto funzionale sulla proteina (varianti missenso, nonsense, frameshift o alterazioni di splicing). Viene quindi valutata la conservazione nucleotidica e amminoacidica del residuo mutato e sono interrogati i diversi tools bioinformatici di predizione della patogenicità. Viene considerata l'espressione tissutale del gene in cui è identificata la variante ed il pathway in cui esso è coinvolto.

## Famiglie analizzate

Sono state selezionate due famiglie che abbiamo deciso di studiare in modo più approfondito utilizzando il pannello di geni coinvolti in patologie aritmiche e cardiomiopatie.

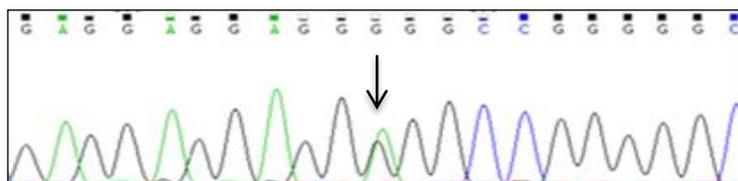
### Famiglia 1



**Figura 17:** Albero genealogico della famiglia del probando con bradicardia sinusale (A506), analizzata nello screening. Solo i soggetti che nell'albero riportano un codice A sono stati analizzati.

Questa famiglia presenta un quadro clinico eterogeneo: bradicardia, sindrome bradi-tachi, fibrillazione atriale e la presenza di impianto di pacemaker in vari componenti.

Lo screening iniziato con l'analisi del campione A506, il probando della famiglia, ha portato all'identificazione della mutazione G36E in HCN4.



**Figura 18 :** Elettroferogramma del probando recante la mutazione in eterozigosi G>A che determina la sostituzione G36E.

Questa mutazione è presente frequentemente sul database degli SNPs (0.06131) e, come precedentemente indicato, è distribuita nel nostro screening in una popolazione eterogenea di patologie aritmiche. Anche se non è ancora stata caratterizzata dal punto di vista elettrofisiologico in un sistema di espressione eterologo, riteniamo che questa non sia direttamente responsabile della patologia.

Con l'aiuto del cardiologo che si occupa del paziente abbiamo ricostruito l'albero genealogico ed insieme ai genetisti, abbiamo ritenuto questa famiglia idonea all'analisi di NGS.

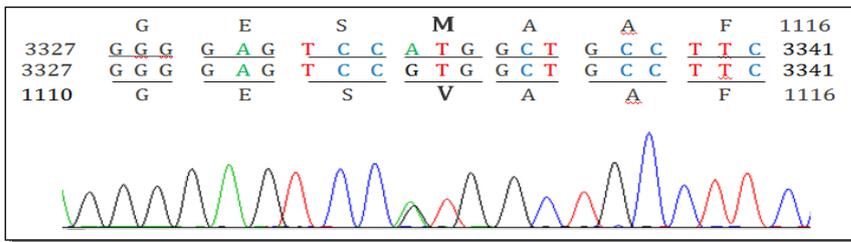
Con lo screening del pannello di geni abbiamo identificato nel campione A506 una variante nel gene MYH7 (Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta) legata alla cardiomiopatia dilatativa. Questa mutazione è già descritta nel dbSNPs con una frequenza molto bassa (0.00086%).

Il cardiologo di riferimento esclude fino ad oggi la patologia per cui dovremo capire il ruolo di questa mutazione nella famiglia oltre alla sua presenza in altri familiari. Abbiamo prelevato il sangue o fatto un tampone boccale da alcuni familiari di A506 (nella figura sono quelli che hanno un codice di riferimento) e, dopo aver estratto il DNA, verrà processato per l'analisi diretta della mutazione di MYH7.

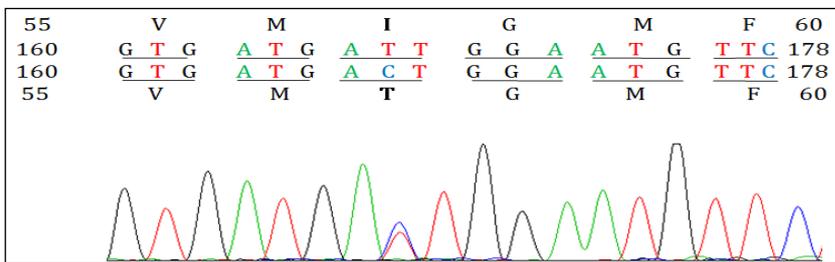
## **Famiglia 2**

Nella seconda famiglia lo screening di HCN4 ha portato all'identificazione di una mutazione al C-terminale M1113V che è presente nel dbSNPs in modo frequente (2,47%).

Con lo screening del pannello di geni è stata inoltre identificata la mutazione in MiRP1 I57T, confermata anche presso il nostro laboratorio tramite sequenziamento.



