

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO DI MEDICINA E DI SCIENZE DELLA SALUTE

DOTTORATO IN SCIENZE PER LA SALUTE

XXV CICLO

TESI SPERIMENTALE

IN

SCIENZE TECNICHE DI MEDICINA E DI LABORATORIO

**“VALUTAZIONE DI GENI IMPLICATI NELLA
CARDIOMIOPATIA ONCOITICA MEDIANTE
SEQUENZIAMENTO GENICO DI NUOVA GENERAZIONE”**

COORDINATORE:

Ch.mo Prof. Guido Grasso

TUTOR:

Ch.mo Prof. Mariano Intrieri

DOTTORANDA:

Dott.ssa Nadia Sapere

Matr.141504

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

A xio Franca

che il destino mi ha portato via.

A Elena

che si è salvata da un destino già scritto.

INDICE

Sommario	pag. 1
Abstract	pag. 2
Abbreviazioni	pag. 3
1. INTRODUZIONE	
1.1 Cardiomiopatie pediatriche	pag. 5
1.2 Forme di cardiomiopatie genetiche	pag. 8
1.3 Cardiomiopatia oncocitica	pag. 12
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 16
3. MATERIALI E METODI	
3.1 Caso clinico	pag. 18
3.2 Analisi genetiche	pag. 21
3.2.1 Sequenziamento con metodo Sanger	pag. 21
3.2.2 Sequenziamento di nuova generazione	pag. 24
3.3 Analisi bioinformatiche	pag. 28
3.5 Analisi istologiche	pag. 30
3.5.1 Inclusione in paraffina	pag. 31
3.5.2 Colorazione ematossilina-eosina	pag. 32
3.5.3 Colorazione speciale tricromica di Masson	pag. 32
3.5.4 Immunoistochimica	pag. 33
4. RISULTATI	
4.1 Analisi genetiche	pag. 35
4.2 Analisi del quadro istologico	pag. 40
5. DISCUSSIONE	pag. 48
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	pag. 59
APPENDICE	pag. 61
BIBLIOGRAFIA	pag. 72
RINGRAZIAMENTI	pag. 77
PUBBLICAZIONI E PRESENTAZIONI A CONFERENZE	pag. 79

SOMMARIO

La cardiomiopatia oncocitica (HC) è una patologia rara, aritmogena caratterizzata da cardiomegalia, aritmie cardiache gravi, morte improvvisa e presenza di cellule simili agli istiociti nella compagine del miocardio. Colpisce bambini al di sotto dei 2 anni di età, con un rapporto femmine-maschi di 3:1. La prevalenza non è nota ma, ad oggi, sono stati descritti nel mondo meno di 100 pazienti. Clinicamente la malattia può manifestarsi con diversi tipi di aritmia cronica (tachicardia ventricolare e sopraventricolare, fibrillazione atriale e ventricolare e sindrome di Wolff-Parkinson-White) e spesso la morte improvvisa, dovuta ad arresto cardiaco, è un evento comune al momento della prima diagnosi. In questo lavoro è stato studiato un caso di cardiomiopatia oncocitica in una bambina di 16 mesi, affetta da aritmie e disfunzioni progressive del miocardio che hanno richiesto un trapianto cardiaco. L'analisi, mediante sequenziamento genico di nuova generazione (metodo SOLEXA), di 126 geni coinvolti in differenti cardiomiopatie/canalopatie cardiache, ha permesso l'identificazione di due nuove mutazioni potenzialmente patogeniche in due differenti canali ionici: canale del calcio L-type e canale del sodio $Na_{(v)}1.5$. In particolare, una inserzione nel gene CACNA2D1 (NC_000007.13:g.81603880_81603881insAA), e un polimorfismo a singolo nucleotide nel gene RANGFR (MOG-1) (NP_057576.2:p.Pro155Ser/NC_000017.10:g.8193156C>T); entrambe le varianti non sono mai state descritte prima in letteratura, ma i canali coinvolti sono responsabili della normale contrattilità del miocardio e della velocità di trasferimento del potenziale d'azione. I risultati presentati (clinici, genetici e immunoistopatologici), consentono di comprendere più approfonditamente l'eziopatologia dell'HC e forniscono nuove ipotesi e metodiche innovative per lo studio di geni candidati in questa patologia letale.

ABSTRACT

Oncocytic cardiomyopathy (HC) is a rare, arrhythmogenic disorder characterized by cardiomegaly, severe cardiac arrhythmias, sudden death and by the presence of characteristic histiocyte-like cells within the myocardium. It affects infants younger than 2 years of age with a female-male ratio of 3:1. The prevalence is unknown but, to date, less than 100 patients in the world have been described. Clinically, the disease may manifest as various types of incessant arrhythmia (supraventricular and ventricular tachycardia, atrial and ventricular fibrillation, and Wolff-Parkinson-White syndrome), and frequently sudden death due to cardiac arrest is a common occurrence at the time of initial diagnosis. This work report a case of oncocytic cardiomyopathy in a 16 months-old girl, with dysrhythmia and progressive myocardial dysfunction requiring cardiac transplantation. The analysis, by next generation sequencing (Solexa method), of 126 genes involved in different cardiomyopathies/channelopathies, has allowed the identification of two new potentially pathogenic mutations in two different ion channels: calcium L-type channel and sodium channel $Na_{(v)}1.5$. In particular, an insertion in the gene *CACNA2D1* (NC_000007.13: g.81603880_81603881insAA), and a single nucleotide polymorphism in the gene *RANGFR* (MOG-1) (NP_057576.2: p.Pro155Ser/NC_000017.10: g.8193156C> T) were identified; both variants have never been described before in the literature, but the channels involved are responsible for normal myocardial contractility and action potential propagation. The results reported here (clinical, genetic and immunohistopathologic), lead to a more understanding about the etiopathology of HC and provide new approaches and innovative methods for the study of candidate genes in this fatal disease.

Abbreviazioni

ACA	Aborted Cardiac Arrest
ANP	Atrial natriuretic peptide
AP	Action Potential
ARVC	Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy
AV	Atrioventricular
Bam	Binary Alignment/Map format
BrS	Brugada Syndrome
CACNA2D1	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1
CMV	Cytomegalovirus
CVD	Cardiovascular disease
CPVT	Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia
DCM	Dilated Cardiomyopathy
DIA OS	Difetto Inter-Atriale ostium secundum
ECG	Electrocardiography
EF	Ejection Fraction
FSH	Follicle Stimulating Hormone
FT3	Free Triiodothyronine
FT4	Free Thyroxine Fraction
HapMap	Haplotype map of the human genome
HC	Histiocitoid/oncocytic cardiomyopathy
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy
HGP	Human Genome Project
HPV	Human papillomavirus
ICD	Implantable Cardioverter Defibrillator
IDT	Integrated DNA Technologies
ISFC	International Society and Federation Cardiology
KCNQ1	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
LCHAD:	Long-chain L 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency
LS	Left Ventricle

LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LQTS	Long QT Syndrome
LVNC	Left Ventricular Non Compaction
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
MLS	Microphthalmia with linear skin defects
NGS	Next Generation Sequencing
MOG-1	Multicopy Suppressor of Gsp1
NIT	Nord Italy Transplant
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCMR	Pediatric Cardiomyopathy Registry and Heart Failure
Pmut	Point Mutant software
Polyphen-2	Polymorphism Phenotyping software
RANGRF	RAN guanine nucleotide release factor.
RCM	Restrictive Cardiomyopathy
RefSeq	NCBI Reference Sequence Database
RV	Right Ventricle
Sam	Sequence Alignment/Map format
SCD	Sudden Cardiac Death
SCN5A	Sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit.
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant software
SUDEP	Sudden Unexpected Death in Epilepsy
TdP	Torsades de pointes
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
WHO	World Health Organization
WPW	Wolf Parkinson White Syndrome

1. INTRODUZIONE

1.1 CARDIOMIOPATIE PEDIATRICHE

Le cardiomiopatie sono un gruppo clinicamente eterogeneo di disturbi del muscolo cardiaco (miocardio). Esse sono definite in base alla presenza di anomalie strutturali e/o funzionali del miocardio, in assenza di malattia coronarica, di ipertensione e di malattie valvolari.¹

La patologia, di solito, inizia nelle pareti delle camere inferiori del cuore (ventricoli) e, nei casi più gravi, colpisce anche le pareti delle camere superiori (atri). In questo modo il cuore indebolito perde la capacità di pompare sangue in modo efficace e ciò può sfociare in un'insufficienza cardiaca o in un battito cardiaco irregolare (aritmia).

Le aritmie ventricolari sono la principale causa di arresto cardiaco (ACA) e di morte cardiaca improvvisa (SCD). L'eziologia di queste aritmie potenzialmente fatali può essere definibile in base alla presenza di danni strutturali del miocardio. Le cardiomiopatie strutturali si dividono in: a) cardiomiopatia ischemica e non ischemica; b) cardiomiopatia dilatativa; c) cardiomiopatia ipertrofica; d) cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro e del sinistro.

La maggior parte delle cardiomiopatie non strutturali sono canalopatie cardiache: a) sindrome del QT lungo (LQTS) acquisita e congenita; b) Sindrome di Brugada; c) tachicardia catecolaminergica ventricolare polimorfa; d) Sindrome del QT breve.²

Le cardiomiopatie possono colpire qualsiasi adulto o bambino. Nei neonati e nei bambini piccoli si considera una malattia rara, ma le cardiomiopatie continuano ad essere la ragione più importante per i trapianti di cuore in giovani pazienti.³⁻⁴⁻⁵

Attualmente, non ci sono rapporti pubblicati che specificano il numero totale di bambini colpiti, ma è approssimativamente stimato in centinaia di migliaia, prendendo in considerazione tutte le forme di cardiomiopatia. Secondo il registro di cardiomiopatia pediatrica (PCMR), negli Stati Uniti 1 ogni 100.000 bambini di età inferiore ai 18 anni ha una cardiomiopatia primaria.⁶ Questo tasso di incidenza annuale, tuttavia, è estremamente prudente: in questo numero non sono compresi il numero crescente di bambini con cardiomiopatia secondaria e i casi asintomatici. Non è possibile stimare con precisione la prevalenza in Europa, in quanto non è ancora stato istituito un Registro europeo, né uno italiano.

Vi è una grande quantità di letteratura in merito alle cardiomiopatie negli adulti, ma non tutte le informazioni sono valide anche per i bambini. Ad oggi, purtroppo, la ricerca e l'attenzione rivolta alle cardiomiopatie in età pediatrica sono ancora scarse e per questo le cause non sono ancora ben comprese. Secondo il PCMR, nonostante una valutazione standardizzata e rigorosa,⁷ in meno del 25% di tutti i pazienti è stata identificata una causa. È noto che le cause di una cardiomiopatia nei neonati e nei bambini possono essere molto diverse da quelle degli adolescenti e degli adulti nonostante una sintomatologia simile. Una diagnosi effettuata in giovane età spesso è segno di una condizione cardiaca grave che richiede un trattamento aggressivo. In alcuni casi la condizione può stabilizzarsi nel tempo con l'aiuto di alcuni farmaci o di interventi chirurgici ma, nei casi più gravi, i bambini piccoli possono presentare sintomi che progressivamente e rapidamente portano a insufficienza cardiaca. In contrasto, la

maggior parte degli adulti con diagnosi di cardiomiopatia, può presentare sintomi minori senza avere gravi limitazioni o problemi per anni.

In generale, si pensa che la cardiomiopatia pediatrica sia più probabilmente dovuta a fattori genetici, mentre lo stile di vita e i fattori ambientali svolgano un ruolo più importante nelle cardiomiopatie degli adulti.

Pur essendo una delle principali cause di morte nei bambini, l'eziopatologia delle cardiomiopatie pediatriche rimane ancora sconosciuta. Nella maggior parte dei casi la causa è attribuibile a condizioni familiari che vengono trasmesse geneticamente, ma la malattia può essere anche acquisita durante l'infanzia. La causa più comune di cardiomiopatia acquisita è la miocardite, un'infezione virale che indebolisce il muscolo cardiaco. Altre cause che provocano una cardiomiopatia acquisita comprendono: 1) malattie cardiovascolari (ad esempio la malattia di Kawasaki, la cardiopatia congenita, l'ipertensione, il trapianto cardiaco o interventi chirurgici in generale); 2) patologie infettive o infiammatorie; 3) obesità o alcune carenze alimentari; 4) reazioni tossiche (ad esempio per uso di droga e alcol, o per esposizione alle radiazioni o a farmaci); 5) malattie del tessuto connettivo o autoimmuni; 6) malattie endocrine e 7) complicanze relative alla gravidanza (Fig.2).⁸

Problemi del ritmo persistenti o problemi delle arterie coronarie, sia congenite sia acquisite, possono anch'esse generare un indebolimento del cuore.

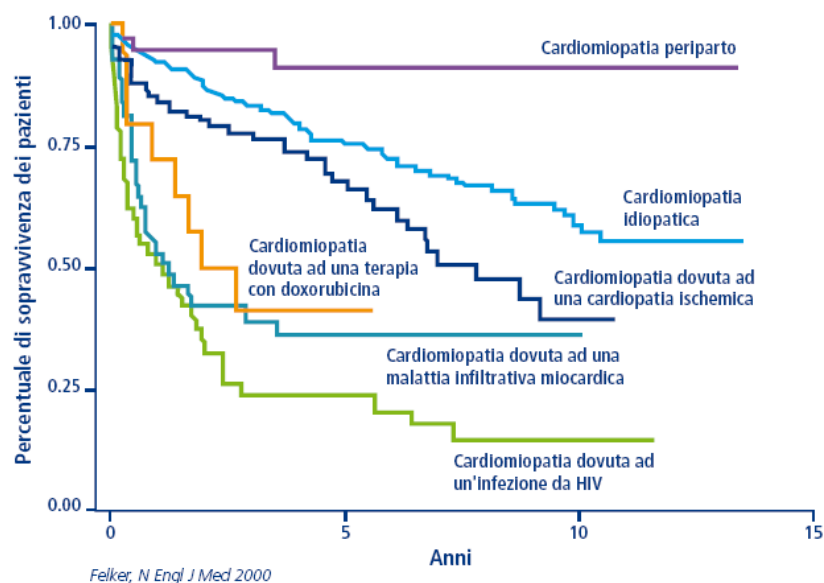


Fig.1 Curve di Kaplan-Meier che indicano il tasso di sopravvivenza per diversi tipi di cardiomiopatia.

E' stato valutato⁶ che il 27% delle cardiomiopatie pediatriche sono dovute a miocardite e ad altre infezioni virali, il 24% a cardiomiopatie ereditarie familiari, il 22% sono associate a malattie neuromuscolari, il 16% a disturbi del metabolismo e il 10% a sindromi malformative.

1.2 FORME DI CARDIOMIOPATIE GENETICHE

Le cardiomiopatie, nonostante le differenti classificazioni adottate dalle diverse società scientifiche cardiologiche, sono sempre state storicamente suddivise in alcune grandi categorie fenotipiche: ipertrofiche, dilatative, aritmogene e restrittive.⁹⁻¹⁰ Le canalopatie, a causa dell'eterogeneità fenotipica e dell'assenza di danni strutturali a carico del miocardio, sono incluse tra le cardiomiopatie nel sistema di classificazione americano, ma non in quello europeo.⁹⁻¹⁰

La difficoltà nella definizione nasce dal fatto che le canalopatie sono dei difetti elettrici primari in cui la disfunzione del miocita può essere di natura esclusivamente elettrica, con o senza disfunzione contrattile sisto-diastolica e con o senza substrato visibile ad occhio nudo o al microscopio come nel caso della cardiomiopatia aritmogena, del blocco atrioventricolare e delle malattie dei canali ionici.¹¹

I progressi della genomica negli ultimi anni hanno permesso una maggiore comprensione dei meccanismi alla base delle cardiomiopatie ereditarie e delle canalopatie cardiache. La maggior parte di queste malattie ereditarie sono di tipo familiare e non sporadico, e mostrano trasmissione autosomica dominante, piuttosto che autosomica recessiva o legata al cromosoma X. La maggior parte di questi disturbi mostrano penetranza incompleta ed espressività variabile. Inoltre, presentano anche eterogeneità genetica, con più tipi di mutazioni in diversi geni. La variabilità fenotipica e mutazionale rende, quindi, difficile la diagnosi, la prognosi e il trattamento. In aggiunta, oggi acquista sempre più importanza, nella variabilità genotipo-fenotipo, l'effetto di geni "modificatori" e dei fattori ambientali. In questo contesto, una classificazione delle cardiomiopatie ereditarie che tenga conto della causa genetica, ovvero del sovvertimento della funzione del miocita in relazione all'espressione molecolare del gene alterato, potrebbe essere quella che le distingue in 4 gruppi principali: cardiomiopatie del citoscheletro, delle giunzioni, del sarcomero e dei canali ionici (Tab1).¹¹⁻¹²

Classificazione genomica/Postgenomica delle cardiomiopatie ereditarie ⁽¹²⁾	
Cardiomiopatie del citoscheletro (citoscheletropatie)	Cardiomiopatia dilatativa
Cardiomiopatie delle giunzioni cellulari (desmosomopatie)	Cardiomiopatia aritmogena, sindromi cardiocutanee (Naxos, Carvajal)
Cardiomiopatie sarcomeriche (sarcomeriche)	Cardiomiopatia ipertrofica e restrittiva
Cardiomiopatie dei canali ionici (canalopatie)	Sindrome di QT lungo e corto, Brugada, Catecolaminergica, malattia di Lenègre

Tab.1 Classificazione genomica delle cardiomiopatie. (Adattata da Thiene et al.)¹²

Dall'identificazione della prima mutazione patogenetica associata ad una cardiomiopatia, una mutazione puntiforme nel gene della catena pesante beta della miosina in una famiglia franco-canadese con cardiomiopatia ipertrofica nel 1990,¹³⁻¹⁴ sono state identificate oltre 600 varianti genetiche rare associate a malattia cardiomiopatica.¹⁵⁻¹⁶ E' ormai chiaro che alcune mutazioni genetiche sono la causa principale di cardiomiopatia pediatrica. Molti bambini con cardiomiopatia ipertrofica (50-60%) e in misura minore con cardiomiopatia dilatativa (20-30%) presentano una storia familiare per la malattia.⁶ I recenti progressi nella ricerca genetica dimostrano che la cardiomiopatia ipertrofica è provocata da difetti nei geni del sarcomero e può essere ereditata come carattere autosomico dominante. La cardiomiopatia dilatativa è dovuta ad alterazioni nei geni del citoscheletro e può essere ereditata come autosomica dominante, autosomica recessiva o X-linked. Le canalopatie sono dovute a mutazioni a carico dei canali cardiaci del sodio, del calcio e del potassio.¹¹⁻¹² In alcuni casi, una cardiomiopatia può essere correlata ad un'altra malattia ereditaria del metabolismo muscolare o congenita,

come la sindrome di Noonan, la malattia di Pompe, un difetto nell'ossidazione degli acidi grassi o la sindrome di Barth (Tab 2).¹⁰ Il più delle volte, i sintomi di questi disturbi si presentano già a partire dai primi anni di vita.