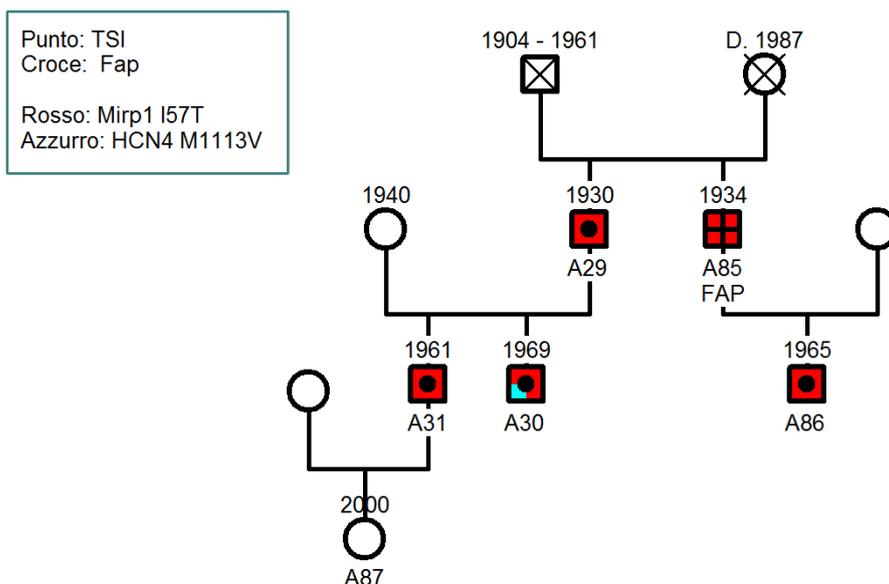
**Figura 19:** Elettroferogramma relativo al sequenziamento con del gene HCN4 del probando con tachicardia sinusale: si può notare la sostituzione di una adenina WT con una guanina in posizione 3337, che determina il cambiamento del codone ATG → GTG, che dà luogo alla mutazione M1113V in eterozigosi. In alto possiamo vedere la sequenza aminoacidica e nucleotidica WT allineate con quella mutata.



**Figura 20:** Elettroferogramma relativo al sequenziamento con del gene MiRP1 del probando con tachicardia sinusale: si può notare la sostituzione di una timina WT con una citosina in posizione 170, che determina il cambiamento del codone ATT → ACT, che dà luogo alla mutazione I57T in eterozigosi. In alto possiamo vedere la sequenza aminoacidica e nucleotidica WT allineate con quella mutata.

La mutazione I57T di MiRP1 è già stata riportata in letteratura e gli studi effettuati indicano che modifica le proprietà di varie correnti, data l'interazione di questa proteina con diversi canali ionici. Essa è presente nei database delle varianti geniche ha una MAF dello 0.08% .

Abbiamo quindi deciso di indagare la familiarità della mutazione di MiRP1 I57T e della M1113V di HCN4: per farlo abbiamo esteso lo screening dei due geni anche ai familiari del probando.



**Figura 21:** Albero genealogico della famiglia del probando con tachicardia sinusale (A30), analizzata nello screening. Solo i soggetti che nell'albero riportano un codice A sono stati analizzati. Come illustrato dalla legenda, un punto nero identifica i pazienti affetti da tachicardia sinusale (TS), mentre la croce da fibrillazione atriale (FA). Il colore rosso indica invece la presenza della mutazione MiRP1 I57T, mentre quello azzurro la mutazione di HCN4 M1113V.

Il probando (A30) è affetto da tachicardia sinusale così come il fratello e il padre, A31 e A29 e il cugino A86; il paziente A85 presenta invece una fibrillazione atriale. La nipote del probando A87, invece, ad oggi non presenta alcuna alterazione patologica del ritmo.

L'analisi genetica ha evidenziato la presenza della mutazione I57T a carico di MiRP1 in tutti i membri della famiglia affetti da una patologia cardiaca (Tachicardia sinusale o Fibrillazione atriale) e l'assenza di questa mutazione in A87. Al fine di determinare se anche gli altri membri della famiglia, oltre al probando, fossero portatori della mutazione M1113V di HCN4, abbiamo effettuato lo screening dell'esone 8 di tale gene, in tutti i familiari. Abbiamo riscontrato la presenza in tutti del polimorfismo P1200P, ma nessun altro paziente presenta la mutazione M1113V.

I dati in letteratura (Sesti et al.2000, Wu et al.2010) hanno correlato la mutazione MiRP1 I57T con aritmie come la sindrome del QT-lungo e la Sindrome di Brugada, in quanto essa influisce sulla funzionalità di diversi canali ionici di potassio; nel nostro caso, la mutazione segrega con patologie di tipo sopraventricolare, perciò abbiamo deciso di analizzare il

contributo di MiRP1 I57T sulla corrente generata da HCN4, in quanto esso costituisce la subunità accessoria anche di tali canali, i quali svolgono un ruolo molto importante nell'attività delle cellule senoatriali.

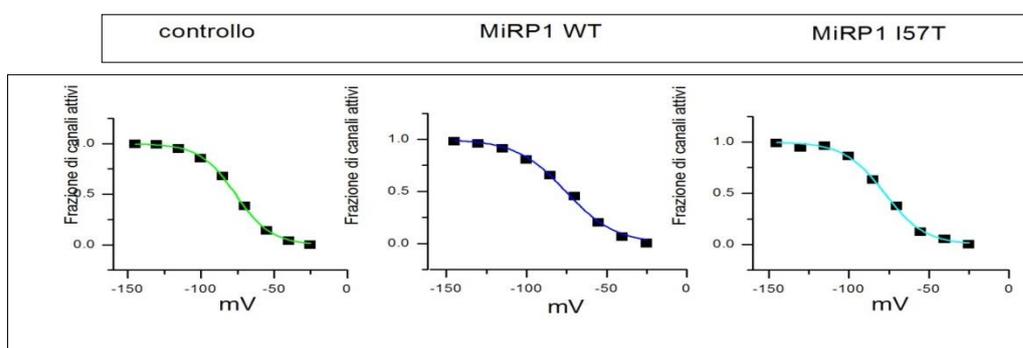
### ***Analisi elettrofisiologica della mutazione MiRP1 I57T in cellule CHO***

Per analizzare l'impatto di MiRP1 I57T sulla corrente generata dal canale hHCN4 abbiamo co-espresso transientemente i costrutti in cellule CHO. Nei primi esperimenti di elettrofisiologia abbiamo in particolare tre condizioni sperimentali:

- Controllo: CHO esprimenti hHCN4 e pIRES2 EGFP "Vuoto" (che non contiene il cDNA di MiRP1);
- MiRP1 WT: CHO esprimenti hHCN4 e MiRP1 WT;
- MiRP1 I57T: CHO esprimenti H4 e MiRP1 I57T;

48 ore dopo la trasfezione abbiamo condotto degli esperimenti di patch-clamp in configurazione whole-cell per valutare l'effetto di MiRP1 WT e mutato.

Ci siamo poi occupati della voltaggio-dipendenza del canale: per farlo abbiamo utilizzato il protocollo per generare una curva di attivazione, dalla quale abbiamo ricavato i valori medi del potenziale di mezza attivazione ( $V_{1/2}$ ) (fig.22).



**Figura 22:** Curve di attivazione esemplificative delle tre condizioni: controllo hHCN4+pIRES2 EGFP "vuoto"(verde), il cui valore di  $V_{1/2}$  è -76.4 mV; MiRP1 WT+hHCN4 (blu), con un  $V_{1/2}$  di -75.5 mV; MiRP1 I57T (azzurro), con un  $V_{1/2}$  di -77.6 mV.

Anche in questo caso non vi sono differenze statisticamente significative tra i valori medi dei voltaggi di mezza attivazione, né tra il pIRES2 EGFP “vuoto” e pIRES2 EGFP contenente MiRP1 (tabella 7).

<b>Condizione</b>	<b>Valore medio <math>V_{1/2}</math> (in mV) <math>\pm</math> SEM</b>
pIRES2 EGFP “vuoto” + HCN4 (n=10)	-73.7 $\pm$ 1.6
MiRP1 WT in pIRES2 EGFP + HCN4 (n=5)	-74.4 $\pm$ 0.4
MiRP1 I57T in pIRES2 EGFP + HCN4 (n=9)	-75.8 $\pm$ 1.6

**Tabella 7:** Valori del voltaggio di mezza attivazione medi relativi alle tre condizioni sperimentali. Non vi sono differenze statisticamente significative tra i valori, in nessuno dei tre casi. SEM (*standard error of mean*) è l'errore standard della media.

## **DISCUSSIONE**

Le patologie cardiovascolari sono ampiamente diffuse e costituiscono una delle principali cause di morte nel mondo occidentale. Per il loro impatto socio-economico sono quindi oggetto di ricerche volte a identificarne con precisione le cause con il fine di stabilire una strategia terapeutica e preventiva. Molte ricerche hanno ormai chiarito come le caratteristiche genetiche di un soggetto possano costituire un background predisponente all'insorgenza di varie patologie tra cui le aritmie cardiache.

Un approccio molto importante per capire le basi molecolari di un determinato processo patologico è focalizzare l'attenzione sui suoi aspetti genetici. L'ereditarietà di una malattia di origine sconosciuta permette di applicare strumenti genetici per identificare il gene o i geni associati alla malattia. In alcuni casi questa ricerca ha fornito evidenze per le malattie monogeniche. Questo concetto è in generale vero per le canalopatie, le patologie causate da canali non funzionali mutanti e i canali pacemaker cardiaci rappresentano un buon esempio di questo concetto.

Il lavoro di screening da me svolto si inserisce nel contesto della ricerca di patologie monogeniche ed in particolar modo l'attenzione è rivolta a geni direttamente coinvolti nella genesi del ritmo (famiglia HCN) e a proteine interagenti (CAV3, MiRP1, FLNA).

La proteina canale HCN4 è un'isoforma della famiglia HCN (Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated Channel) responsabile della corrente  $I_f$  (DiFrancesco 1993, Ludwig A et al 1999); questo canale è maggiormente espresso rispetto a HCN1 e HCN2 a livello del nodo senoatriale (NSA) (Liu et al, 2008; Marionneau et al, 2005; Tellez et al, 2006), una regione anatomica del cuore in cui è situata la sorgente del ritmo cardiaco.

Le cellule del NSA infatti sono in grado di generare potenziali d'azione in maniera autonoma, che si diffondono attraverso il sistema di conduzione permettendo la contrazione armonica del cuore. La corrente  $I_f$  svolge il suo ruolo fondamentale nella fase di depolarizzazione diastolica lenta, dove porta il potenziale di membrana ai valori soglia per la formazione del

potenziale d'azione. La frequenza cardiaca è determinata proprio dalla durata della fase di depolarizzazione diastolica delle cellule del nodo senoatriale di cui la principale corrente responsabile è la corrente pacemaker  $I_f$  (DiFrancesco, 2010). Per questo motivo gli eventi elettrici che stanno alla base dell'attività pacemaker senoatriale sono da sempre oggetto di grande interesse per studi di fisiologia con il fine di prevenire e trattare le patologie cardiache.

Ad oggi sono note 22 mutazioni del gene  $hHCN4$  correlate a disfunzioni ad indicare la rilevanza fisio-patologica di questo canale. E' interessante notare che tutte queste mutazioni sono di tipo loss-of function.

In questo lavoro di tesi ho dunque voluto effettuare uno screening genetico del canale pacemaker  $hHCN4$  in pazienti affetti da aritmie cardiache ereditarie (bradicardia sinusale, tachicardia sinusale e fibrillazione atriale) al fine di individuare mutazioni genetiche correlate al fenotipo patologico.

La maggior parte dei polimorfismi riscontrati nei pazienti in studio ( $n=168$ ) sono variazioni sinonime (L12L, P152P, L520L, P852P e P1200P) e pertanto non determinano alcuna variazione amminoacidica.