	HCM	DCM	ARVC	RCM	Unclassified
Familial	Familial, unknown gene	Familial, unknown gene	Familial, unknown gene	Familial, unknown gene	Left ventricular
	Sarcomeric protein mutations	Sarcomeric protein mutations	Intercalated disc protein	Sarcomeric protein mutations	non-compaction
	β myosin heavy chain	(see HCM)	mutations	Troponin I (RCM β/2 HCM)	Barth syndrome
	Cardiac myosin binding protein C	Z-band	Plakoglobin	Essential light chain of myosin	Lamin A/C
	Cardiac troponin I	Muscle LIM protein	Desmoplakin	Familial amyloidosis	ZASP
	Troponin-T	TCAP	Plakophilin 2	Transthyretin	α-dystrobrevin
	α-tropomyosin	Cytoskeletal genes	Desmoglein 2	(RCM β neuropathy)	
	Essential myosin light chain	Dystrophin	Desmocollin 2	Apolipoprotein	
	Regulatory myosin light chain	Desmin	Cardiac ryanodine	(RCM β nephropathy)	
	Cardiac actin	Metavinculin	receptor (RyR2)	Desminopathy	
	α-myosin heavy chain	Sarcoglycan complex	Transforming growth	Pseuxanthoma elasticum	
	Titin	CRYAB	factor-β3 (TGFβ3)	Haemochromatosis	
	Troponin C	Epicardin		Anderson–Fabry disease	
	Muscle LIM protein	Nuclear membrane		Glycogen storage disease	
	Glycogen storage disease (e.g. Pompe; PRKAG2, Forbes', Danon)	Lamin A/C			
	Lysosomal storage diseases (e.g. Anderson–Fabry, Hurler's)	Emerin			
	Disorders of fatty acid metabolism	Mildly dilated CM			
	Carnitine deficiency	Intercalated disc protein			
	Phosphorylase B kinase deficiency	mutations (see ARVC)			
	Mitochondrial cytopathies	Mitochondrial cytopathy			
	Syndromic HCM				
	Noonan's syndrome				
	LEOPARD syndrome				
	Friedreich's ataxia				
	Beckwith–Wiedemann syndrome				
	Swyer's syndrome				
	Other				
	Phospholamban promoter				
	Familial amyloid				
Non-familial	Obesity	Myocarditis (infective/toxic/immune)	Inflammation?	Amyloid (AL/prealbumin)	Tako Tsubo cardiomyopathy
	Infants of diabetic mothers			Scleroderma	
	Athletic training	Kawasaki disease		Endomyocardial fibrosis	
	Amyloid (AL/prealbumin)	Eosinophilic (Churg Strauss syndrome)		Hypereosinophilic syndrome	
		Viral persistence		Idiopathic	
		Drugs		Chromosomal cause	
		Pregnancy		Drugs (serotonin, methysergide, ergotamine, mercurial agents, busulfan)	
		Endocrine		Carcinoid heart disease	
		Nutritional — thiamine, carnitine, selenium,		Metastatic cancers	
		hypophosphataemia,		Radiation	
		hypocalcaemia		Drugs (anthracyclines)	
		Alcohol			
		Tachycardiomyopathy			

Tab.2 Esempi di differenti patologie che possono causare cardiomiopatia. (Adattata da Elliott et al.)¹⁰

2.6 CARDIOMIOPATIA ONCOCITICA

Debra Kearney nel 1997 definì la cardiomiopatia oncocitica “an entity in search of an identity”,¹⁷ un’entità in cerca di una identità, e dopo quasi 20 anni questa patologia ancora non è classificabile né tra le cardiomiopatie, né tra le canalopatie, né tra i tumori cardiaci, pur presentando alcuni aspetti morfologici e funzionali comuni a tutte le condizioni.

E’ una malattia rara, aritmogena, caratterizzata da lesioni amartomatose delle cellule di Purkinje, che si verifica principalmente nei primi due anni di vita con un rapporto femmina-maschio di 3:1. Colpisce prevalentemente bambini caucasici (80%), seguita dagli afro-americi (15%) e latino-americi (3%), ma è rara nei bambini orientali.¹⁸ Dalla sua prima descrizione di Voth (1962),¹⁹ sono stati pubblicati diversi sinonimi per questa patologia: aracnoidosi del miocardio, cardiomiopatia infantile, cardiomiopatia xantomatosa infantile, cardiomiopatia oncocitica, lipidosi cardiaca isolata, cardiomiopatia infantile con cambiamento istiocitoide, amartoma del miocardio o del sistema di conduzione, trasformazione schiumosa del miocardio e cardiomiopatia congenita.²⁰

Ad oggi, sono stati descritti circa 100 casi di HC, ma la prevalenza di questa patologia può essere superiore a quella dei casi riportati, considerando che alcuni casi sono scambiati per Sindrome da morte improvvisa neonatale (SIDS).²¹⁻²²

Una tendenza familiare è stata riportata da Bruton, et al. (1977) e Suarez, et al. (1987),²³⁻²⁴ ma solo nel 1999 è stato istituito un Registro mondiale di HC. I dati ottenuti dai casi segnalati in questo Registro indicano una tendenza familiare di questa cardiomiopatia di circa il 5%.²⁰

La maggior parte dei casi pubblicati presenta aritmie, tuttavia, alcuni bambini sono stati erroneamente classificati come SIDS, mentre altri presentano solo sintomi simil-influenzali precedenti o contemporanei alle manifestazioni cardiache. Nella maggior parte dei casi è descritta la cardiomegalia.

Malformazioni cardiache sono state descritte approssimativamente nel 16% dei casi e anomalie extra-cardiache in circa 17% dei casi.²⁵ Tra i difetti a carico del cuore, sono stati descritti: anomalie ventricolari, atriali e del setto, fibroelastosi endocardica, ipoplasia del cuore sinistro e sindrome Wolff-Parkinson-White;¹⁷⁻¹⁸⁻²² invece, le manifestazioni extra-cardiache principali comprendono opacità corneale, microftalmo, idrocefalo e palatoschisi.²⁰⁻²¹⁻²³

L'accumulo di cellule istiocitoidi nelle ghiandole endocrine ed esocrine è stato descritto in 4 casi.²⁶⁻²⁷⁻²⁸⁻²⁹

La comprensione dell'eziopatogenesi della HC ha impegnato i ricercatori per decenni e sono state proposte numerose teorie per le basi molecolari/genetiche di questa patologia: X-linked dominante (Xp22),²⁷ mutazione nella citocromo b,³⁰ mutazione nella SRY (determinazione del sesso regione Y)-casella 6 (Sox6),³¹ e mutazione A8344G (stessa mutazione della Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers, MERRF) nel DNA mitocondriale.³² Tuttavia, tali teorie sembrano basarsi su casi sporadici, in quanto non sono stati trovati in altri pazienti, nonostante il lavoro di collaborazione tra gli autori e l'utilizzo del materiale del Registro HC.

Il collegamento tra cardiomiopatia oncocitica e infezioni virali intrauterine non è stato confermato.²²⁻³³ Queste ultime potrebbero spiegare le anomalie a carico di altri organi riportati

in alcuni casi,¹⁸⁻³⁴ ma non la spiccata predominanza di femmine affette, che è molto più probabilmente dovuta a fattori genetici.³⁵

I reperti istologici sono patognomonici della condizione, con noduli giallo-rossicci nel miocardio e, in alcuni casi, nelle aree del subendocardio e del subepicardio. I noduli sono composti da nidi di cellule schiumose simil-istiocitarie con citoplasma granulare contenente gocce lipidiche e numerosi mitocondri atipici.³⁶ I nuclei sono arrotondati e centrali.³⁷

Studi di immunostochimica e ultrastrutturali dimostrano chiaramente che le cellule istiocitoidi o oncocitiche sono dei cardiomiociti alterati. Queste cellule, infatti, reagiscono negativamente al lisozima, al CD68 e all' α_1 -antitripsina (markers degli istiociti) e positivamente alla miosina, all'actina e alla desmina (markers dei cardiomiociti).³⁸⁻³⁹ Alcuni autori hanno proposto che queste cellule derivino dal sistema di conduzione atrio-ventricolare e che possano essere il risultato di un'anormalità di sviluppo del sistema o rappresentare un tumore diffuso delle cellule di Purkinje.⁴⁰ Questa teoria è supportata dal fatto che le cellule istiocitoidi mostrano un diametro più largo, un citoplasma vacuolato e chiaro, una disposizione prevalente nel subendocardio del ventricolo sinistro, una mancanza di tubuli T e una reazione positiva alla colinesterasi;⁴¹ ma è in contrasto con l'evidenza che le cellule oncocitiche reagiscono negativamente agli antigeni di proliferazione (Ki-67), e differenziazione (PAX-7), tipici delle neoplasie.⁴²

Se non trattata, la cardiomiopatia oncocitica risulta fatale entro i primi 2 anni di vita.

Fortunatamente, nelle ultime due decadi, sono stati messi a punto nuovi approcci terapeutici

per il trattamento di questa condizione letale. Gli interventi ablativi con radiofrequenza dei difetti di conduzione sono risultati in alcuni casi efficaci nel trattamento delle aritmie.⁴³ Inoltre, sono stati riportati casi di interventi chirurgici con un buon decorso e una lunga sopravvivenza.⁴⁴⁻⁴⁵

2. SCOPO DELLA TESI

Grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Cardiologia e Anatomia Patologica dell'ospedale Niguarda Ca'Granda di Milano, a partire dal 2011 ho iniziato ad occuparmi dello studio di alcune cardiomiopatie genetiche. Dopo aver elaborato un nuovo metodo per la diagnosi della malattia di Anderson-Fabry, sono stata coinvolta nello studio di alcuni casi clinici complessi.

In particolare, è stato possibile analizzare il DNA di una bambina di 16 mesi che presentava miocardio non compattato e aritmie recidivanti per le quali era portatrice di defibrillatore cardiaco impiantabile (ICD). In considerazione della sintomatologia clinica, la diagnosi iniziale è stata di cardiomiopatia ventricolare destra aritmogena/canalopatia, ma il sequenziamento diretto con metodo Sanger dei geni più comunemente coinvolti in questo tipo di cardiomiopatie (TGFB3, RYR2, DSP, PKP2, DSG2, DSC2, JUP, KCNQ1, KCNE1, KCNE2, SCN5A, CACNA1C), aveva avuto esito negativo.

Allo scopo di valutare e identificare a livello molecolare le mutazioni genetiche responsabili di questo fenotipo anomalo, si è pensato di eseguire un sequenziamento su larga scala di geni candidati in diverse cardiomiopatie familiari. In collaborazione con l'Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (Inibic-Spagna) e l'University College of London (UCL-Inghilterra), è stato possibile, quindi, genotipizzare simultaneamente un pannello di 126 geni tramite sequenziamento di nuova generazione. In questa fase del progetto, che ho svolto all'estero,

sono stata coinvolta nella preparazione delle librerie di DNA genomico e nel loro sequenziamento, nonché in una parte dell'analisi delle sequenze prodotte.

Inoltre, nei mesi in cui è stata effettuata l'indagine genetica, la paziente è stata sottoposta a trapianto cardiaco e ciò ha permesso di poter effettuare anche uno studio istologico sul tessuto.

Dall'analisi immunoistopatologica è stato possibile effettuare una diagnosi certa di cardiomiopatia oncocitica e comprendere più approfonditamente l'eziopatogenesi di questo fenotipo.

Lo scopo di questa tesi è descrivere un caso clinico dal fenotipo complesso di cui sono disponibili i dati clinici, istologici e genetici. In considerazione della rarità della cardiomiopatia oncocitica e delle poche informazioni in merito, talvolta anche contrastanti tra loro, questo lavoro vuole fornire le basi e le metodiche per lo studio di nuovi geni candidati implicati in questa cardiomiopatia.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Caso clinico

Bambina nata nel maggio del 2011 con una gravidanza regolare e un peso alla nascita di 2920g. Al primo ricovero presso l'Ospedale Niguarda Ca'Granda viene sottoposta a: elettrocardiogramma (ECG), che identifica sindrome di Wolf Parkinson White (WPW); ecocardiogramma, che documenta ipoacinesia dei segmenti medio-basali del ventricolo sinistro (LV) con ridotta funzione sistolica (EF 45%); Holter ECG, che rileva stabile preeccitazione, alcuni episodi di tachicardia parossistica sopraventricolare ed un episodio di aritmia ventricolare; studio elettrofisiologico transesofageo (stimolazione atriale transesofagea, SATE), che evidenzia un ritmo sinusale con costante preeccitazione; indagini biochimiche, genetiche e radiologiche: RX torace, che evidenzia leggera cardiomegalia; ecografia delle anche, che risulta normale; test di funzionalità tiroidea, che evidenzia livelli elevati di TSH (5.9 microU/mL) contro concentrazioni normali degli ormoni FT3 e FT4 (3.8 e 14.3 pg/mL); analisi molecolare dei gene KCNQ1 e SCN5a che non evidenziano mutazioni patologiche.

A 4 mesi dalla nascita, dopo altri 2 ricoveri d'urgenza e una crescita lenta, le viene impiantato un defibrillatore cardiaco impiantabile (ICD) con coil posteriore e anteriore sottocutaneo, che richiederà 4 successivi interventi per la sostituzione del generatore per esaurimento.

Nel dicembre 2011, dopo numerosi ricoveri per frequenti interventi del defibrillatore, viene documentata, tramite ECG, la presenza di via anomale multiple: una laterale sinistra e l'altra

postero laterale sinistra, quest'ultima è stata sospettata su un tracciato in cui è presente una normale conduzione AV ma con evidente onda delta (Fig. in Appendice). Inoltre, l'analisi dei vari episodi tachiaritmici ventricolari su cui è avvenuta regolarmente la scarica dell'ICD ha suggerito che l'aritmia si innesca con una extrasistole (sopraventricolare) che produce una tachicardia che rapidamente raggiunge elevati valori di frequenza cardiaca con le caratteristiche della torsione di punta (TdP). Sempre le varie registrazioni ECG hanno documentato la presenza di episodi in cui si osserva un allungamento dell'intervallo QTc (valore massimo 510 msec). In seguito a tali osservazioni è stato ipotizzato che potessero essere presenti degli episodi di tachicardia sopraventricolare che utilizzano un macrorientro lungo due vie anomale con rapida degenerazione in tachiaritmia ventricolare parzialmente sincronizzata e si è programmato un intervento di crioablazione del circuito, avvenuto nel gennaio 2012.

Dopo numerosi storm aritmici, nel maggio 2012 viene sottoposta a simpaticectomia, ipotizzando una tachicardia ventricolare catecolaminergica polimorfica, ma anche questo intervento come il precedente risulta inefficace nel controllo delle aritmie.

La terapia farmacologica ha previsto inizialmente betabloccanti, successivamente flecainide e captopril e infine amiodarone per nuovi episodi di tachicardia parossistica sopraventricolare, ma nessuno dei trattamenti è risultato utile.

Nel luglio 2012 viene ricoverata in rianimazione per l'ottavo episodio di storm aritmico e inserita in lista trapianto ordinario (Status 2A) il 18/7 e successivamente cambiata di status a

2B il 25/07 per recidiva di storms aritmici subentranti e deterioramento della funzione contrattile sinistra (EF 25%). Inoltre, viene segnalato un difficoltoso accesso venoso centrale e periferico per cui si esegue una venografia che evidenzia l'occlusione delle vene femorali e della vena omerale e ascellare destra e della succlavia al tratto distale; pervietà della vena succlavia sinistra e della giugulare interna sinistra.

Nell'agosto del 2012 le vengono effettuate vaccinazioni pre-trapianto per: difterite, epatite B, Haemophilus, morbillo, parotite, pertosse, pneumococco 13 valente, poliomelite, rosolia, tetano, varicella, essendo già risultata positiva a citomegalovirus (CMV), ma negativa a toxoplasma e epatite C (HPV). La somministrazione di vaccini inattivati è avvenuta secondo lo schema vaccinale di routine del bambino sano, e si è effettuata la vaccinazione anti-influenzale annuale con virus inattivato nel periodo stagionale, sia nella bambina sia nei familiari. La somministrazione di vaccini con virus vivi (anti Morbillo, Parotite, Rosolia, Varicella) è avvenuta tenendo in considerazione che sarebbero dovute passare almeno 4 settimane tra la vaccinazione e il trapianto.

Inoltre, viene effettuata un'indagine molecolare ad ampio spettro: l'analisi simultanea di 126 geni implicati in cardiomiopatie familiari, che evidenzia una duplice mutazione genetica per i canali ionici.

A fine settembre 2012 è sottoposta a trapianto di cuore ortotopico con tecnica bicavale e le viene asportato il defibrillatore cardiaco impiantabile.

Dai rilievi effettuati sul cuore espiantato emerge una degenerazione rabdomiomatosa sia del miocardio che del tessuto di conduzione.

Viene dimessa a fine ottobre in buone condizioni e ad oggi presenta un buon decorso post-operatorio: l'ultima ecocardiografia effettuata nel gennaio 2013 documenta un ventricolo sinistro con dimensioni normali, spessori parietali ai limiti superiori, cinesi normale; valvola mitralica e aorta normali.

3.2 Analisi genetiche

La valutazione di varianti genomiche è stata effettuata su DNA estratto da sangue periferico.

In particolare, il DNA genomico è stato estratto, partendo da sangue intero anticoagulato utilizzando il kit di estrazione e purificazione Nucleon (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA) seguendo le istruzioni del produttore.

3.2.1 Sequenziamento con metodo Sanger.

Pur non essendoci familiarità per morte improvvisa giovanile, e nella famiglia solo la madre e la zia sono affette da Difetto Inter-Atriale *ostium secundum* (DIA OS), si è pensato di eseguire la genotipizzazione dei geni KCNQ1 e SCN5A (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 e sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit), entrambi responsabili della sindrome del QT lungo (LQTS).⁴⁶

Il sequenziamento genetico è stato effettuato con metodo Sanger automatizzato, che si basa sulla sintesi di una reazione di sequenza a partire da un template di DNA, preventivamente amplificato e purificato.

L'intera regione codificante dei geni KCNQ1 e SCN5A, le giunzioni introne/esone e le regioni non tradotte in 5' ed in 3', sono state sequenziate dopo che i distinti frammenti corrispondenti agli esoni (16 esoni per KCNQ1 e 28 esoni per SCN5A) sono stati amplificati mediante PCR.

I primer sono stati disegnati considerando i seguenti parametri: lunghezza di 18-24 bp, temperatura di melting (T_m) di 62-64°C e contenuto medio in GC del 45-60%. Inoltre, le regioni contenenti sequenze ripetute che potrebbero provocare un'amplificazione aspecifica, sono state analizzate con il software "RepeatMasker".

La reazione di sequenza è stata condotta con il kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems Inc Foster City, CA), che prevede che alla miscela di reazione siano aggiunti quattro deossiribonucleotidi trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), che consentono l'allungamento del filamento; e analoghi 2',3'-dideoossi di ogni base (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marcati con una diversa fluorescenza. L'incorporazione dei dideoossi interrompe a diversi livelli la crescita della nuova catena, essendo essi privi del terminale ossidrilico in 3' necessario per formare il successivo legame fosfodiesterico.

In questo modo si producono casualmente frammenti di lunghezza diversa, tutti con un dideoossiribonucleotide marcato all'estremità 3'. Il prodotto generato, viene, quindi, caricato nel sequenziatore automatico (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystem, Inc Foster City, CA)

dove all'interno di capillari, viene separato per via elettroforetica. Durante la corsa elettroforetica un raggio laser (emissione a 490 nm), colpisce i frammenti di DNA e ciò comporta l'eccitamento dei fluorocromi che marciano i frammenti (ogni fluorocromo emette ad una lunghezza d'onda diversa). Una cellula fotoelettrica, dunque, rileva la sequenza, il tipo e l'intensità delle emissioni luminose e il tutto è convertito dal software in un sistema grafico che riproduce il classico elettroferogramma, in cui la sequenza dei picchi corrisponde alla sequenza dei nucleotidi ed il colore del picco corrisponde al tipo di base azotata (Fig.2).

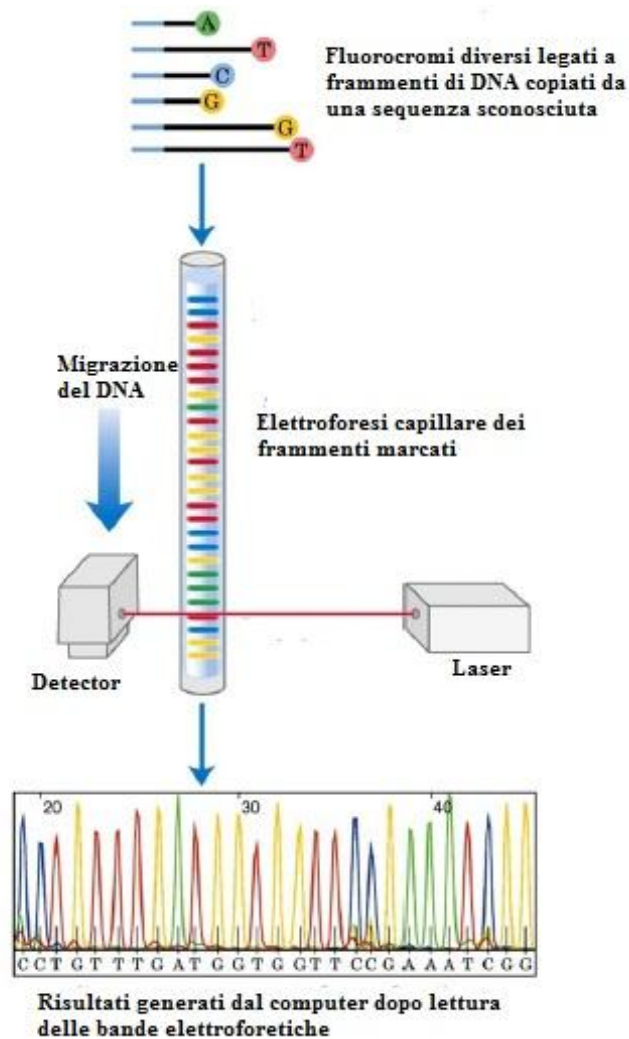


Fig. 2 Sequenziamento con metodo Sanger

3.2.1 Sequenziamento di nuova generazione

La purezza e la quantità del DNA sono state valutate utilizzando il fluorimetro Qubit® spettrofluorimetro 2.0, mediante il Kit Qubit® dsDNA BR Assay (entrambi Life Technology Corporation, Carlsbad, CA, US). Per verificare l'integrità dell'acido nucleico, è stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio al 2% e successivamente visualizzato con luce ultravioletta (GelDoc sistema 2000 con il software Quantity One / BioRad, USA).

Il DNA è stato, quindi, frammentato mediante sonicazione, utilizzando 3µg di DNA diluito in un volume finale di 120µL di Tris-EDTA. Ciascun campione è stato sonicato singolarmente in un microtubo chiuso, utilizzando un Covaris S2. Questo strumento genera la formazione e successivamente il collasso di microbolle di getti d'aria, che comporta l'interruzione fisica dell'acido nucleico, il taglio del DNA come una ghigliottina, e la produzione di una microscala di frammenti dell'acido nucleico. Per l'applicazione utilizzata in questo studio, è stato usato un protocollo in grado di generare una serie di frammenti della lunghezza di 150-250bp.

Il processo di frammentazione comporta la necessità di riparare e fosforilare le estremità 5' e 3' dei frammenti di DNA, per questo essi vengono incubati con una DNA polimerasi Klenow exo- 3'-5', una DNA polimerasi T4 e una chinasi T4, in presenza di dNTP.

I frammenti di DNA riparati e purificati, sono stati adenilati in 3', e poi sono stati aggiunti degli adattatori (IDT) con l'impiego di una DNA ligasi.

I geni di interesse sono stati analizzati utilizzando sonde di RNA complementari alle sequenze bersaglio con la tecnologia SureSelect^{XT} Agilent (Agilent Technologies, Inc Santa Clara, CA). Successivamente, utilizzando dei primers compatibili con gli adattatori, si è effettuata una pre-amplificazione mediante PCR. Il processo di arricchimento avviene in soluzione con sonde di cRNA biotinilati ultra lunghi (120mer) chiamati anche "esca", "esche", o "oligo". Le sonde ad RNA consentono la cattura del DNA attraverso la formazione di un ibrido più stabile delle sonde DNA-DNA.

La cinetica di ibridazione della cattura è stata ottimizzata in modo da avere una reazione che avviene con un eccesso di "esche", al fine di arricchire le sequenze di DNA. Questa ottimizzazione della cinetica di cattura permette un tempo di ibridazione molto breve (solo 24 ore a 65°C), senza compromettere la qualità dei dati. Inoltre, consente di diminuire la quantità di materiale genetico iniziale: si può partire anche da 1µg di DNA genomico.

In questo progetto, la libreria è stata disegnata in modo da avere una sovrapposizione tra le sonde ogni 60 nucleotidi, al fine di coprire così tutte le regioni target almeno due volte (2X).

Una volta catturate le sequenze di interesse, si è proceduto con l'amplificazione delle stesse mediante PCR. Inoltre, ogni campione è identificabile grazie ad una piccola sequenza di sei nucleotidi che permette di risalire alle letture corrette generate dal sequenziatore. Dopo purificazione degli ampliconi con delle biglie magnetiche (Agencourt Ampure XP, Beckman), la concentrazione e la distribuzione dei frammenti delle librerie sono state determinate mediante corsa su Chip DNA 1000 nel Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc Santa

Clara, CA). Dopo opportuna titolazione, le librerie sono state ibridate e amplificate sulla superficie di una flow-cell, mediante amplificazione a ponte (bridge amplification), con formazione di clusters, e quindi sequenziate con l'Hi-Seq 2000 (Illumina Inc San Diego, CA), in corse paired-end da 100bp (Fig.3).

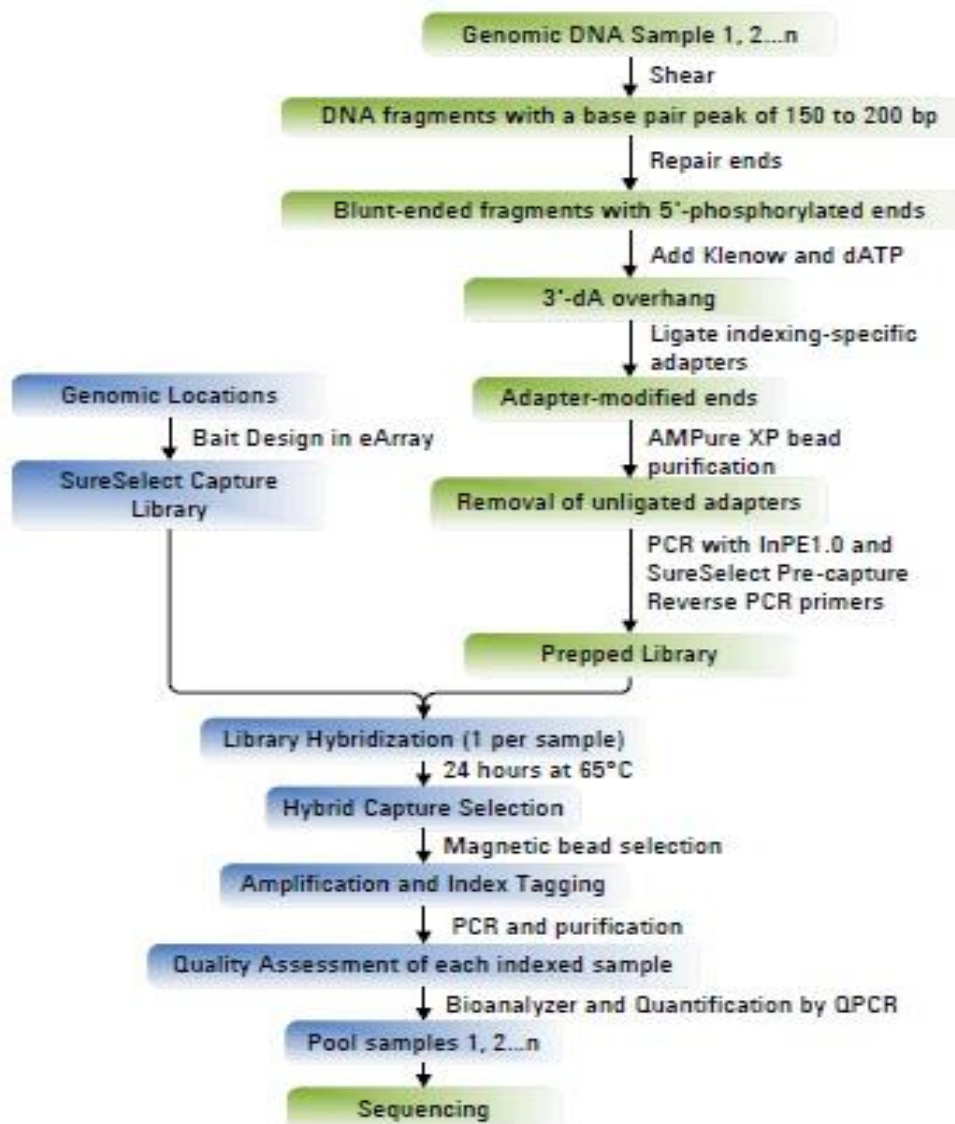


Fig. 3 Sommario del protocollo di preparazione del campione di DNA per NGS.

La tecnologia NGS utilizzata da questo sequenziatore si basa sulla sintesi con terminatori reversibili. Nel sequenziamento con metodo Sanger i nucleotidi modificati bloccano la sintesi del DNA in modo irreversibile, mentre quelli utilizzati nella tecnologia di Illumina possono essere riattivati, grazie all'azione di un enzima che rimuove il gruppo di blocco che impedisce alla DNA polimerasi di aggiungere un altro nucleotide. In questo modo è possibile, mediante fotografie delle fluorescenze emesse a ogni passaggio da tutte le molecole di DNA depositate sul vetrino (Fig.4), monitorare in tempo reale l'aggiunta di tutti i nucleotidi su ogni frammento.

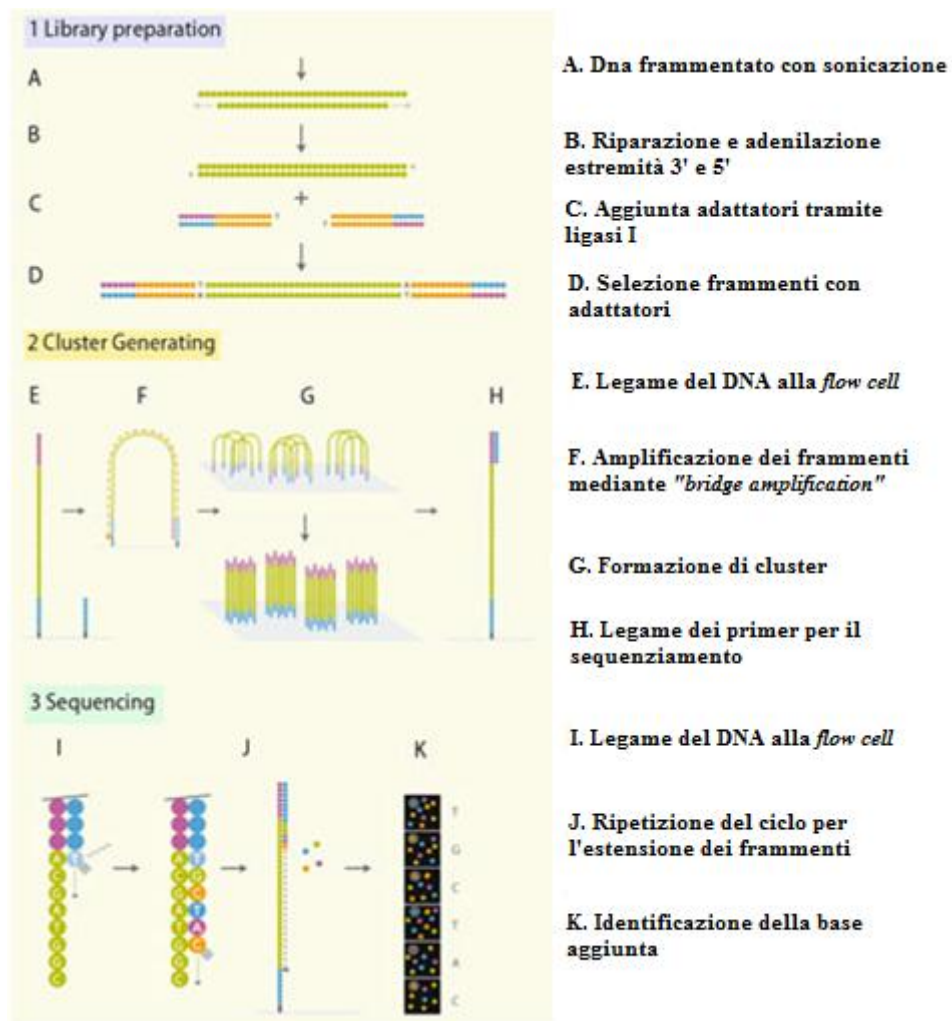


Fig. 4 Sommario del processo di sequenziamento con metodo SOLEXA.

3.4 Analisi bioinformatiche

L'analisi dei dati ottenuti da un sequenziamento di nuova generazione è costituita principalmente da tre fasi:

- Allineamento delle sequenze
- Rilevamento di varianti
- Annotazione delle varianti

L'allineamento viene eseguito con un software commerciale (Novoalign) che genera come output un file di tipo *Sam* con informazioni e allineamenti di qualità.

Successivamente si rilevano le differenze o le variazioni che emergono dal confronto degli allineamenti con il genoma di riferimento (Human Genome 19). Questa fase si realizza mediante l'uso di *samtools*, che grazie all'opzione *mpileup*, genera un file *vcf* con informazioni sulla posizione e la qualità di tutte le varianti identificate.

Infine queste varianti mediante l'impiego di ANNOVAR (software gratuito) sono confrontate con il database di sequenze RefSeq e con i database che riportano le frequenze di popolazione delle varianti (dbSNP, 1000genomas e HapMap). Il confronto con le differenti banche dati permette di classificare il tipo di variante (sinonima, non sinonima, splicing, etc.) e contribuisce a determinare la possibile patogenicità dell'alterazione genica.

Ciascuna delle tre fasi delle analisi può essere ulteriormente suddivisa in diverse tappe:

Allineamento:

1. Novoalign: allineamento;
2. Samtools view: conversione del file sam in bam (formato binario, quindi compresso del file sam) e filtraggio dei frammenti allineati correttamente;
3. Sort samtools: ordinamento dei frammenti allineati;
4. Samtools rmdup: filtraggio dei frammenti duplicati derivanti dal processo di amplificazione di un singolo frammento (reazione di PCR);
5. Indice samtools: genera un file indicizzato BAM per visualizzare l'allineamento dei frammenti;

Rilevamento di varianti e valutazione della copertura:

1. Opzione mpileup in samtools: permette il rilevamento delle varianti e l'ottenimento dei dati di copertura dopo aver filtrato gli allineamenti di bassa qualità;

Annotazione delle varianti:

1. ANNOVAR: annotazione delle varianti dopo il confronto con database di sequenze geniche;
2. addAdditionalInfo.pl: mediante l'esecuzione di uno script in linguaggio Perl, si aggiungono informazioni relative a ciascuna variante, come esistenza di omopolimeri,

presenza di zone ripetitive, presenza di varianti strutturali e/o di alterazioni della sequenza già riportate in letteratura.

Per tutte le varianti identificate per la prima volta, sulle quali non è possibile ricavare informazioni dalla letteratura, si valuta il grado di patogenicità attraverso l'utilizzo di almeno 3 software. In particolare, in questo lavoro, per la predizione della struttura proteica (*analisi in silico*), sono stati utilizzati: SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant); Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping), e Pmut (Point Mutant).

3.5 Analisi istologiche

Il campione derivante dalla cardiectomia era costituito da una massa ventricolare di gr. 58 di cm 6,2x6,5 (laterale x longitudinale), sede di ispessimento flogistico diffuso del pericardio. Sulla parete posteriore del ventricolo destro era presente un catetere epicardico elettrostimolatore impiantato. Entrambi i ventricoli erano dilatati ed erano evidenti sul versante sinistro del setto interventricolare, a 3 mm dal trigono fibroso, gli esiti di una pregressa ablazione di 0,5 cm dell'asse maggiore.

Il setto interventricolare muscolare presentava inoltre una cicatrice simil-ischemica subrecente di 1,2 cm. Il ventricolo destro appariva indenne, così come le coronarie e le valvole. Non sono state rilevate particolari differenze nella trabecolatura ventricolare rispetto alle forme comuni di cardiomiopatia dilatativa.

Sono stati prelevati e analizzati:

A) Macrosezioni centrate sulla crux cordis

B) trabecolatura apicale

C) ventricolo destro residuo

Le colorazioni effettuate sono state Ematossilina-Eosina, colorazione di Masson e anticorpi anti-B-miosina e anti proteina S-100.