Le variazioni identificate classificate come polimorfismi di singola base (SNPs), arricchiscono la banca dati dei polimorfismi di  $hHCN4$ . Gli SNPs rappresentano la forma più comune di variazione genetica nelle popolazioni umane (circa il 90% della variabilità genetica) e si trovano in media ogni 400 nucleotidi. Gli approcci generalmente utilizzati nello studio di malattie con causa genetica si basano principalmente sull'assunzione che gli SNPs che danno origine ad una sostituzione amminoacidica siano funzionalmente rilevanti nella determinazione della patologia, mentre gli SNPs sinonimi (che non alterano i residui amminoacidici), dal momento che sono "silenti", non alterano la funzione o l'espressione della proteina. Secondo la logica per cui gli SNPs sinonimi sono per loro natura non patogenici, i risultati da noi finora ottenuti non sarebbero dunque sottoponibili ad altri tipi di interpretazione. Queste assunzioni si basano sulla teoria neutrale dell'evoluzione che, partendo dall'osservazione che le mutazioni sinonime sono molto più frequenti di quelle non sinonime, afferma che le prime non sono soggette alla selezione

naturale e si fissano in una data popolazione in maniera del tutto casuale (Kimura, 1977).

Tuttavia molti studi indicano che, nonostante la degenerazione del codice genetico, esiste una propensione (rafforzata dall'evoluzione) nell'utilizzo di determinati codoni per uno specifico aminoacido e che, quindi, l'utilizzo di codoni sinonimi non dipende esclusivamente "dal caso". In questo contesto di maggior complessità, viene oggi ritenuto che gli SNPs (anche senza cambio di aminoacido) possano essere elementi rilevanti nella determinazione della suscettibilità a patologie a livello individuale e nella risposta ai farmaci che si osserva nei vari pazienti. Vi sono oggi diverse evidenze sperimentali che forniscono spiegazioni sul meccanismo per cui mutazioni sinonime possono dare origine a variazioni fenotipiche nella struttura, funzione ed espressione di una data proteina. Tra queste ricordiamo:

- una variazione a livello di sequenza nucleotidica può avere effetti sulla struttura secondaria e sulla stabilità dell'mRNA (Nackley et al., 2006).
- codoni specifici sono stati selezionati durante l'evoluzione perché si sovrappongono a siti di processamento dell'mRNA come siti di splicing o siti di legame per micro-RNA (Schattner & Diekhans, 2006).
- l'utilizzo di codoni diversi può determinare un'alterata termodinamica e cinetica di traduzione della proteina. Infatti le proteine assumono la loro conformazione tridimensionale in base alle interazioni intrapeptidiche che si formano durante la traduzione lungo la sequenza primaria della proteina (cotranslational folding). Anche la cinetica è importante in questo processo perché fornisce le pause necessarie per il folding locale dei domini che si stanno formando. Essa può essere influenzata dall'utilizzo di codoni diversi in quanto la velocità di traduzione è rapida nei tratti di mRNA che utilizzano codoni frequenti (che correlano con una maggiore

disponibilità di tRNA complementari) e lenta dove vengono usati codoni rari (Sauna et al., 2007).

Esistono dati che indicano un aumento di casi in cui sia possibile associare SNPs sinonimi a patologie (Chamary et al., 2006) per cui anche le mutazioni sinonime da noi identificate potrebbero essere prese in considerazione per eventuali studi di associazione con patologie.

I nostri risultati indicano che gli SNPs individuati nella sequenza codificante di hHCN4 si localizzano per la maggior parte negli esoni 1 e 8, che codificano per le regioni terminali come riportato anche nel database dbSNP. Le regioni N- e C-terminali sono quelle che presentano più variabilità se si comparano le diverse isoforme e le diverse specie. Il fatto che i polimorfismi (sinonimi e non sinonimi) si concentrino in queste zone può indicare che queste sono sottoposte ad un minore “constrain” genetico, forse legato ad una minore rilevanza funzionale complessiva di queste zone (Jackson et al., 2007). Per poter trarre conclusioni più decisive riguardo alle variazioni individuate nei pazienti affetti è indispensabile ampliare la nostra ricerca. In particolare diventa necessaria un’analisi della cosegregazione genotipo-fenotipo di tipo familiare; inoltre è importante aumentare il numero dei probandi e dei controlli sani. In questo modo sarà quindi possibile effettuare analisi statistiche sulla frequenza delle varianti rispetto ai controlli sani per stimare se si tratta di polimorfismi più o meno diffusi oppure di mutazioni nel pool dei nostri pazienti analizzati. Oggi si ritiene che la predisposizione o meno a certe patologie sia determinata dal pattern di SNPs posseduto da ciascun individuo ed è quindi sempre più frequente l’analisi di questi marcatori genetici nei casi di patologie ereditarie. La continua espansione della genomica funzionale, della bioinformatica, degli screening genetici che si sono sviluppati in seguito al completamento del progetto genoma umano, ha portato all’idea di “medicina personalizzata”, che potrà trasformarsi in realtà in un futuro prossimo.

Nel mio lavoro sono stati individuate anche delle variazioni missenso: G36E (n= 13); R524Q (n=1) e M1113V (n=6), in cui il nuovo aminoacido ha caratteristiche diverse da quello originario. Le mutazioni G36E e M1113V sono state riscontrate in pazienti affetti da disturbi del ritmo sia in senso tachicardico che bradicardico. Pertanto la correlazione causale tra genotipo e fenotipo è quanto meno complessa.

Il caso su cui è stato interessante indagare anche a livello funzionale nella ricerca di una correlazione causale genotipo-fenotipo, è quello della mutazione R524Q trovata inizialmente in un paziente affetto da tachicardia sinusale e poi in altri suoi familiari. Si tratta di una mutazione in eterozigosi missenso non conservativa collocata nell'esone 4 di hHCN4 che porta alla sostituzione di un'arginina (R) (aminoacido carico basico) in una glutammina (Q) (aminoacido polare neutro), determinando quindi la perdita di una carica positiva. R524Q si trova nella parte iniziale del C-linker, che collega l'ultimo dominio transmembrana (S6) al CNBD. Il C-linker è una regione molto importante in quanto il legame tra C-linker e CNBD è autoinibitorio e tale inibizione viene eliminata solo dalla presenza di AMPc (Accili et al., 2002). La mutazione è stata riscontrata inizialmente in una sola paziente affetta da tachicardia sinusale che presentava familiarità per tale patologia e così, in seguito, lo screening è stato esteso anche agli altri membri della famiglia (n=7), riscontrando la mutazione in altri 4 familiari.