3.5.1 Inclusione in paraffina

L'organo subito dopo il prelievo è stato processato per l'inclusione in paraffina. Al prelievo è seguita la riduzione in pezzi di piccole dimensioni e la fissazione per almeno 24 ore in soluzione di formalina (Sigma Aldrich Corp, Saint Louis, MO) al 4% in acqua milliQ. Al termine della fissazione i pezzetti sono stati sciacquati in acqua distillata per eliminare i residui di formalina che potevano interferire con la successiva colorazione e quindi disidratati mediante passaggi successivi in soluzioni di etanolo a concentrazioni ascendenti. In particolare, sono stati eseguiti passaggi di 2 ore in etanolo al 70%, 2 ore in etanolo al 80%, 2 ore in etanolo al 90%, 5 ore in etanolo al 95%, 2 ore in etanolo al 100%. Successivamente, è stata eseguita la diafanizzazione mediante passaggio di un'ora in soluzione di xilene ed etanolo assoluto (1:1, v/v) e quindi in xilene per un'ulteriore ora. Al termine della disidratazione i pezzetti sono stati posti in paraffina preriscaldata a 60°C per 2 ore al fine di impregnare tutto il tessuto di paraffina e quindi inclusi e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Al microtomo (RM2245, Leica, Germany) sono state ottenute sezioni dello spessore di 4 µm, che sono state fissate su vetrini portaoggetti SuperFrost Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany).

3.5.2 Colorazione ematossilina eosina

Sulle sezioni di 4 µm ottenute al microtomo è stata eseguita la colorazione ematossilina-eosina secondo i comuni protocolli. Le sezioni sono state preventivamente deparaffinate tramite due passaggi in xilene e idratate tramite una scala discendente di concentrazioni di etanolo: assoluto, 95%, 80% e 70%. L'idratazione si è conclusa quindi con un passaggio di 10 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con il colorante ematossilina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) che colora i nuclei di blu-violetto, per 3 minuti, lavata e contrastata per 3 minuti in acqua di fonte. Quindi è stato effettuato il trattamento con eosina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) per 2 minuti e lavata ancora velocemente in acqua distillata.

Dopo disidratazione con passaggi rapidi in etanolo 80%, 95%, 100% e xilene è stato eseguito il montaggio con Histochoice® Mounting Media (AMRESCO, LLC - Solon, OH).

3.5.3 Colorazione Tricromica di Masson

È stata eseguita la colorazione speciale Tricromica di Masson, che mette in evidenza le fibre di collagene (colorazione verde) e quindi l'eventuale presenza di fibrosi. Il metodo associa una colorazione nucleare ottenuta con ematossilina ferrica di Weigert, una colorazione delle emazie con acido picrico e una colorazione del connettivo con due differenti coloranti acidi. Per la colorazione è stato utilizzato un kit commerciale (Bio-Optica Spa, Milano). In breve, il procedimento utilizzato è il seguente: dopo aver deparaffinato ed idratato le sezioni, esse sono state trattate per 10 minuti con Ematossilina ferrica sec. Weigert, sol. B, ed Ematossilina

ferrica sec. Weigert, sol. A. I vetrini sono stati sgocciolati e sulle sezioni è stato posto acido picrico in soluzione alcolica, lasciandolo agire per 4 minuti. In seguito ad un rapido lavaggio in acqua distillata è stata posta sulle sezioni fucsina di Ponceau B per 4 minuti. I vetrini sono stati lavati in acqua distillata e subito sono stati trattati con Acido fosfomolibdico al 1% per 10 minuti. Senza sciacquare, i vetrini sono stati sgocciolati e trattati con verde luce allo 0,3% per 5 minuti. Le sezioni sono state lavate in acqua distillata e quindi disidratate rapidamente attraverso la serie ascendente di alcol. L'ultimo passaggio è stato effettuato in xilene ed i vetrini sono poi stati montati con Histochoice® Mounting Media (AMRESCO, LLC - Solon, OH).

3.5.4 Immunoistochimica

E' stata effettuata un'analisi immunoistochimica per la catena pesante della beta-miosina e per la proteina S-100. Brevemente, le sezioni paraffinate di 4 µm sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante successivi passaggi in etanolo 100%, 95% e 70%, ed infine in acqua distillata. Successivamente, sono state sottoposte ad un trattamento con una soluzione di H₂O₂ per 5 minuti a temperatura ambiente allo scopo di bloccare le perossidasi endogene. Per limitare le eventuali aspecificità di reazione, è stato applicato per 15 minuti il siero intero, non immune, della stessa specie dell'anticorpo secondario. Le sezioni sono state poi incubate per tutta la notte a 4°C con i seguenti anticorpi primari:

- Skeletal Myosin (Fast) (Biomedica Corp, Foster City, CA cod.V1025) diluito 1:50
- S-100 (Dako North America, Inc Carpinteria, CA cod.Z311) diluito 1:4000

Dopo i lavaggi con il tampone Fosfato (PBS) le sezioni sono state incubate con l'antisiero secondario diretto contro le IgG dell'antisiero primario, per 30 minuti a temperatura ambiente, e con i complessi streptoavidina-biotina perossidasi. Lo sviluppo è stato effettuato con una soluzione di 3-amino-9-etil-carbazolo al 100% in N-N-Dimetilformamide seguito dal contrasto nucleare con ematossilina e dal montaggio in soluzione acquosa. E' stato utilizzato un controllo negativo per ogni antigene studiato, ovvero campioni incubati con il solo anticorpo secondario omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità).

4. RISULTATI

4.1 Analisi genetiche

Considerando la sintomatologia clinica e le alterazioni presenti nell'elettrocardiogramma, le prime indagini molecolari sono state indirizzate allo studio di geni implicati in disturbi del ritmo cardiaco, quali KCNQ1 e SCN5A (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 e sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit), entrambi responsabili della sindrome del QT lungo (LQTS).⁴⁶ L'analisi con il tradizionale sequenziamento di tipo Sanger non ha evidenziato mutazioni patologiche (Fig.5)

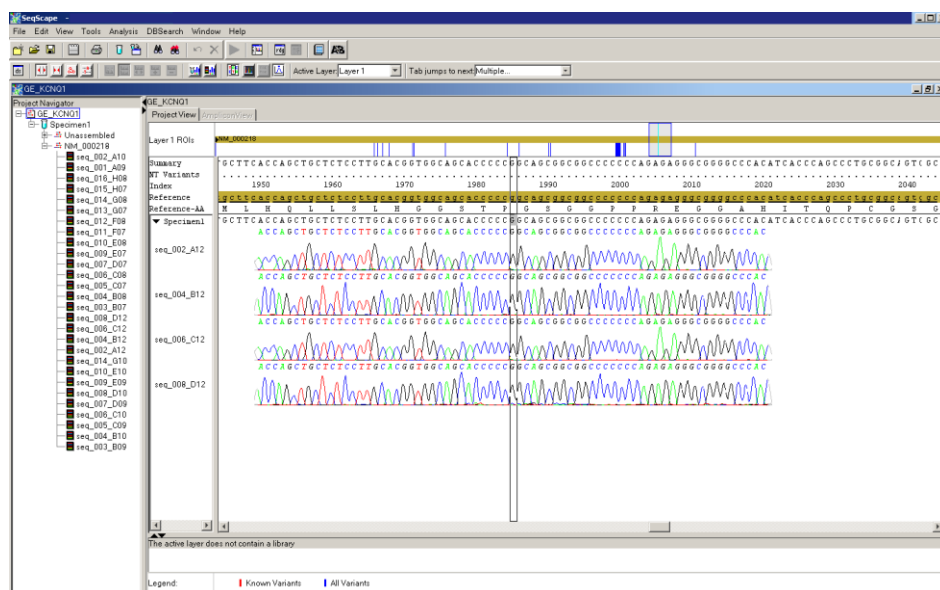


Fig. 5 Schermata di assemblaggio con il software SeqScape: sono mostrate 4 sequenze per la stessa regione di KCNQ1; coverage 4X.

L'analisi molecolare con sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing) ha evidenziato numerose alterazioni genetiche, ma non tutte di significato patologico. In particolare, la tabella 3 fornisce un sommario di tutte le varianti identificate nei geni analizzati

in questo studio, mentre informazioni più dettagliate, nonché i dati sulla qualità del sequenziamento, sono riportate in appendice.

○ TOTAL EXONIC VARIANTS	263
• FRAMESHIFT DELETION	0
• FRAMESHIFT INSERTION	0
• NONFRAMESHIFT DELETION	2
• NONFRAMESHIFT INSERTION	2
• NONSYNONYMOUS	113
• SYNONYMOUS	146
• STOPGAIN	0
• STOPLOSS	0
○ TOTAL INTRONIC VARIANTS	3111
• SPLICING SITES	35
○ TOTAL VARIANT IN UTR REGION	386
• UTR5'	41
• UTR3'	345

Tab. 3 Sommario di tutte le variazioni geniche identificate nei 126 geni.

Tra tutte le mutazioni rilevate, alcune sembrano essere di significato clinico sconosciuto e potenzialmente responsabili del fenotipo della paziente. In particolare, è stata identificata una inserzione nel gene CACNA2D1 (NC_000007.13:g.81603880_81603881insAA), e un polimorfismo a singolo nucleotide nel gene RANGFR (NP_057576.2:p.Pro155Ser/NC_000017.10:g.8193156C>T); entrambe le varianti non sono mai state descritte prima in letteratura e sono presenti in eterozigosi.

Il gene CACNA2D1 (39 esoni), codifica per una subunità del canale del calcio (L-type) e le poche mutazioni identificate a carico di questo gene sono state associate a perdita di funzionalità del canale del calcio e a “J wave syndromes”.⁴⁷⁻⁴⁸ La sequenza trovata alterata risulta molto conservata tra i vertebrati (Fig. 6),⁴⁹ e attraverso analisi in silico è emerso che questa variazione potrebbe alterare il sito di splicing a livello dell’esone 25.

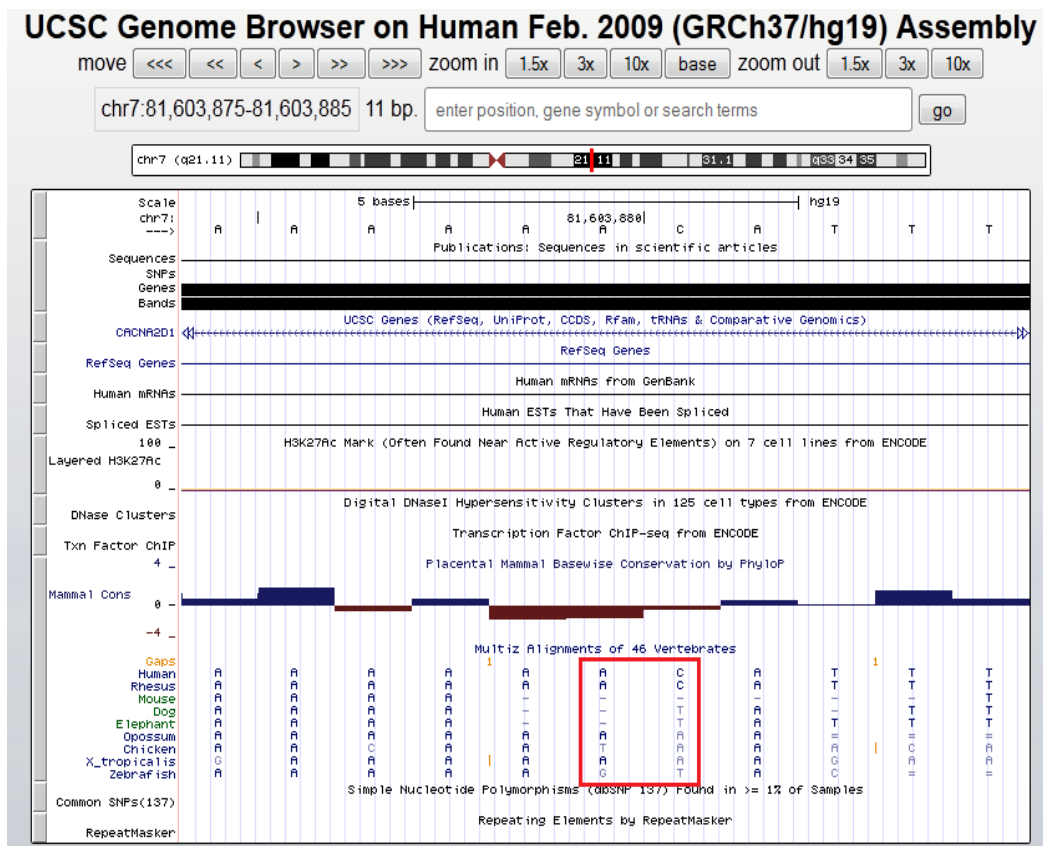


Fig. 6 Schermata di Genome Browser,⁴⁹ in cui è riportata la conservazione della sequenza di CACNA2D1 in diversi vertebrati.

Il gene RANGRF (alias MOG-1, costituito da 5 esoni) codifica per un cofattore del canale del sodio (Nav1.5), regolandone la funzionalità. Le alterazioni genetiche identificate fino ad ora comportano la perdita di funzionalità del canale sodico con problemi di ripolarizzazione e aritmie.⁵⁰⁻⁵¹ La sequenza del gene presenta alta omologia tra diversi tipi di vertebrati (Fig.7),⁴⁹

e la mutazione identificata comporta il cambio della prolina in serina (Pro155Ser), ovvero il cambio di un amminoacido non polare in un uno polare non carico (distanza di Graham:74). Quest'alterazione produce cambiamenti moderati nelle proprietà fisico-chimiche della proteina come idrofobicità, massa e polarità, e dalle predizioni in silico risulta probabilmente patogenica.

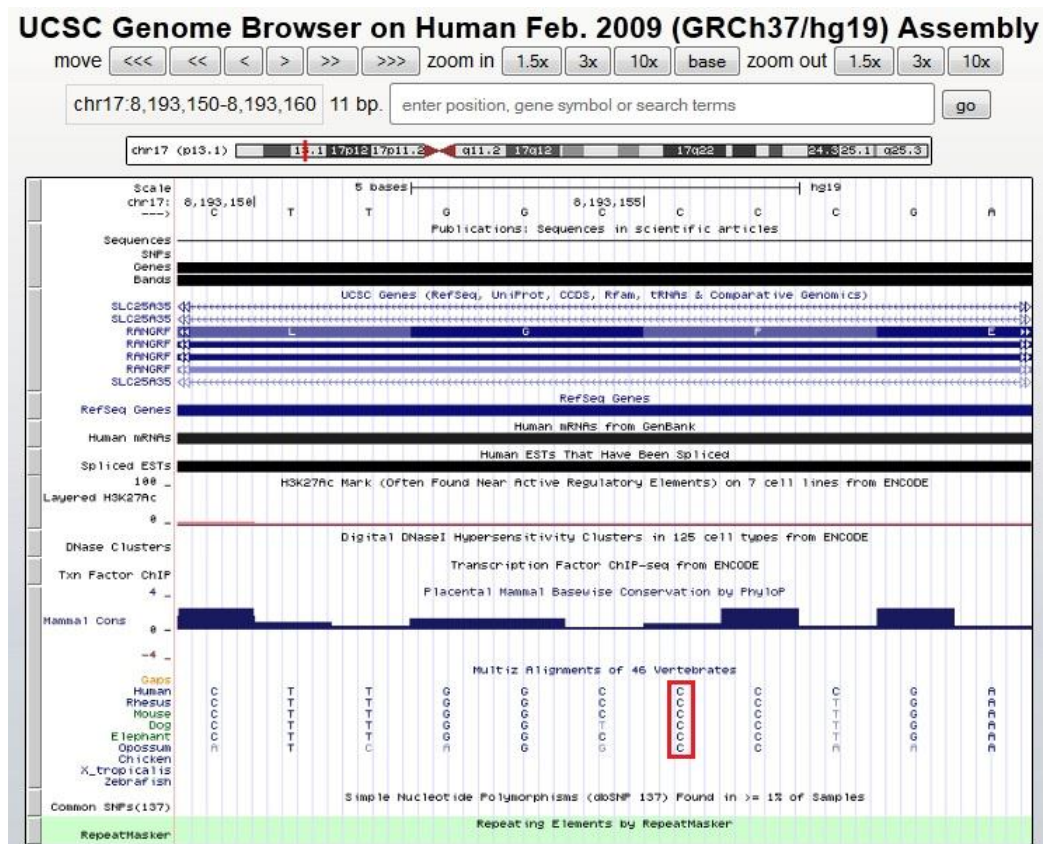


Fig. 7 Schermata di Genome Browser,⁴⁹ in cui è riportata la conservazione della sequenza di RANGRF in diversi vertebrati.

Tutte le varianti identificate dall'analisi bioinformatica, considerate potenzialmente correlate o associate con il fenotipo, sono state confermate con il sequenziamento bidirezionale di Sanger, per garantire una specificità analitica dei risultati forniti del 100%.

Lo screening nella famiglia delle due mutazioni identificate ha rilevato un'ereditarietà dell'alterazione in MOG-1, mentre quella in CACNA2D1 risulta *de novo* nel probando (Fig.8).