Lo studio funzionale di tale mutazione è interessante perché si tratta del primo missenso non conservativo trovato e studiato in hHCN4 in pazienti affetti da tachicardia; in letteratura sono presenti solo caratterizzazioni di mutazioni loss-of-function del gene hHCN4 in pazienti affetti da bradicardia. Tutti i membri della famiglia che presentano la mutazione R524Q hanno episodi di tachicardia inappropriata sebbene le modalità fenotipiche con cui essi si manifestano sono variabili. I diversi fenotipi osservati tra questi individui riflettono più probabilmente la presenza di penetranza incompleta ed espressività variabile come avviene in quasi tutte le canalopatie.

Dai dati ottenuti dagli esperimenti di patch-clamp in modalità whole-cell su cellule HEK 293 esprimenti il canale hHCN4 si osserva un aumento di corrente  $I_f$  nel canale hHCN4 mutato in eterozigosi e in omozigosi rispetto al wild type, nelle tracce di corrente registrate a -55 mV, -75 mV e -95 mV. Il canale hHCN4 mutato si attiva a potenziali più positivi, rendendo disponibile più corrente funny durante la depolarizzazione diastolica lenta e determinando conseguentemente un aumento della frequenza cardiaca sino a valori consoni alla tachicardia sinusale dei pazienti affetti della famiglia in studio.

I dati di elettrofisiologia, che non sono trattati in questa tesi, hanno dunque portato complessivamente all'identificazione di una nuova mutazione in HCN4 che è il primo esempio di "gain-of-function" associata ad un fenotipo tachicardico e più in generale ad un meccanismo che lega HCN4 alle tachiaritmie cardiache.

Il lavoro di screening gene-targeting è in generale molto importante come dimostrato dalle numerose pubblicazioni che mettono in luce la monogenicità di varie patologie; tuttavia la maggior parte delle patologie (cardiache e non) non sono riconducibili ad un singolo fattore, ma sono dovute all'azione di più agenti causali attivi nello stesso individuo (patologie multifattoriali).

Nel campo dello screening genetico delle malattie cardiache l'obiettivo è quello di estendere la ricerca di mutazioni a più geni sia codificanti per canali ionici sia per proteine interagenti con essi o strutturali importanti a livello cardiaco. Quindi la nostra attenzione si è rivolta alle nuove tecnologie in ambito di screening genetico definite appunto New Generation Sequencing (NGS). Abbiamo dunque deciso di utilizzare tecnologie di NGS per la diagnosi molecolare di alcune malattie cardiovascolari analizzando un pannello di geni per investigare le basi genetiche delle disfunzioni cardiache in due famiglie selezionate tra tutte quelle studiate precedentemente. Nella prima famiglia l'analisi del probando con bradicardia ha portato inizialmente all'identificazione della mutazione G36E in HCN4. Questa mutazione è presente frequentemente sul database degli SNPs (0.0613) e, come precedentemente indicato, è

distribuita nel nostro screening in una popolazione eterogenea di patologie aritmiche. Anche se non è ancora stata caratterizzata dal punto di vista elettrofisiologico in un sistema di espressione eterologo, riteniamo che questa non sia direttamente responsabile della patologia.

Successivamente abbiamo ulteriormente identificato una variante R719C nel gene MYH7. Questa mutazione è già descritta nel dbSNPs con una frequenza molto bassa (0.00086%) ed è stata associata alla cardiomiopatia dilatativa; sarà quindi necessario valutare un possibile contributo aritmico di questa mutazione ed estendere l'investigazione ai familiari.

Lo screening dalla seconda famiglia ha portato all'identificazione nel probando con tachicardia sinusale, una mutazione missenso posta anch'essa sulla porzione C-terminale di HCN4, che comporta la sostituzione aminoacidica tra una metionina e una valina in posizione 1113 (M1113V). Allargando lo screening di tale gene a tutta la sua famiglia ed analizzando l'esone 8, abbiamo scoperto che in nessun altro paziente è presente la mutazione. Per questo motivo non la riteniamo causativa direttamente delle patologie di cui sono affetti i pazienti della famiglia, in quanto non presente nei familiari del probando. Il pannello di geni ci ha permesso di confermare una mutazione missenso in MiRP1 che coinvolge l'isoleucina in posizione 57 (I57T): vi è un cambiamento nella sequenza nucleotidica che comporta la sostituzione dell'aminoacido WT (Ile), con una treonina, riscontrata nel paziente con tachicardia sinusale che presenta anche la mutazione M1113V su HCN4.

Questa mutazione in MiRP1 è nota in letteratura: studi precedenti ne hanno infatti descritto la presenza in pazienti affetti dalla sindrome del QT-lungo, nei quali la mutazione I57T di MiRP1 diminuisce la densità della corrente di potassio IKr (Sesti et al. 2000). Questa mutazione è stata inoltre individuata in un paziente con la sindrome di Brugada: la coespressione con il canale Kv 4.3, ha permesso di registrare un aumento della corrente (Wu et al. 2010). In entrambi i casi si tratta di aritmie ventricolari, ma mutazioni nel gene di MiRP1 sono state correlate anche ad aritmie sopraventricolari (fibrillazione atriale): ad esempio nel lavoro di

Yang et al. (2004), la mutazione R27C identificata in una grande famiglia Cinese porta alla formazione di un substrato proaritmico.