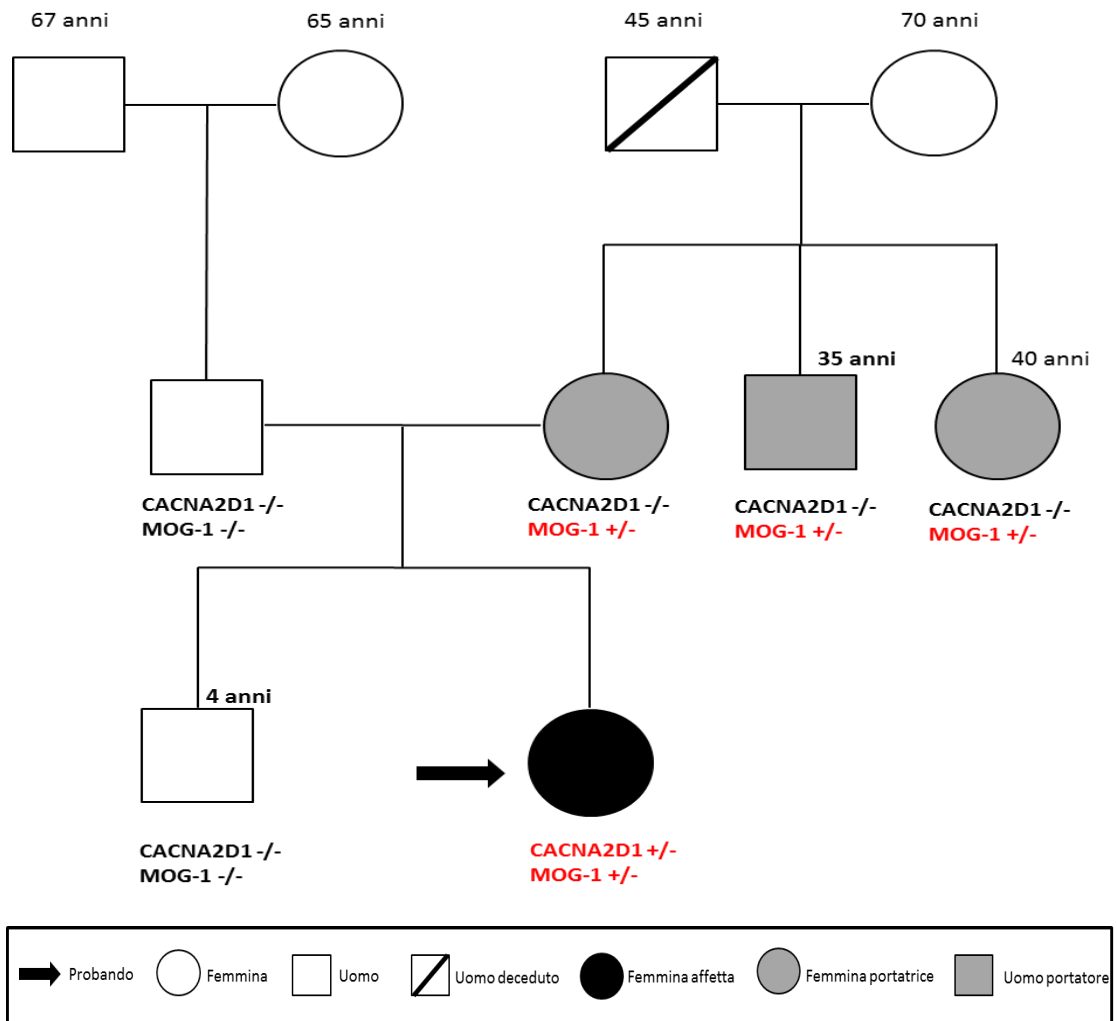


Fig. 8 Albero genealogico della famiglia. La mutazione in MOG-1 è presente nel ramo materno e viene trasmessa con modalità autosomica dominante.

Pur non essendoci familiarità per morti improvvise giovanili nella famiglia, la morte prematura (45 anni, avvenuta nel sonno), del nonno della bambina e alcuni eventi sincopali a

carico della zia e dello zio della stessa (avvenuti a 15 e 35 anni rispettivamente), fanno sospettare una qualche ereditarietà legata alla famiglia materna della probanda.

4.2 Analisi del quadro istologico

L'analisi macroscopica del cuore evidenzia una superficie epicardica caratterizzata da “panno” flogistico emorragico secondario a pericardite cronica post-interventistica (per inserzione di defibrillatore cardiaco impiantabile, e successivi interventi) (Fig.9).

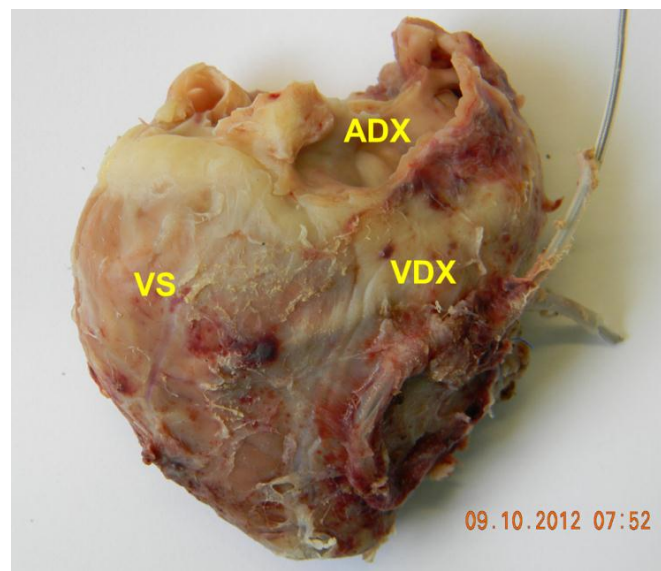


Fig. 9 Vista posteriore della massa ventricolo-atriale con evidenza della placca del defibrillatore. La fitta “ragnatela” bianco-rossastra è fibrina organizzata. ADX: atrio destro; VS: ventricolo sinistro; VDX: ventricolo destro

La sezione anatomica a “4 camere”, grossolanamente sovrapponibile alle immagini usuali ecografiche, dimostra ipertrofia e dilatazione del miocardio con “sfericizzazione” del ventricolo sinistro (Fig.10).

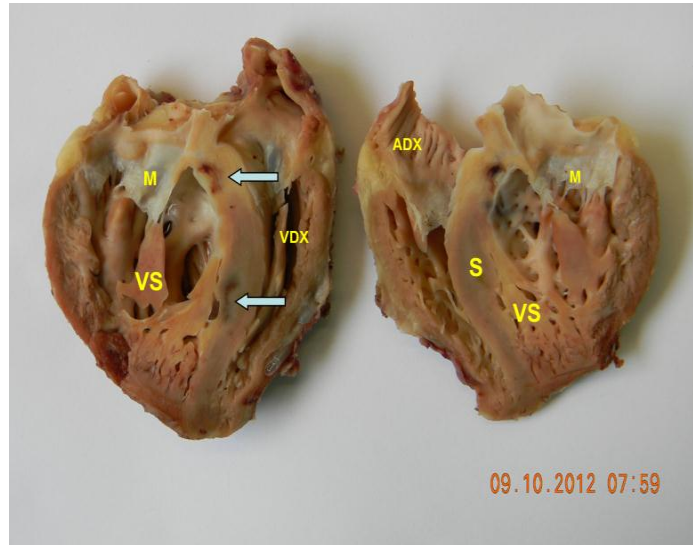


Fig. 10 Sezione anatomica a “4 camere”: la freccia indica le cicatrici settali da pregresse procedure di termo-ablazione. ADX: atrio destro; VS: ventricolo sinistro; VDX: ventricolo destro; M:valvola mitralica; S: setto.

L’analisi istologica con colorazione base Ematossilina Eosina evidenzia la differente morfologia tra cardiomiociti trasformati e normali (Fig. 11-12).

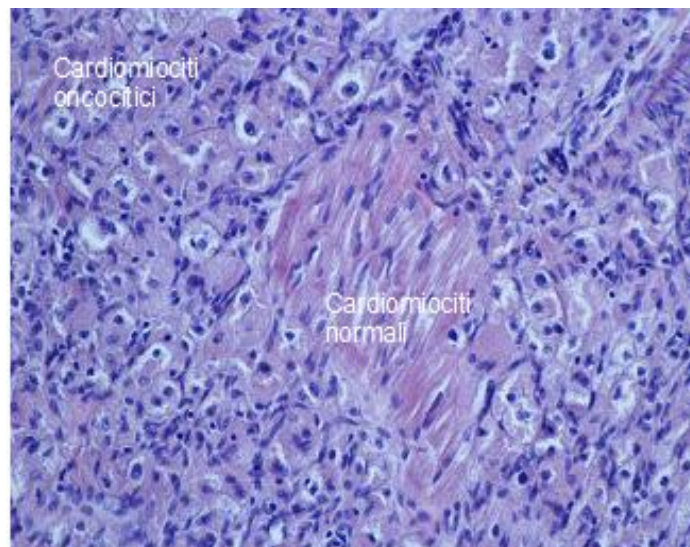


Fig. 11 Colorazione con Ematossilina-Eosina, ingrandimento 100X: nella regione centrale sono presenti le fibrocellule normali con la forma allungata che si perde nei cardiomiociti trasformati.

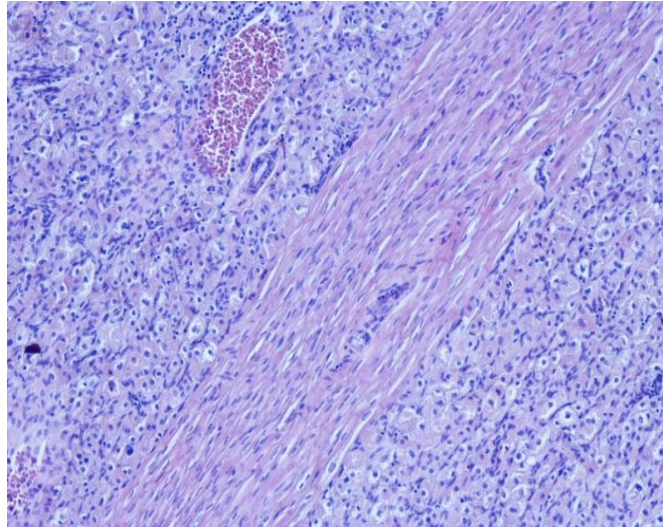


Fig. 12 Architettura istologica del miocardio sovvertita per la presenza di diffusa “Oncocitosi” miocardica. Un fascio “normale” attraversa due aree adiacenti di metaplasia oncocitica.

Anche i nuclei delle cellule metaplastiche aumentano di dimensioni e mostrano nucleoli prominenti e nucleoplasma chiaro (Fig.13).

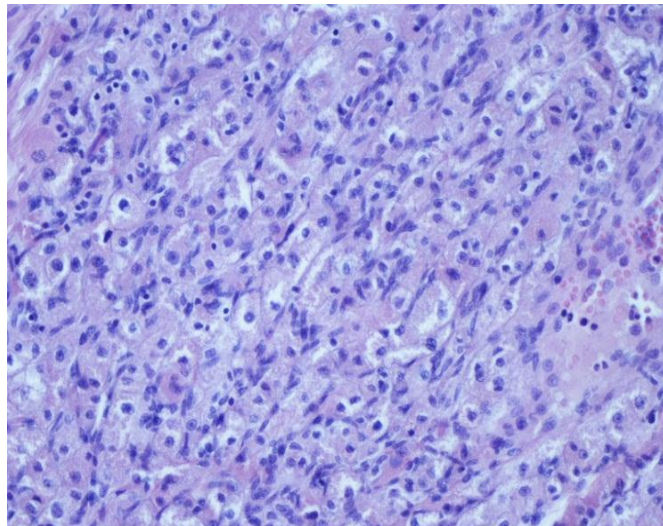


Fig. 13 Colorazione con Ematossilina-Eosina, ingrandimento 200X:close-up della precedente figura che mostra la diffusa metaplasia oncocitaria del miocardio.

La reazione immunohistochimica per la catena pesante beta della miosina, dimostra la progressiva diminuzione di questo filamento man mano che la metaplasia oncocitica progredisce (Fig.14).

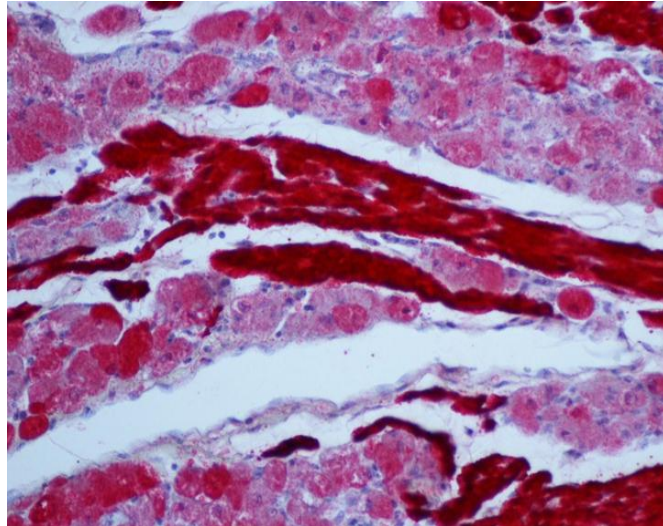


Fig. 14 In rosso colorazione per b-miosina: progressiva diminuzione del filamento man mano che la metaplasia oncocitica progredisce.

Le cellule istiocitoidi risultano positive per la miosina, ma meno rispetto ai cardiomiociti normali (Fig.15).

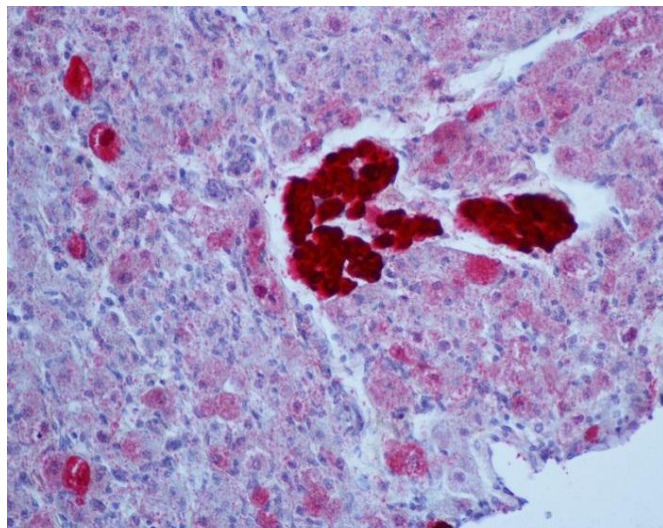


Fig. 15 In rosso colorazione per b-miosina: solo alcuni cardiomiociti si colorano correttamente, la colorazione pallida-assente indica la trasformazione oncocitica dei cardiomiociti.

La colorazione speciale Tricromica di Masson mette in evidenza le fibre di collagene (colorazione verde) e quindi la presenza di fibrosi, come è usuale nella maggioranza delle cardiomiopatie (Fig.16).

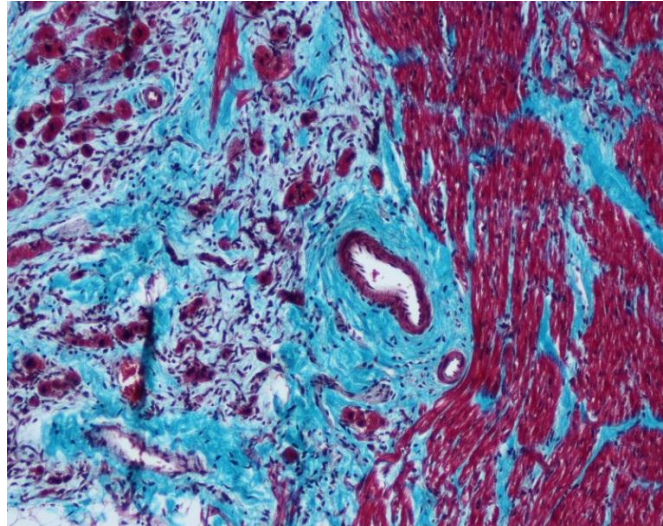


Fig. 16 Colorazione speciale Tricromica di Masson: in verde le fibre di collagene.

Anche la regione del nodo Atrio Ventricolare presenta una marcata metaplasia oncocitica (Fig.17).

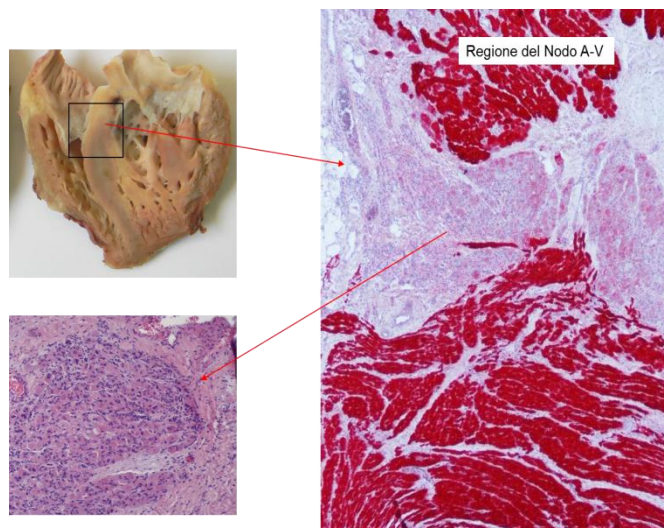


Fig. 17 Colorazione con ematossilina eosina e immunohistochemical per b-miosina della regione del nodo atrio-ventricolare.

La reazione immunohistochimica per la proteina S-100 (marker espresso anche dalle fibre neurali-nervose) dimostra che le cellule ossifile oncocitiche sono negative a questo marker (Fig.18).

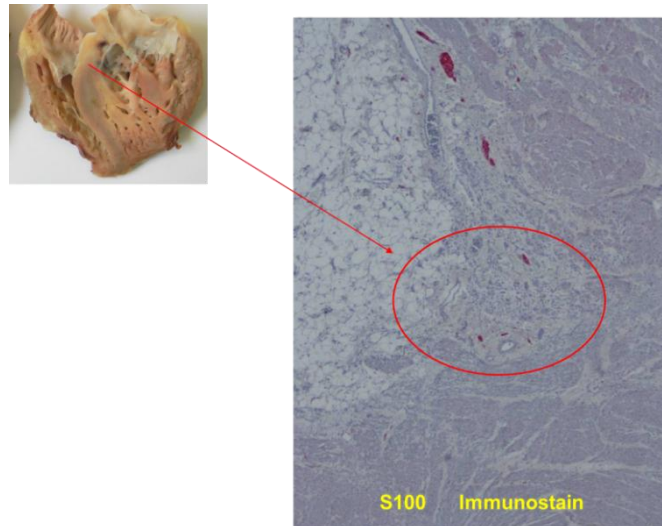


Fig. 18 Immunohistochimica per la proteina S-100 della regione del nodo atrio-ventricolare.

In corrispondenza delle cellule oncocitiche si evidenziano rari foci flogistici che accompagnano sempre le aree di degenerazione dei cardiomiociti in tutte le cardiomiopatie (Fig.19).

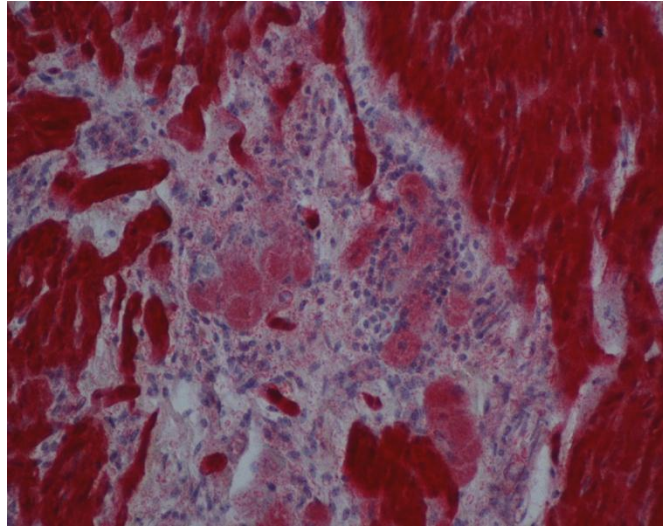


Fig. 19 Immunoistochimica per la b-miosina evidenzia infiltrati flogistici e la diradazione dei cardiomiociti testimonia pregressa necrobiosi e perdita dei medesimi.

L'analisi delle sezioni semifine pre-microscopia elettronica evidenzia la fine granula citoplasmatica (Fig.20) corrispondente a mitocondri citoplasmatici (dato riferito dall'Ospedale di origine Niguarda Ca'Granda, Milano).