Di conseguenza, data l'implicazione di mutazioni sul gene MiRP1 correlate sia a patologie ventricolari che sopraventricolari, ci è sembrato interessante andare ad indagare l'influenza della proteina MiRP1-I57T sulla corrente del canale HCN4, al fine di determinare se tale sostituzione aminoacidica nella subunità accessoria dei canali HCN si ripercuotesse sul ritmo cardiaco.

Abbiamo, per tale ragione, allargato lo screening anche del gene di MiRP1 agli altri membri della famiglia del probando affetto da tachicardia sinusale: l'albero genealogico ci mostra come la mutazione segreghi con la patologia. Un aspetto interessante è che la paziente A87 non è portatrice della mutazione e nemmeno della patologia

Tutti questi risultati ci hanno fatto pensare che la mutazione I57T di MiRP1 possa avere un ruolo nella patologia della famiglia in esame.

Nello studio funzionale di tale mutazione (non oggetto di questo lavoro di tesi) abbiamo coespresso hHCN4 con hMiRP1-WT e I57T e non abbiamo riscontrato variazioni statisticamente significative.

I nostri risultati suggeriscono quindi che l'aritmia presente nei pazienti aventi la mutazione I57T non sia dovuta ad alterazioni della funzionalità dei canali HCN ma da altri meccanismi.

Ulteriori esperimenti dovranno essere condotti per stabilire la relazione causativa esistente tra la mutazione di MiRP1 I57T e il fenotipo patologico. Il lavoro di screening effettuato in questa tesi va ad ampliare il database delle mutazioni/polimorfismi di HCN4. Polimorfismi genetici e mutazioni relativamente comuni, se associati tra loro e combinati con fattori ambientali e stili di vita predisponenti, possono elevare notevolmente il rischio di sviluppare patologie.

Lo screening genetico assume un ruolo fondamentale nel determinare il profilo genomico e le sue varianti che possono quindi determinare l'associazione genotipo-fenotipo della malattia.

L'aumentata conoscenza della variabilità genetica è avvenuta grazie alla disponibilità della sequenza completa del genoma umano, dal progetto

HapMap, e dal progetto 1000 Genomi, con la descrizione di più di 15.000.000 di SNPs, 1.000.000 inserzioni e delezioni, 20.000 varianti strutturali. Tutto questo ha determinato l'emergere di studi di associazione genome-wide (Genome-Wide Association Studies, GWAS) che valutano differenze statistiche nella frequenza di specifici alleli nei casi rispetto ai controlli. Con gli studi GWAS si cercano prima le informazioni contenute nel DNA e soltanto dopo si cerca di spiegare perché quella differenza genetica dovrebbe provocare la malattia. Questi studi hanno infatti confermato la base genetica di tipo multigenico di molte patologie. Questa identificazione di tipo poligenico e/o di combinazioni multiple di mutazioni predisponenti è stata infatti messa in evidenza soprattutto da studi di GWAS.

Si deve inoltre tenere presente che le mutazioni predisponenti possono giocare un ruolo nel determinare lo stato di salute/malattia interagendo con condizioni ambientali e anche ad esempio i farmaci. L'uso di tecnologie di next generation sequencing, che permettono il sequenziamento di un intero genoma e l'analisi di più campioni contemporaneamente, si ritiene che possa individuare una serie di geni e una rete di regolazione tra i diversi geni di un unico pathway. Tali geni infatti potrebbero essere condivisi da malattie in apparenza molto diverse e potrebbero suggerire nuovi interventi terapeutici. Questo ci permetterà di inquadrare meglio mutazioni fino ad ora considerate isolate e comprendere le relazioni che intercorrono tra i diversi geni, apparentemente non correlati con il canale, ma che fanno parte di un ampio network di trasduzione del segnale e che risultano implicati in varie patologie, tra cui le malattie cardiovascolari.

In particolare la tecnica dell'exome sequencing (ES) è diventata sempre più utile per identificare nuove mutazioni. L'approccio convenzionale verso queste malattie implica l'utilizzo di PCR per selezionare le regioni genomiche di interesse, seguita da sequenziamento di tipo Sanger. Tutto ciò richiede la conoscenza preliminare dei geni target o il restringimento della rosa di geni candidati in modo che le informazioni siano gestibili. L'ES oltrepassa questi requisiti permettendo il sequenziamento dei soli

esoni (circa 200000); pertanto oggi si sta valutando la possibilità di sfruttare questa tecnica come metodica diagnostica vera e propria. Il principio dell'ES consiste nel prelevare il DNA da testare, frammentarlo e costituire delle librerie; successivamente si esegue una cattura degli esoni di interesse mediante degli oligonucleotidi esca e si procede al Next Generation Sequencing (NGS); i dati di output vengono poi allineati con le sequenze di riferimento presenti nei database.

Recentemente l'ES è apparso come un'utile alternativa alla classica diagnosi di malattie che presentano eterogeneità genetica e fenotipica. Oggi la possibile origine genetica di queste patologie, come accennato sopra, viene investigata mediante PCR e sequenziamento Sanger di ogni potenziale gene target, ma questo approccio risulta molto laborioso, costoso e poco tempestivo nel caso sia necessaria una rapida diagnosi. Con ES è invece possibile valutare solo gli esoni (Whole Exome Sequencing) e non tutta la sequenza dei geni, abbassando così la mole di dati di output e rendendo la procedura diagnostica più veloce. Per quanto riguarda patologie caratterizzate da eterogeneità fenotipica, è necessario sottolineare che il riscontro di una mutazione mediante ES in un gene di un solo paziente non basta a definire la causa della malattia, dal momento che servirebbe un riscontro analogo anche in altri soggetti non correlati tra loro; ciò purtroppo non è sempre fattibile perché le patologie valutate con ES sono spesso rare. È comunque possibile attribuire un ruolo patogenetico alla mutazione rilevata dimostrando che il gene alterato è coinvolto nella via molecolare che conduce alla patologia. Quando si esegue ES mirato ad alcuni geni noti per essere coinvolti in determinate patologie, è possibile eseguire un arricchimento preliminare delle sequenze target come alternativa alla cattura degli esoni. Altro aspetto legato all'ES è la possibilità di valutare i geni modificatori, ossia geni che portano delle varianti in grado di modificare il fenotipo clinico di una malattia se è già presente una certa alterazione genetica; inoltre consente di individuare delezioni e duplicazioni di dimensioni notevoli rispetto a quelle individuate dal sequenziamento Sanger.