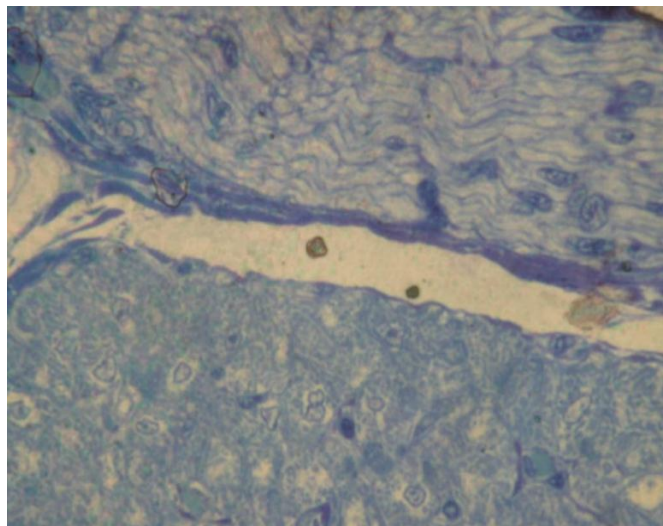


Fig. 20 Sezione semifine pre-microscopia elettronica: si evidenzia l'area di passaggio tra fibre "normali" (top) e patologiche (down).

Grazie all'analisi immunoistopatologica, si è giunti alla diagnosi di cardiomiopatia oncocitica, le cui caratteristiche anatomico-morfologiche sono uniche e ben differenziabili da altre forme di cardiomiopatie.

5. DISCUSSIONE

Il completamento del Progetto Genoma Umano (HGP), nel corso del XXI secolo, ha completamente cambiato l'approccio della ricerca genetica. Infatti, la conoscenza della sequenza del genoma ha assunto sempre più importanza nella comprensione delle basi biologiche e della medicina umana, divenendo una fonte essenziale di informazioni genetiche. Attualmente, dieci anni dopo il Progetto Genoma Umano, una nuova tecnologia, il sequenziamento di nuova generazione (NGS), ha rivoluzionato l'approccio genomico e trascrittomico alla biologia, portando alla riduzione dei costi e all'aumento della produttività.⁵² Attualmente, il sequenziamento dell'intero genoma rappresenta un modo concreto ed efficiente per ottenere informazioni genomiche globali.⁵³

Recentemente, il sequenziamento di nuova generazione si è dimostrato efficace nell'identificare nuove mutazioni patogenetiche in malattie mendeliane rare o comuni, anche in campioni con un numero di individui affetti molto piccolo.⁵⁴ Inoltre, ci si aspetta che la NGS sarà sempre più importante nello studio di malattie complesse, quali le malattie cardiovascolari, in cui sono coinvolti uno o più varianti in un singolo gene o più varianti in diversi geni. Attualmente, lo studio con NGS della genetica delle malattie cardiovascolari (CVD) rappresenta un campo che non è stato ancora ampiamente esplorato,⁵⁵ anche se i progressi nella biologia molecolare hanno già permesso di associare a specifici geni molti disturbi cardiaci precedentemente definiti come idiopatici. Sulla base di casi sporadici, più che di manifestazioni cliniche comuni, ad oggi, sono state ipotizzate diverse teorie sull'eziopatogenesi della cardiomiopatia oncocitica (HC): mutazione nel citocromo b,³⁰

mutazione in SOX6,³¹ anomalia nella regione p22 del cromosoma X,²⁷ mutazione A8344G nel DNA mitocondriale,³² tuttavia, non sono ancora stati trovati elementi sufficienti che consentano una chiara comprensione della patologia.

La teoria che la cardiomiopatia oncocitica sia legata ad un difetto sul cromosoma X (Xp22)²⁶ spiegherebbe la prevalenza di HC nei neonati femmine, ma sembra sia associata ad un caso isolato affetto anche da un'altra patologia legata all'X, la microftalmia con difetti lineari della pelle (MLS). Inoltre, le analisi di sequenziamento condotte in questo studio, non hanno rilevato variazioni a carico di questo cromosoma.

Anche la possibilità che la HC possa essere dovuta ad un'alterazione del metabolismo mitocondriale potrebbe spiegare la predominanza femminile della HC, dato che nell'uomo, i geni mitocondriali sono ereditati per linea materna. Un'ampia varietà di disturbi mitocondriali coinvolge il cuore, sia come difetti primari, sia come disturbi secondari ad un coinvolgimento multiorgano.⁵⁶ I fenotipi cardiaci associati ad anomalie metaboliche mitocondriali includono cardiomiopatie ipertrofiche e dilatate, così come la fibroelastosi endocardica.⁵⁷⁻⁵⁸

Contrariamente alle cardiomiopatie mitocondriali, in cui tutti i miociti sono alterati con un diverso grado, nella HC sono alterate solo le regioni focali del cuore, e le cellule alterate sono interessate totalmente. Inoltre, le variazioni ultrastrutturali della HC di solito consistono in un aumento del numero di mitocondri, con o senza alterazioni strutturali (come creste anomale), mentre nelle cardiomiopatie mitocondriali, i mitocondri possiedono sempre una forma anormale: mostrano variazioni di dimensioni e forma, contengono occasionalmente particelle

di glicogeno e le creste appaiono aumentate in numero e disposte in modo circolare (nella sezione trasversale).⁵⁶

Ogni anno le aritmie cardiache sono responsabili di circa 1 milione di casi di sincope e morte cardiaca improvvisa (SCD) tra gli europei e gli americani.⁵⁹ La maggior parte di questi casi riconosce come causa dell'evento fatale un disordine elettrico cardiaco. Le malattie elettriche primarie che possono condurre a morte improvvisa, sebbene a volte sporadiche, hanno un carattere di ereditarietà e l'identificazione del meccanismo genico rappresenta il primo passo per un programma di prevenzione primaria. Nell'ultimo decennio numerose mutazioni dei canali ionici cardiaci sono state associate a differenti tipi di sindromi aritmogene ereditarie.⁶⁰

In particolare: la Sindrome del QT lungo, la Sindrome del QT corto; la Sindrome di Brugada; la Tachicardia Ventricolare Catecolaminergica ed alcune forme di epilessia in cui è descritta un'incidenza di morte cardiaca improvvisa ed inaspettata 24 volte superiore rispetto alla popolazione generale (SUDEP).⁶¹

Nello studio di questo caso clinico, grazie al sequenziamento di nuova generazione, sono state identificate per la prima volta, due mutazioni a carico, rispettivamente, di una subunità del canale del calcio di tipo L (CACNA2D1), e di un cofattore del canale del sodio $Na_{(v)}1.5$ (MOG-1). Entrambi i tipi di canale sono molto espressi a livello dei cardiomiociti e sono responsabili della normale contrattilità del miocardio e della velocità di trasferimento del potenziale d'azione.

Il canale del calcio di tipo L è un tipo di canale del Ca^{++} voltaggio-dipendente. "L" sta per "long lasting", ovvero "duraturo", in riferimento alla lunghezza della attivazione.⁶² I canali del calcio di tipo L sono responsabili della normale contrattilità del miocardio e della muscolatura liscia vascolare. Questo canale è costituito da 5 subunità (Fig.21): subunità alfa-1, alfa-2, beta, gamma e delta. Come per le altre proteine di questa classe, la subunità $\alpha 1$ (gene CACNA1C), è quella che regola le proprietà biofisiche e farmacologiche fondamentali del canale,⁶³ mentre le altre subunità accessorie (geni CACNB2b e CACNA2D1), regolano sia la funzionalità che il traffico intracellulare del canale.⁶⁴

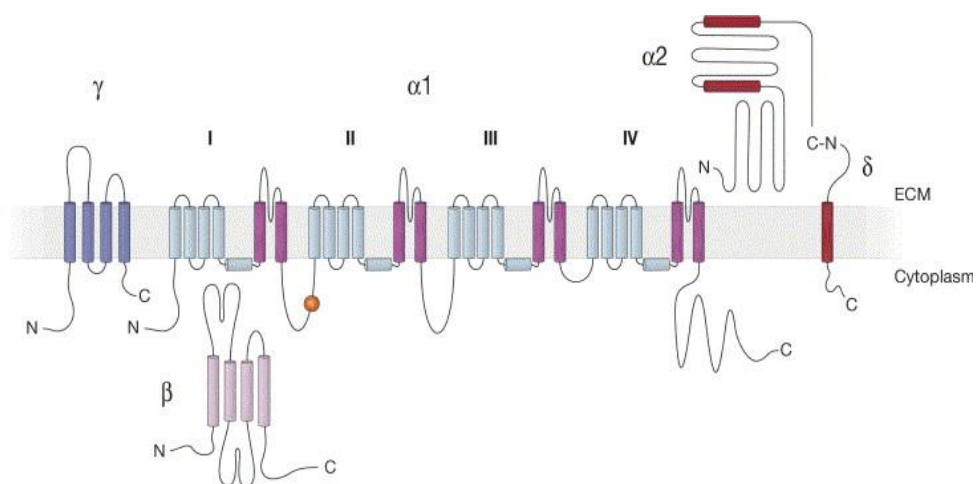


Fig. 21 Canale del calcio (L-type), comprende: subunità $\alpha 1$, che forma il poro e dalle subunità accessorie $\alpha 2\delta$, β , e γ .

Mutazioni in CACNA2D1 sono state recentemente associate alla Sindrome di Brugada (BrS) e alla Sindrome di ripolarizzazione precoce.⁴⁷ Inoltre, è stato proposto che la BrS e la sindrome di ripolarizzazione precoce, entrambe associate ad anomalie dell'onda J, rappresentino manifestazioni diverse della "J-wave syndrome".⁴⁸

Riassumendo, si ipotizza che mutazioni a carico del gene CACNA2D1, sia di tipo “guadagno” che “perdita” di funzione (gain- o loss-of-function), possano provocare differenti fenotipi aritmogeni.

Nel cuore, la corrente di sodio (I_{Na}) è responsabile della depolarizzazione rapida delle cellule cardiache, per consentire loro la contrazione. Essa regola anche la durata del potenziale d'azione cardiaco (AP) e la propagazione dell'impulso in tutto il miocardio. La corrente di sodio cardiaca (I_{Na}) è generata dal canale sodico voltaggio-dipendente, $Na_{(v)}1.5$, una proteina di 2016 residui amminoacidici che forma il poro del canale. Negli ultimi anni, centinaia di mutazioni nel gene SCN5A, il gene umano che codifica per $Na_{(v)}1.5$, sono state associate a molti disturbi cardiaci elettrici, tra cui la Sindrome del QT lungo congenita e acquisita, la Sindrome di Brugada, il rallentamento della conduzione, la Sindrome del nodo del seno, la fibrillazione atriale, e la cardiomiopatia dilatativa.⁶⁵ Analogamente a molte proteine di membrana, $Na_{(v)}1.5$, è regolato da diverse proteine che sono in grado di interagire con esso, ad esempio: anchirina G, fattore 1B omologo del fattore di crescita dei fibroblasti (FHF1B), calmodulina, MOG-1, distrofina e sintrofina (Tab.4). Mutazioni a carico di geni che codificano per proteine “accessorie” di $Na_{(v)}1.5$ sono state a loro volta associate ad aritmie cardiache.⁵⁰

Protein	Type of protein	Main effects on Nav1.5	Motif on Nav1.5	Swissprot reference
Ankyrin-G	Anchoring-adaptor	Trafficking to the cell membrane	VPIAxxSD motif in loop II-III	Q12955 (ANK3_HUMAN)
Syntrophin proteins	Anchoring-adaptor	Adapt to dystrophin complex and Stabilization	PDZ domain binding motif in C-terminus	Q13424 (SNTA1_HUMAN)
MOG1	Anchoring-adaptor	Increase INa in heterologous expression system and silencing decrease INa	65-186 in loop II-III	Q9HD47 (MOG1_HUMAN)
Nedd4-like enzymes	Enzyme	Ubiquitylation and internalization	PY motif in C-terminus	Q96PU5 (NED4L_HUMAN)
Calmodulin kinase II δc	Enzyme	Phosphorylation (site unknown) and modulation of biophysical activity	Not determined	Q13557 (KCC2D_HUMAN)
Protein tyrosine phosphatase H1	Enzyme	Phosphorylation (site unknown) and modulation of biophysical activity	PDZ domain binding motif in C-terminus	P26045 (PTN3_HUMAN)
14-3-3η (eta)	Alteration of biophysical properties	Modulation of steady-state inactivation	Loop I-II	Q04917 (1433F_HUMAN)
Caveolin-3	Alteration of biophysical	Mutant of caveolin-3 induces persistent current	Not determined	P56539 (CAV3_HUMAN)
FHF1B	Alteration of biophysical properties	Modulation of steady-state inactivation amino acids	1773-1832 in C-terminus	P61328 (FGF12_HUMAN)
GPD1L	Alteration of biophysical properties	Mutant variants decrease INa in heterologous expression system	Interaction so far not described	Q8N335 (GPD1L_HUMAN)
Telethonin	Alteration of biophysical properties	Modulation of voltage dependence of activation	Not determined	O15273 (TELT_HUMAN)
Plakophilin-2	Anchoring, alteration of biophysical properties	Silencing reduces INa, shifts negatively steady-state inactivation, and slows recovery from inactivation	Not determined	Q99959 (PKP2_HUMAN)

Tab. 4 Proteine e famiglie di proteine in grado di interagire e regolare $Na_{(V)}1.5$. (Adattata da Abriel et al.)⁵⁰

MOG-1 (codificato dal gene RANGFR, alias MOG-1), è una proteina di 187 amminoacidi espressa a livello cardiaco sia negli atri sia nei ventricoli dove è stato dimostrato che viene co-espresso con il canale sodico $Na_{(V)}1.5$.⁶⁶ Wu et al.⁵¹ hanno identificato che il dominio di interazione tra MOG-1 e $Na_{(V)}1.5$ risiede nel secondo loop intracellulare del canale, e a livello degli amminoacidi 65-186 della proteina (Fig.22).

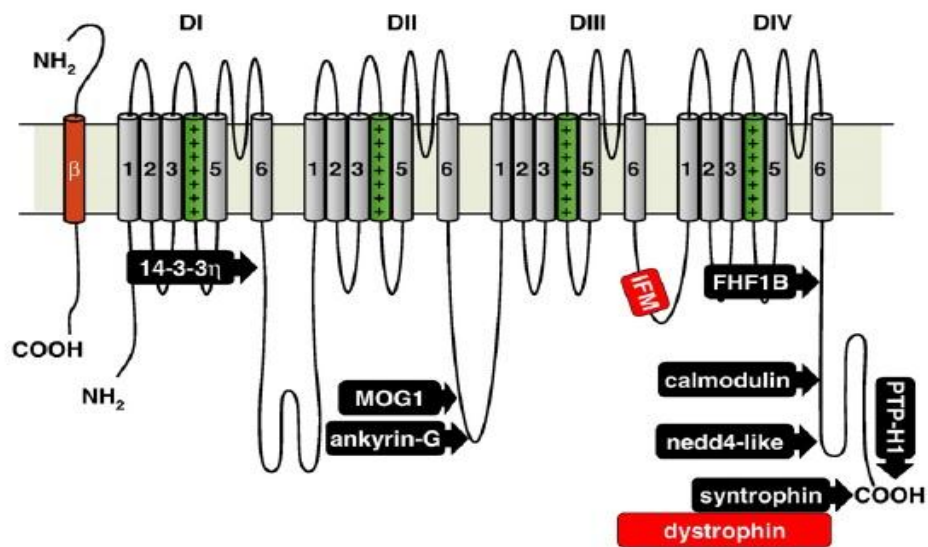


Fig. 22 Rappresentazione schematica delle subunità α e β del canale $\text{Na}_{(v)}1.5$ e delle proteine interagenti.

Inoltre, è stato dimostrato che una over-espressione di MOG-1 aumenta notevolmente la corrente cellulare di sodio, sia in cellule HEK-293 che in cardiomiociti; anche se, la conduttanza ed i singoli parametri cinetici non risultano alterati.⁵¹ Considerando poi, che l'overespressione di MOG-1 aumenta l'espressione sulla superficie cellulare di $\text{Na}_{(v)}1.5$, con molta probabilità MOG-1 è responsabile della regolazione del traffico intracellulare del canale sodico.⁵¹

Recentemente, è stato condotto uno screening genetico su 220 pazienti danesi con aritmia cardiaca alla ricerca di possibili mutazioni che potrebbero influenzare l'espressione del canale $\text{Na}_{(v)}1.5$. Olesen et al.⁶⁷ hanno, quindi, identificato un polimorfismo non sinonimo (c.181 G>T, p.E61X), presente con una frequenza più alta rispetto ai soggetti di controllo. Tramite studi in vitro (cellule CHO-K1), hanno dimostrato anche l'associazione della mutazione ad

una perdita di funzionalità del canale e ad un abbassamento di corrente sodica e ciò comporterebbe un aumentato rischio di aritmie.

Le mutazioni identificate in questo studio, tramite sequenziamento di nuova generazione, pur non essendo mai state descritte prima in letteratura, sembrano essere potenzialmente patogeniche: l'inserzione di 2 coppie di basi entro le prime 10 basi dalla fine dell'esone 25 di CACNA2D1 potrebbe compromettere il sito di splicing e portare alla formazione di una proteina alterata; allo stesso modo, il cambio amminoacidico in MOG-1 può portare ad una differente conformazione tridimensionale del peptide, con conseguente perdita di funzionalità.

L'analisi genetica condotta sui familiari della paziente evidenzia che la mutazione in MOG-1 è già presente nella famiglia materna, mentre la variazione in CACNA2D1 risulta essere *de novo* nella probanda. Gli eventi sincopali della famiglia materna, potrebbero essere riconducibili ad una qualche forma di epilessia, lieve e a manifestazione saltuaria, ma attribuibile ad alterazioni nei canali ionici. E' sempre più evidente l'associazione tra canalopatie cardiache e SCD nei pazienti con epilessia idiopatica o primaria, e sono state riscontrate in pazienti epilettici mutazioni a carico di numerosi geni coinvolti nelle canalopatie cardiache come LQTS, CPVT o BrS.⁶⁸⁻⁶⁹ Anche l'epilessia idiopatica è una canalopatia, determinata da mutazioni in geni che codificano per canali ionici neuronali. In alcuni casi si è potuta dimostrare l'espressione dei medesimi geni sia a livello cardiaco che a livello cerebrale e in questo caso una singola mutazione può essere responsabile di entrambi i quadri clinici (epilessia e aritmie ventricolari maligne).⁷⁰⁻⁷¹

L'identificazione di mutazioni a trasmissione autosomica dominante può risultare complicata dall'effetto di alcuni fenomeni, quali la ridotta penetranza, l'espressività variabile, la comparsa di mutazioni *de novo* e l'esordio tardivo della malattia. Un carattere a bassa penetranza è un carattere che non si manifesta nella totalità degli individui portatori; la penetranza indica la frequenza che un genotipo esprima il fenotipo. Per espressività variabile, invece, si intende un fenotipo che si manifesta con caratteristiche cliniche diverse e può essere definita come un'indicazione della gravità del fenotipo a parità di genotipo.⁷² Le cause della ridotta penetranza e dell'espressività variabile sono comuni e riconducibili all'influenza che altri geni, detti geni modificatori, o alcuni fattori ambientali possono esercitare sullo sviluppo di un fenotipo. I geni modificatori, quando espressi, sono in grado di regolare l'espressione di un altro gene: influenzano la trascrizione alterando, di conseguenza, l'espressione genica.⁷³

Dall'interpretazione dell'albero genealogico della famiglia analizzata in questo studio, si può ipotizzare che la cardiomiopatia oncocitica sia una malattia autosomica dominante complicata dalla ridotta penetranza, dall'espressività variabile e dall'insorgenza di una mutazione *de novo* in un gene che agisce da gene modificatore. La presenza della sola mutazione in MOG-1 negli zii materni della probanda può essere riconducibile ad un fenotipo di tipo solo neurologico, mentre l'azione sinergica delle due variazioni geniche comporterebbe il manifestarsi del fenotipo più aggressivo e infausto.

Questo studio ha evidenziato come alla base genetico-molecolare di HC vi siano due mutazioni in geni già candidati per altre cardiomiopatie/canalopatie, ma l'enigma della predominanza femminile rimane ancora irrisolto.

Escludendo un tipo di trasmissione sesso-dipendente, l'ipotesi che siano altri fattori, quali ad esempio i livelli ormonali, ad influenzare la prevalenza femminile della patologia, merita una riflessione.

Il cuore per molto tempo è stato considerato solo come bersaglio dei classici neurotrasmettitori, come catecolamine e serotonina⁷⁴, ma la scoperta del peptide natriuretico atriale (ANP)⁷⁵ e della sua sintesi a livello cardiaco, rende evidente che esso è anche un organo endocrino. È stato dimostrato che anche l'ormone di rilascio ipotalamico delle gonadotropine (LHRH) e i suoi recettori sono sintetizzati nel cuore.⁷⁶ Inoltre, da studi in vitro emerge che ormoni natriuretici cardiaci e LHRH interagiscono tra di loro.⁷⁷⁻⁷⁸

Nell'età perinatale i livelli di ormoni sessuali differiscono tra i due sessi: in particolare, l'FSH risulta molto concentrato alla nascita, per poi diminuire entro i primi 6 mesi nei maschi e entro i primi 2 anni nelle femmine.⁷⁹

Generalmente, le donne sviluppano problemi cardiaci più tardi rispetto agli uomini, ma per quanto riguarda le aritmie, come la fibrillazione atriale o la Sindrome del QT lungo sembra che sia proprio il sesso femminile ad avere un più alto rischio e una maggiore incidenza di sincope e morte cardiaca improvvisa. I meccanismi alla base di queste differenze tra i sessi per quanto riguarda le aritmie non sono del tutto chiari; tuttavia, si pensa che gli ormoni sessuali siano coinvolti.⁸⁰ Una risposta simile all'effetto della torsione di punta farmaco-indotta è stata osservata in donne in pre-e post-menopausa, suggerendo che gli estrogeni non svolgano un ruolo protettivo.⁸¹ Inoltre, in donne che assumono contraccettivi orali si è registrata una

maggior incidenza di aritmie ventricolari, ciò suggerisce che gli estrogeni o il progesterone potrebbero essere pro-aritmogeni.⁸² È stato ipotizzato che sia il rapporto effettivo tra estrogeni e progesterone, piuttosto che i livelli assoluti dei due ormoni, a determinare la propensione per le donne di sviluppare disturbi del ritmo cardiaco.⁸³⁻⁸⁴ Inoltre, sono già state descritte altre cardiomiopatie, come quella di Takotsubo, in cui vi è una forte influenza ormonale sulla manifestazione fenotipica della malattia.⁸⁵

6.CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il presente studio, attraverso l'analisi con sequenziamento di nuova generazione di un caso clinico complesso, ha permesso l'identificazione di due nuove mutazioni in due differenti geni (CACNA2D1 e RANGRF) già candidati per altre cardiomiopatie/canalopatie.

Inoltre, a prescindere dall'identificazione di nuovi geni di suscettibilità per la cardiomiopatia oncocitica, i risultati ottenuti (clinici, immunoistopatologici e genetici), hanno consentito di migliorare considerevolmente le informazioni su questa patologia fatale e di ipotizzare nuovi possibili collegamenti tra HC ed epilessia e tra HC e ormoni.

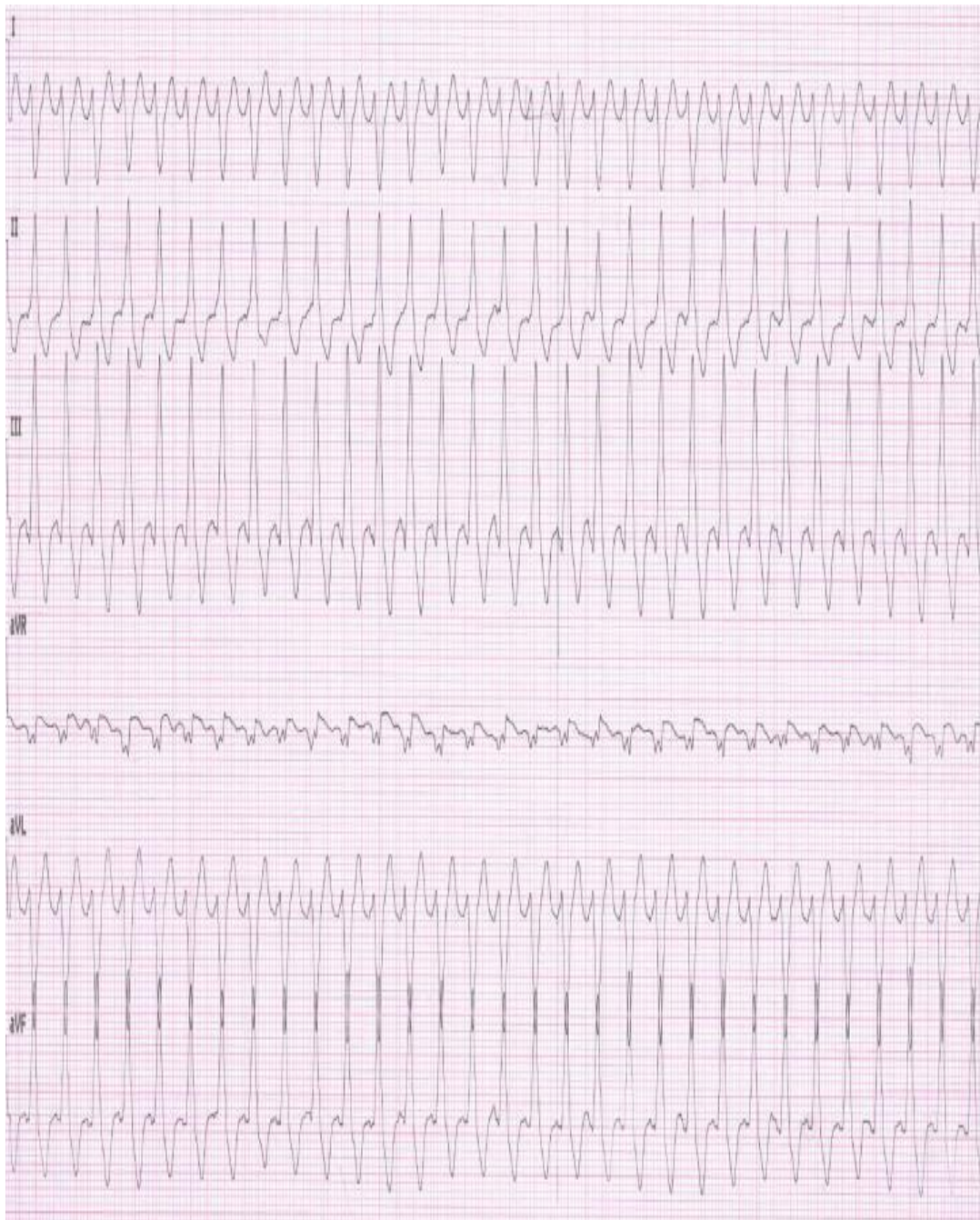
Infine, questo lavoro conferma che l'applicazione di strumenti NGS nelle cardiomiopatie ereditarie sarà sempre più importante per definire la componente genetica di disturbi cardiaci e per individuare con precisione nuove mutazioni in modo rapido ed economico.

Attualmente, abbiamo raccolto e in parte analizzato il sangue dei genitori, del fratello e dei parenti disponibili della probanda, al fine di comprendere più approfonditamente la patogenicità e l'ereditarietà delle mutazioni identificate. Sono anche in corso le indagini di microscopia elettronica per l'analisi ultrastrutturale del tessuto miocardico trapiantato e i saggi di immunoistochimica per i recettori ormonali di estrogeni e progesterone per la valutazione dell'influenza ormonale sul fenotipo.

A breve è prevista la genotipizzazione in una popolazione di soggetti di controllo delle due mutazioni identificate, per determinare la frequenza nella popolazione generale, nonché in altri casi con diagnosi di HC, per confermare la patogenicità delle alterazioni rilevate; inoltre,

saranno disegnati e messi a punto studi *in vitro* e *in vivo* per la valutazione funzionale dei geni trovati alterati.

APPENDICE



Elettrocardiogramma a 12 derivazioni della paziente che mostra stretta e complessa tachicardia ventricolare.

Patient ID GE-06/11
 Date of birth 29/10/2012
 Sample / Project S16900 / 53762
 Date of report

List of probably non-disease causing exonic genetic variants (excluding synonymous)

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ_DBSNP	1000G_ALL	5000G_MAF_ALL	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	ADRB1	nonsynonymous SNV	ADRB1:NM_000684:exon1:c.G1165C:p.G389R	rs1801253	0.703	0.653	30.033	chr10:115805056-115805056	G	C	HET	21	110	28.57
exonic	ADRB2	nonsynonymous SNV	ADRB2:NM_000024:exon1:c.G79C:p.E27Q	rs1042714	0.656	0.749	33.9997	chr5:148206473-148206473	G	C	HOM	176	255	100
exonic	AKAP9	nonsynonymous SNV	AKAP9:NM_147185:exon31:c.A7427G:p.K2476R AKAP9:NM_005751:exon31:c.A7451G:p.K2484R	rs35759833	0.057	0.052	9.4495	chr7:91708898-91708898	A	G	HET	1287	255	45.77
exonic	AKAP9	nonsynonymous SNV	AKAP9:NM_147185:exon8:c.G1389T:p.M463I/A AKAP9:NM_005751:exon8:c.G1389T:p.M463I	rs6964587	0.352	0.359	44.0471	chr7:91630620-91630620	G	T	HET	990	255	43.84
exonic	AKAP9	nonframeshift insertion	AKAP9:NM_147185:exon14:c.A005_4006insAAA:p.K1335delinsKK,AKAP9:NM_005751:exon14:c.A005_4006insAAA:p.K1335delinsKK	*	*	*	*	chr7:91652180-91652180	-	AAA	HET	964	242	47.3
exonic	AKAP9	nonsynonymous SNV	AKAP9:NM_147185:exon33:c.A8351G:p.N2784S AKAP9:NM_005751:exon33:c.A8351G:p.N2784S	rs6960887	0.278	0.284	35.6086	chr7:91712698-91712698	A	G	HET	1084	255	44
exonic	AKAP9	nonsynonymous SNV	AKAP9:NM_147185:exon36:c.C8911T:p.P2971S AKAP9:NM_005751:exon36:c.C8911T:p.P2971S	rs1063242	0.996	1	0.2614	chr7:91714911-91714911	C	T	HOM	832	255	100
exonic	AKAP9	nonframeshift insertion	AKAP9:NM_147185:exon14:c.A006_4007insAAC:p.L11336delinsQL,AKAP9:NM_005751:exon14:c.A006_4007insAAC:p.L11336delinsQL	rs34733695	0.5		*	chr7:91652181-91652181	-	AAC	HET	970	242	48.25
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon26:c.A6937G:p.I2313V	rs584542	0.967	0.986	1.8376	chr2:21232803-21232803	T	C	HOM	986	255	100
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon29:c.G1254A:p.E4181K	rs1042031	0.123	0.141	16.6077	chr2:21225753-21225753	C	T	HET	619	255	49.6
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon26:c.A4265G:p.Y1422C	rs568413	0.994	1	0.0308	chr2:21235475-21235475	T	C	HOM	1053	255	100
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon26:c.C8216T:p.P2739L	rs676210	0.349	0.311	19.6525	chr2:21231524-21231524	G	A	HET	883	255	47.57
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon29:c.G13013A:p.S4338N	rs1042034	0.696	0.682	19.7028	chr2:21225281-21225281	C	T	HET	1102	255	43.1
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon14:c.C1853T:p.A618V	rs679899	0.478	0.475	36.5524	chr2:21250914-21250914	G	A	HET	1124	255	49.56
exonic	APOB	nonsynonymous SNV	APOB:NM_000384:exon15:c.G2188A:p.V730I	rs12691202	0.034	0.02	2.545	chr2:21249716-21249716	C	T	HET	1145	255	48.56
exonic	BAG3	nonsynonymous SNV	BAG3:NM_004281:exon2:c.T451C:p.C151R	rs2234962	0.076	0.082	15.1123	chr10:121429633-121429633	T	C	HET	124	255	41.94
exonic	CACNA1B	nonsynonymous SNV	CACNA1B:NM_000718:exon3:c.C501G:p.N167K	rs4422842	0.5	*	*	chr9:140777306-140777306	C	G	HET	383	251	31.85
exonic	CACNA1B	nonsynonymous SNV	CACNA1B:NM_000718:exon19:c.G2584T:p.A862S	rs7873074	0.333	0.358	*	chr9:140917779-140917779	G	T	HOM	3	90.5	100

Patient ID GE-06/11
 Date of birth 29/10/2012
 Sample / Project S16900 / 53762
 Date of report

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ_DBSNP	1000G ALL	5000G-MAF (ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	CACNA1B	nonframeshift deletion	CACNA1B:NM_000718:exon19:c.2986_3000del:p.996_1000del	*	*	*	*	chr9:140918181-140918195	ACCA CGGA GAAG GAG	-	HOM	16	242	100
exonic	CACNA1B	nonsynonymous SNV	CACNA1B:NM_000718:exon19:c.A2986G:p.T996A	rs11337342	0.25	*	*	chr9:140918181-140918181	A	G	HOM	4	103	100
exonic	CACNA1C	nonsynonymous SNV	CACNA1C:NM_199460:exon45:c.A5605G:p.M1869V G:p.M1821V,CACNA1C:NM_001167624:exon43:c.A5461G:p.M1821V	rs10774053	0.796	0.717	18.0388	chr12:2791132-2791132	A	G	HOM	179	255	100
exonic	CACNA1C	nonsynonymous SNV	CACNA1C:NM_199460:exon45:c.C5603T:p.P1868L CACNA1C:NM_001129830:exon43:c.C5459T:p.P1820L CACNA1C:NM_001167624:exon43:c.C5459T:p.P1820L	rs10848683	0.603	0.613	27.5243	chr12:2791130-2791130	C	T	HOM	178	255	100
exonic	CACNA1C	nonsynonymous SNV	CACNA1C:NM_199460:exon45:c.A5678G:p.K1893R CACNA1C:NM_001129830:exon43:c.A5534G:p.K1845R CACNA1C:NM_001167624:exon43:c.A5534G:p.K1845R	rs10774054	*	1	0.0194	chr12:2791205-2791205	A	G	HOM	170	255	100
exonic	CACNB2	nonsynonymous SNV	CACNB2:NM_201577:exon14:c.T1881G:p.D627E CACNB2:NM_001167945:exon14:c.T1767G:p.D589E CACNB2:NM_201593:exon14:c.T1851G:p.D617E CACNB2:NM_000724:exon13:c.T1800G:p.D600E CACNB2:NM_201596:exon14:c.T1965G:p.D655E CACNB2:NM_201597:exon14:c.T1893G:p.D631E CACNB2:NM_201572:exon14:c.T1809G:p.D603E CACNB2:NM_201570:exon13:c.T1821G:p.D607E CACNB2:NM_201590:exon13:c.T1803G:p.D601E	rs58225473	0.5	0.12	15.1592	chr10:18828635-18828635	T	G	HET	491	255	50.51
exonic	CASQ2	nonsynonymous SNV	CASQ2:NM_001232:exon1:c.A196G:p.T66A	rs4074536	0.427	0.42	33.9382	chr11:16310967-16310967	T	C	HET	951	255	49.95
exonic	DMD	nonsynonymous SNV	DMD:NM_004009:exon37:c.G5222A:p.R1741H DMD:NM_004007:exon36:c.G4865A:p.R1622H DMD:NM_004011:exon9:c.G1211A:p.R404H DMD:NM_004010:exon37:c.G4865A:p.R1622H DMD:NM_004006:exon37:c.G5234A:p.R1745H DMD:NM_004012:exon9:c.G1202A:p.R401H DMD:NM_000109:exon37:c.G5210A:p.R1737H	rs1801187	0.41	0.401	33.3112	chrX:32380996-32380996	C	T	HET	793	255	47.79
exonic	DMD	nonsynonymous SNV	DMD:NM_004009:exon59:c.G8798A:p.R2933Q DMD:NM_004007:exon58:c.G8441A:p.R2814Q DMD:NM_004014:exon55:c.G623A:p.R208Q DMD:NM_004011:exon31:c.G4787A:p.R1596Q DMD:NM_004010:exon59:c.G8441A:p.R2814Q DMD:NM_004020:exon16:c.G1430A:p.R477Q	rs1800280	0.885	0.959	4.3178	chrX:31496350-31496350	C	T	HOM	644	255	100