Affinché l'ES sia applicabile come strumento diagnostico di routine, sono necessari ancora molti cambiamenti:

1. La sfida più grande è quella di analizzare e gestire il gran numero di dati generati dal sequenziamento esonico. Esso genera tipicamente più di 10000 varianti genetiche che devono essere attentamente filtrate in modo che i dati generati siano abbastanza semplici da poter essere maneggiati anche da non specialisti. A tale scopo, viene richiesto lo sviluppo di un robusto software di facile utilizzo.

2. La sensibilità e la specificità nell'individuare le microlesioni (mutazioni puntiformi, piccole inserzioni o delezioni, tandem repeats) e macrolesioni (delezioni e duplicazioni) devono essere migliorate fino a raggiungere uno standard simile a quello degli altri test diagnostici. La moderna tecnologia di Next Generation Sequencing ha un più alto tasso di errore rispetto al sequenziamento di Sanger, sebbene si possa rimediare a ciò incrementando la copertura in modo da ottenere un'accuratezza maggiore. L'adeguata profondità di copertura del sequenziamento è inoltre critica per identificare le eterozigosi semplici e composte. Attualmente le mutazioni individuate tramite il sequenziamento degli esoni vengono validate dal sequenziamento di Sanger e questo, per un'applicazione diagnostica clinica, comporta un costo aggiuntivo. È inoltre possibile incorrere in falsi positivi e falsi negativi e quindi è necessario prestare particolare attenzione alla procedura in quanto, se non correttamente riconosciuti, questi casi possono potenzialmente mascherare l'identificazione di mutazioni causanti malattie.

3. Il successo del sequenziamento degli esoni si basa sulla cattura completa dell'esone stesso, correlata ad un'adeguata profondità di sequenziamento. E' necessario perciò incrementare l'efficienza del metodo di cattura degli esoni per assicurare che tutti gli esoni target vengano rilevati. Un altro problema associato al sequenziamento degli esoni è la non uniformità della sequenza catturata da cui deriva una profondità di sequenziamento irregolare: ciò può portare ad un risultato non adeguato ed all'incapacità di detectare delezioni o duplicazioni in alcune regioni (per esempio le regioni ricche in basi GC vengono difficilmente catturate).

Si può infine affermare che il sequenziamento degli esoni possa svolgere un ruolo fondamentale sia nella diagnosi che nella ricerca. La doppia valenza di questo ruolo dell'ES è applicabile solo per le malattie nelle quali una certa quantità di casi presenta mutazioni non note.

La grande mole di informazioni che emerge dall'ES ha dato vita anche a numerose questioni di tipo etico. Infatti spesso si riscontrano delle alterazioni in maniera accidentale mentre ci si sta focalizzando altrove nel genoma e può succedere che queste predispongano a determinate patologie, anche in futuro.

## BIBLIOGRAFIA

**Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. (2002)** From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol Sci.* Feb;17:32-7.

**Altomare C., Bucchi A., Camatini E., Baruscotti M., Viscomi C., Moroni A., DiFrancesco D. (2001)** Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol.*;117(6):519-32.

**Altomare C., Terragni B., Brioschi C., Milanesi R., Pagliuca C., Viscomi C., Moroni A., Baruscotti M., DiFrancesco D. (2003)** Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol.*;549(Pt 2):347-59.

**Barak M., Herschkowitz S., Shapiro I., Roguin N. (2001)** Familial combined sinus node and atrioventricular conduction dysfunctions. *Int J Cardiol* 15:231– 239

**Barbuti A., Gravante B., Riolfo M., Milanesi R., Terragni B., Di Franceso D. (2004)** Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circulation Research* 94:1325-1331

**Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. (2010)** The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol.* Jan;48(1):55-64

**Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. (2009)** Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev.* Jul;89(3):847-85.

**Biel M., Michalakis S. (2009)** Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol.*;(191):111-36.

**Boyett, M. R., Honjo, H., & Kodama, I. (2000)** The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure, *Cardiovasc Res* 47: 658– 687

**Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, Pisoni G, Longhi R, Moroni P, Billeter R, Barbuti A, Dobrzynski H, Boyett MR, DiFrancesco D, Baruscotti M. (2009)** Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Aug;47(2):221-7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.04.009. Epub 2009 Apr 24.

**Cappato, R. (2012).** Clinical efficacy of ivabradine in patients with inappropriate sinus tachycardia: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover evaluation. *J Am Coll Cardiol* , 1323-9

- Chamary J.V., Parmley J.L., Hurst L.D. (2006)** Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat Rev Genet* 7:98-108
- Craven K.B., Zagotta W.N. (2006)** CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol.*;68:375-401
- Decher N, Bundis F, Vajna R, Steinmeyer K. (2003)** KCNE2 modulates current amplitudes and activation kinetics of HCN4: influence of KCNE family members on HCN4 currents. *Pflugers Arch. Sep*;446(6):633-40.
- DiFrancesco D (1986)** Characterization of a single pacemaker channel in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 324: 470-473
- DiFrancesco D. (2010)** The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res. Feb 19*;106(3):434-46.
- DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. (1993)** *Annu Rev Physiol.* ;55:455-72.
- Gauss R., Seifert r. & Kaupp B. (1998)** Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587
- Hedges DJ<sup>1</sup>, Burges D, Powell E, Almonte C, Huang J, Young S, Boese B, Schmidt M, Pericak-Vance MA, Martin E, Zhang X, Harkins TT, Züchner S (2009)** Exome sequencing of a multigenerational human pedigree. *PLoS One.* 2009 Dec 14;4(12):e8232. doi: 10.1371/journal.pone.0008232..
- Horner DS, Pavesi G, Castrignanò T, De Meo PD, Liuni S, Sammeth M, Picardi E, Pesole G. (2010)** Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief Bioinform.* 2010 Mar;11(2):181-97. doi: 10.1093/bib/bbp046. Epub 2009 Oct 27. Review.
- Jackson H.A., Marshall C.R., and Accili E.A. (2007)** Evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel genes. *Physiol Genomics* 29: 231-245
- Kimura M. (1977)** Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. *Nature* 267: 275-276
- Laish-Farkash A, Glikson M, Brass D, Marek-Yagel D, Pras E, Dascal N, Antzelevitch C, Nof E, Reznik H, Eldar M, Luria D. (2010)** A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. *J Cardiovasc Electrophysiol.* Dec;21(12):1365-72.

**Lander ES, Linton Nature. 2001** Initial sequencing and analysis of the human genome. Feb 15;409(6822):860-921. Nature Aug 2;412(6846):565.

**Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M, Noble D. (2008)** Role of pacemaking current in cardiac nodes: insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node. Prog Biophys Mol Biol. Jan-Apr;96(1-3):294-304.

**Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M. (1999)** Structure and function of cardiac pacemaker channels. Cell Physiol Biochem. 1999;9(4-5):179-86.

**Ludwig A, X. Zong, M. Jeglitsch, F Hofmann, M and Biel (1998)** A family of hyperpolarization-activated cation channels. Nature 393: 587-591

**Ludwig A., Zong X., Stieber J., Hullin R., Hofmann F. and Biel M. (1999)** Two pacemaker channel from human heart with profoundly different activation kinetics. The EMBO Journal, 18 (9): 2323-2329.

**Mardis ER (2008)** Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:387-402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359. Review.

**Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, Lei M, Escande D, Demolombe S. (2005)** Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. J Physiol. 2005 Jan 1;562(Pt 1):223-34.

**Milanesi R, Baruscotti M, Gnecci-Ruscone T, DiFrancesco D. (2006)** Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. N Engl J Med 354(23):2520

**Mistrič P., Mader R., Michalakis S., Weidinger M., Pfeifer A., Biel M** The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. J Biol Chem.;280(29):27056-61 (2005).

**Moroni A., Barbuti A., Altomare C., Viscomi C., Morgan J., Baruscotti M., DiFrancesco D. (2000)** Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. Pflugers Arch. 439: 618-626

**Moroni A., Gorza L., Beltrame M., Gravante B., Vaccari T., Bianchi M.E., Altomare C., Longhi R., Heurteaux C., Vitadello M., Malgaroli A., DiFrancesco D. (2001)** Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I<sub>f</sub>. J Biol Chem.;276(31):29233-41.

**Nackley A.G., Shabalina S.A., Tchivileva I.E., et al. (2006)** Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 314:1930-1933

**Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M. (2007)** Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*. Jul 31;116(5):463-70.

**Olshansky B, Sullivan RM. (2013)** Inappropriate sinus tachycardia. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Feb 26;61(8):793-801. doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.074. Epub 2012 Dec 19.

**Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M, Krishnamurthy G, Cohen IS, Robinson RB. (2004)** MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. Oct 15;279(42):43497-502.

**Santoro B, Liu D.T, Yao H, et al. (1998)** Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93:717-729

**Sauna Z.E., Kimchi-Sarfaty C., Ambudkar S.V. Gottesman M.M. (2007)** The sounds of silence: synonymous mutations affects function. *Pharmacogenomics* 8:527532

**Schatterern P., Diekhans M. (2006)** Regions of extreme synonymous codon selection in mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 34: 1700-1710

**Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. (2003)** Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*. May;111(10):1537-45.

**Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL Jr, Goldstein SA. (2000)** A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 12;97(19):10613-8.

**Shi W., Wymore R., Yu H., Wu J., Wymore R.T., Pan Z., Robinson R.B., Dixon J.E., McKinnon D., Cohen I.S. (1999)** Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*.;85(1):e1-6.

**Tellez JO, Dobrzynski H, Greener ID, Graham GM, Laing E, Honjo H, Hubbard SJ, Boyett MR, Billeter R. (2006)** Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. *Circ Res*. Dec 8;99(12):1384-93.

**Tran N., Proenza C., Macri V., Petigara F., Sloan E., Samler S., Accili E.A. (2002)** A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels. *J Biol Chem.*;277(46):43588-92.

**Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A. (2004)** Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem.* Jun 25;279(26):27194-8

**Vaccari T., Moroni A., Rocchi M., Gorza L., Bianchi M.E., Beltrame M., DiFrancesco D. (1999)** The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta.*;1446(3):419-25.

**Wu J, Shimizu W, Ding WG, Ohno S, Toyoda F, Itoh H, Zang WJ, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Nademanee K, Brugada J, Brugada P, Brugada R, Vatta M, Towbin JA, Antzelevitch C, Horie M. (2010)** KCNE2 modulation of Kv4.3 current and its potential role in fatal rhythm disorders. *Heart Rhythm.*;7(2):199-205. doi: 10.1016/j.hrthm.2009.10.012. Epub 2009 Oct 12.

**Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R. (2001)** MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res.* Jun 22;88(12):E84-7.