Patient ID: GE-06/11
 Date of birth: 29/10/2012

Sample / Project: S16900 / 53762
 Date of report: 29/10/2012

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ_DBSNP	1000G_ALL	5000G_MAF_ALL	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	DMD	nonsynonymous SNV	:NM_004022:exon16:c.G1430A:p.R477Q;DMD-NM_004023:exon16:c.G1430A:p.R477Q;DMD-NM_004006:exon59:c.G8810A:p.R2937Q;DMD-NM_004013:exon16:c.G1430A:p.R477Q;DMD-NM_004012:exon11:c.G4778A:p.R1593Q;DMD-NM_004021:exon16:c.G1430A:p.R477Q;DMD-NM_000109:exon59:c.G8786A:p.R2929Q;	rs228406	0.689	0.7	34.9777	chrX:32503194-32503194	T	C	HOM	1040	255	100
exonic	DTNA	nonsynonymous SNV	DMD:NM_004009:exon21:c.A2633G:p.R878G;DMD:NM_004007:exon20:c.A2276G:p.D759G;DMD:NM_004010:exon21:c.A2276G:p.D759G;DMD:NM_004006:exon21:c.A2645G:p.D882G;DMD:NM_001019:exon21:c.A2621G:p.D874G;	rs9944927	0.294	0.268	*	chr18:32470291-32470291	G	A	HOM	1265	255	99.76
exonic	ELN	nonsynonymous SNV	ELN:NM_001081753:exon20:c.G1279A:p.G4275;ELN:NM_001081755:exon20:c.G1264A:p.G422;S.ELN:NM_000501:exon20:c.G1264A:p.G4225;E.LN:NM_001081752:exon19:c.G1234A:p.G4125;ELN:NM_001081754:exon20:c.G1279A:p.G4275	rs2071307	0.227	0.243	33.2923	chr7:73470714-73470714	G	A	HET	173	255	52.6
exonic	EYAA4	nonsynonymous SNV	EYAA4:NM_172105:exon11:c.G829A:p.G2775;EYAA4:NM_172103:exon10:c.G760A:p.G2545;EYAA4:NM_004100:exon11:c.G829A:p.G2775;	rs9493627	0.447	0.378	38.2977	chr6:133789728-133789728	G	A	HET	1255	255	47.49
exonic	FBN1	nonsynonymous SNV	FBN1:NM_000138:exon12:c.G1415A:p.C472Y;	rs4775765	*	1	*	chr15:48807637-48807637	C	T	HOM	841	255	100
exonic	FBN2	nonsynonymous SNV	FBN2:NM_001999:exon23:c.G2893A:p.V965I;	rs154001	0.691	0.724	33.7844	chr5:127685135-127685135	C	T	HET	662	255	50.91
exonic	FKTN	nonsynonymous SNV	FKTN:NM_006731:exon5:c.G608A:p.R203Q;FKTN:NM_001079802:exon6:c.G608A:p.R203Q;FKTN:NM_001198963:exon6:c.G608A:p.R203Q;	rs34787999	0.186	0.178	26.457	chr9:108366734-108366734	G	A	HET	734	255	47
exonic	GAA	nonsynonymous SNV	GAA:NM_000157:exon3:c.A596G:p.H199R;GAA:NM_001079804:exon3:c.A596G:p.H199R;GAA:NM_001079803:exon4:c.A596G:p.H199R;	rs1042393	0.622	0.572	32.7464	chr17:78079597-78079597	A	G	HOM	37	255	100
exonic	GAA	nonsynonymous SNV	GAA:NM_000152:exon3:c.G668A:p.R233H;GAA:NM_001079804:exon3:c.G668A:p.R233H;GAA:NM_001079803:exon4:c.G668A:p.R233H;	rs1042395	0.608	0.618	32.7592	chr17:78079669-78079669	G	A	HOM	34	255	100
exonic	GAA	nonsynonymous SNV	GAA:NM_000157:exon17:c.G2338A:p.V780I;GAA:NM_001079804:exon17:c.G2338A:p.V780I;GAA:NM_001079803:exon18:c.G2338A:p.V780I;	rs1126690	0.725	0.712	26.6805	chr17:78091405-78091405	G	A	HOM	32	255	100
exonic	HCN1	nonsynonymous SNV	HCN1:NM_021072:exon1:c.C80A:p.A27E;	*	*	*	*	chr5:45696116-45696116	G	T	HET	11	20	18.18
exonic	JUP	nonsynonymous SNV	JUP:NM_002230:exon14:c.A2089T:p.M697L;JUP:NM_021991:exon14:c.A2089T:p.M697L;	rs1126821	0.494	0.58	30.3014	chr17:39912145-39912145	T	A	HOM	82	255	100

Patient ID: GE-06/11
 Date of birth: 29/10/2012
 Sample / Project: S16900 / 53762
 Date of report: 29/10/2012

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ DBSNP	1000G ALL	5000G-MAF (ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AFL	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	KCNE1	nonsynonymous SNV	KCNE1:NM_000219:exon3:c.A112G:p.S38G;KCN E1:NM_001127668:exon3:c.A112G:p.S38G;KCN E1:NM_001127668:exon3:c.A112G:p.S38G;KCN E1:NM_001127670:exon2:c.A112G:p.S38G,	rs1805127	0.708	0.661	33.8075	chr21:35821821-35821821	T	C	HOM	215	255	100
exonic	KCNE1L	nonsynonymous SNV	KCNE1L:NM_012282:exon1:c.C97T:p.P33S,	rs17003955	0.07	0.109	9.6805	chrX:108868153-108868153	G	A	HET	17	122	35.29
exonic	KCNE4	nonsynonymous SNV	KCNE4:NM_080671:exon2:c.T435G:p.D145E,	rs12621643	0.647	0.619	35.6198	chr2:223917983-223917983	T	G	HET	89	255	52.81
exonic	KCNH2	nonsynonymous SNV	KCNH2:NM_172057:exon7:c.A1670C:p.K557T;K CNH2:NM_000238:exon11:c.A2690C:p.K897T,	rs1805123	0.108	0.111	16.9076	chr7:150645534-150645534	T	G	HET	75	255	44
exonic	KCNJ5	nonsynonymous SNV	KCNJ5:NM_000890:exon2:c.C844G:p.Q282E,	rs7102584		0.992	1.2927	chr11:128782012-128782012	C	G	HOM	323	255	100
exonic	LAMA4	nonsynonymous SNV	LAMA4:NM_001105206:exon8:c.C848A:p.A283 E;LAMA4:NM_001105207:exon8:c.C827A:p.A27 6E;LAMA4:NM_002290:exon8:c.C827A:p.A276E,	rs9400522	0.857	0.962		chr6:112508770-112508770	G	T	HOM	545	255	100
exonic	LAMA4	nonsynonymous SNV	LAMA4:NM_001105206:exon25:c.G3349A:p.G1 1175;LAMA4:NM_001105207:exon25:c.G3328A :p.G11105;LAMA4:NM_002290:exon25:c.G3328 A:p.G11105,	rs2032567	0.818	0.797	24.8654	chr6:112457390-112457390	C	T	HOM	909	255	99.89
exonic	LAMA4	nonsynonymous SNV	LAMA4:NM_001105206:exon25:c.C3356G:p.P1 1198;LAMA4:NM_001105207:exon25:c.C3335G :p.P1112R;LAMA4:NM_002290:exon25:c.C3335 G:p.P1112R,	rs1050349	0.251	0.224	22.2051	chr6:112457383-112457383	G	C	HOM	913	255	99.45
exonic	LAMA4	nonsynonymous SNV	LAMA4:NM_001105206:exon12:c.T1492C:p.Y49 8H;LAMA4:NM_001105207:exon12:c.T1471C:p. Y491H;LAMA4:NM_002290:exon12:c.T1471C.p. Y491H,	rs1050348	0.756	0.712	35.1223	chr6:112493872-112493872	A	G	HET	145	255	46.21
exonic	LRP6	nonsynonymous SNV	LRP6:NM_002336:exon14:c.G3184A:p.V1062I,	rs2302685	0.857	0.87	16.0003	chr12:12301898-12301898	C	T	HOM	748	255	100
exonic	MYBPC3	nonsynonymous SNV	MYBPC3:NM_000256:exon6:c.A706G:p.S216G,	rs3729989	0.076	0.085	10.344	chr11:47370041-47370041	T	C	HET	113	255	50.44
exonic	MYH6	nonsynonymous SNV	MYH6:NM_002471:exon25:c.T3302C:p.V1101A,	rs365990	0.399	0.372	45.5636	chr14:23861811-23861811	A	G	HET	364	255	44.23
exonic	MYH6	nonsynonymous SNV	MYH6:NM_002471:exon26:c.G3388A:p.A1130T,	rs28730771	0.25	0.056	*	chr14:23859610-23859610	C	T	HET	143	255	42.66
exonic	MYOT	nonsynonymous SNV	MYOT:NM_006790:exon2:c.A220C:p.K74Q,	rs41431944	*	0.984	1.4839	chr5:137206560-137206560	A	C	HOM	1188	255	100
exonic	MYPA	nonsynonymous SNV	MYPA:NM_032578:exon11:c.G2410A:p.G804R,	rs67620248	0.017	0.01	2.4527	chr10:69934259-69934259	G	A	HET	1008	255	48.91
exonic	NEXN	nonsynonymous SNV	NEXN:NM_144573:exon8:c.G733A:p.G245R;NEX N:NM_001172309:exon7:c.G541A:p.G181R,	rs1166698	0.195	0.194	15.781	chr1:78392446-78392446	G	A	HET	781	255	46.86
exonic	PDJIM3	nonsynonymous SNV	PDJIM3:NM_014476:exon6:c.C734T:p.T245I;PD JIM3:NM_001114107:exon5:c.C590T:p.T197I,	rs62347360	0.5	0.006	1.4762	chr4:186427735-186427735	G	A	HET	186	255	50.54
exonic	PKP2	nonsynonymous SNV	PKP2:NM_001005242:exon4:c.T1097C:p.L366P, PKP2:NM_004572:exon4:c.T1097C:p.L366P,	rs1046116	0.158	0.142	22.0052	chr12:33021934-33021934	A	G	HET	623	255	46.23

Patient ID: GE-06/11 Date of birth: 29/10/2012
 Sample / Project: S16900 / 53762 Date of report: 29/10/2012

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ_DBSNP	1000G_ALL	5000G_MAF_ALL	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	PLEC	nonsynonymous SNV	PLEC:NM_201379:exon9:c.G821A>p.R274Q, PLEC:NM_201383:exon9:c.G899A>p.R300Q, PLEC:NM_201381:exon9:c.G791A>p.R264Q, PLEC:NM_201384:exon9:c.G887A>p.R296Q, PLEC:NM_201380:exon9:c.G1298A>p.R433Q, PLEC:NM_201378:exon9:c.G845A>p.R282Q, PLEC:NM_201382:exon9:c.G887A>p.R296Q, PLEC:NM_000445:exon10:c.G968A>p.R323Q	*	0.007	1.2486	C	chr8:145009036-145009036	C	T	HET	41	255	48.78
exonic	PLEC	nonsynonymous SNV	PLEC:NM_201379:exon31:c.C594T>p.R1982W, PLEC:NM_201383:exon31:c.C602T>p.R2008W, PLEC:NM_201381:exon31:c.C5914T>p.R1972W, PLEC:NM_201384:exon31:c.C6010T>p.R2004W, PLEC:NM_201380:exon31:c.C6421T>p.R2141W, PLEC:NM_201378:exon31:c.C5968T>p.R1990W, PLEC:NM_201382:exon31:c.C6010T>p.R2004W, PLEC:NM_000445:exon32:c.C6091T>p.R2031W	*	*	0.0182	G	chr8:144998087-144998087	G	A	HET	21	6.19	9.52
exonic	PNN	nonsynonymous SNV	PNN:NM_002687:exon9:c.A1321T>p.T441S	rs2180792	0.963	0.94	A	chr14:39650234-39650234	A	T	HOM	549	255	100
exonic	RBM20	nonsynonymous SNV	RBM20:NM_001134363:exon11:c.C32T>p.A11V	*	*	*	C	chr10:112404244-112404244	C	T	HET	13	30	15.38
exonic	RBM20	nonsynonymous SNV	RBM20:NM_001134363:exon14:c.G3667C>p.E1223Q	rs942077	0.644	0.693	G	chr10:112595719-112595719	G	C	HOM	315	255	100
exonic	RBM20	nonsynonymous SNV	RBM20:NM_001134363:exon9:c.G2303C>p.W7685	rs1417635	0.998	0.009	G	chr10:112572458-112572458	G	C	HOM	127	255	100
exonic	SCN1B	nonsynonymous SNV	SCN1B:NM_199037:exon3:c.T629C>p.L210P	rs55742440	0.7	0.399	T	chr19:35524824-35524824	T	C	HET	197	255	49.24
exonic	SCNSA	nonsynonymous SNV	SCNSA:NM_196056:exon12:c.A1673G>p.H558R, SCNSA:NM_001160160:exon12:c.A1673G>p.H558R, SCNSA:NM_001160160:exon12:c.A1673G>p.H558R, SCNSA:NM_000335:exon12:c.A1673G>p.H558R, SCNSA:NM_001099404:exon12:c.A1673G>p.H558R, SCNSA:NM_001099405:exon12:c.A1673G>p.H558R	rs1805124	0.208	0.217	T	chr3:38645420-38645420	T	C	HOM	112	255	100
exonic	SGCD	nonsynonymous SNV	SGCD:NM_172244:exon4:c.G290A>p.R97Q, SGCD:NM_000937:exon4:c.G290A>p.R97Q, SGCD:NM_001128209:exon3:c.G287A>p.R96Q	rs45559833	0.047	0.019	G	chr5:155935708-155935708	G	A	HET	1055	255	48.91
exonic	TMEM43	nonsynonymous SNV	TMEM43:NM_024334:exon7:c.T536C>p.M179I	rs2340917	0.482	0.405	T	chr3:14175262-14175262	T	C	HET	283	255	43.46
exonic	TMEM43	nonsynonymous SNV	TMEM43:NM_024334:exon6:c.A504T>p.K188N	rs4685076	0.326	0.32	A	chr3:14174427-14174427	A	T	HET	345	255	43.48
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon81:c.C2052T>p.R6858C, TTN:NM_133378:exon201:c.C9487T>p.R13163C, TTN:NM_003319:exon80:c.C19996T>p.R6666C, TTN:NM_133432:exon81:c.C2037T>p.R6791C	rs72677231	0.5	0.2136	G	chr2:179482994-179482994	G	A	HET	1363	255	49.16

Patient ID GE-06/11 **Date of birth** 29/10/2012
Sample / Project S16900 / 53762 **Date of report** 29/10/2012

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ DBSNP	1000G ALL	5000G MAF (ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133379:exon46:c.G11196C>A.L3732F,	rs922985	0.977	0.968	2.7547	chr2:179615931-179615931	C	G	HOM	1111	255	100
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon14:c.C2294T>p.T765I;TTN:NM_133378:exon15:c.C2432T>p.T811I;TTN:NM_003319:exon14:c.C2294T>p.T765I;TTN:NM_133379:exon15:c.C2432T>p.T811I;TTN:NM_133432:exon14:c.C2294T>p.T765I,	rs35813871	0.076	0.122	18.9682	chr2:179650408-179650408	G	A	HET	928	255	46.55
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon41:c.G9643A>p.V3215M;TTN:NM_133378:exon42:c.G9781A>p.V3261M;TTN:NM_003319:exon41:c.G9643A>p.V3215M;TTN:NM_133379:exon42:c.G9781A>p.V3261M;TTN:NM_133432:exon41:c.G9643A>p.V3215M,	rs22913111	0.843	0.846	10.3491	chr2:179629461-179629461	C	T	HOM	498	255	100
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon155:c.A5670AG>p.I1890I;TTN:NM_133378:exon275:c.A75619G>p.D520V;TTN:NM_003319:exon154:c.A56128G>p.I18710V;TTN:NM_133432:exon155:c.A56503G>p.I1835V,	rs3829746	0.487	0.442	31.9993	chr2:179427536-179427536	T	C	HET	971	255	46.45
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon187:c.G77162A>p.R2572I;TTN:NM_133378:exon307:c.G96077A>p.R32026H;TTN:NM_003319:exon186:c.G76586A>p.R25529H;TTN:NM_133432:exon187:c.G76961A>p.R25654H,	rs3829747	0.192	0.156	12.1444	chr2:179397561-179397561	C	T	HET	1024	255	46.48
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon128:c.C2889T>p.P9631L,	rs72650031	0.5	0.003	0.4308	chr2:179549407-179549407	G	A	HET	683	255	46.56
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon155:c.C5324T>p.T17748M;TTN:NM_133378:exon275:c.C72158T>p.T24053M;TTN:NM_003319:exon154:c.C52667T>p.T17556M;TTN:NM_133432:exon155:c.C53042T>p.T17681M,	rs3731746	0.349	0.319	21.7628	chr2:179430997-179430997	G	A	HET	1000	255	47.1
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon179:c.G70994A>p.R23665H;TTN:NM_133378:exon299:c.G89909A>p.R29970H;TTN:NM_003319:exon178:c.G70418A>p.R23473H;TTN:NM_133432:exon179:c.G70793A>p.R23598H,	rs3731749	0.175	0.166	12.2061	chr2:179406191-179406191	C	T	HET	600	255	47.67
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon155:c.C48220T>p.R16074C;TTN:NM_133378:exon275:c.C67135T>p.R22379C;TTN:NM_003319:exon154:c.C47644T>p.R15882C;TTN:NM_133432:exon155:c.C48019T>p.R16007C,	rs744426	0.19	0.173	12.2078	chr2:179436020-179436020	G	A	HET	949	255	51.32
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon44:c.G10213A>p.A3405T,	rs6433728	*	1	0.0831	chr2:179621477-179621477	C	T	HOM	881	255	100
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133379:exon46:c.A11240G>p.D3747G,	rs922984	0.753	0.784	18.1937	chr2:179615887-179615887	T	C	HOM	1034	255	99.81

Patient ID GE-06/11 Date of birth 29/10/2012
 Sample / Project S16900 / 53762 Date of report 29/10/2012

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ DBSNP	1000G ALL	5000G-MAF (ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon159:c.161568C>p.L20523T TTN:NM_133378:exon279:c.T80483C>p.I26828 T:TTN:NM_003319:exon158:c.T60992C>p.I2033 I1:TTN:NM_133432:exon159:c.T61367C>p.I20456T	rs9808377	0.494	0.443	31.8278	chr2:179421694-179421694	A	G	HET	1048	255	45.23
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon95:c.G24581A>p.R8194Q	rs72648998	0.032	0.022	4.3196	chr2:179575511-179575511	C	T	HET	845	255	46.63
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon74:c.G18652C>p.D6218H	rs12693166	0.253	0.218	15.7193	chr2:179587130-179587130	C	G	HET	1186	255	46.63
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon22:c.C3746T>p.S1249L,TTN:NM_003319:exon22:c.C3746T>p.S1249L,TTN:NM_133378:exon22:c.C3884T>p.S1295L,TTN:NM_133379:exon23:c.C3884T>p.S1295L,TTN:NM_133432:exon22:c.C3746T>p.S1249L	rs1552280	0.884	0.915	4.9139	chr2:179644035-179644035	G	A	HOM	1048	255	99.9
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon81:c.A20699C>p.E6900A	rs16866465	0.233	0.214	15.0649	chr2:179583496-179583496	T	G	HET	1038	255	48.94
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon187:c.G78561C>p.E26187D,TTN:NM_133378:exon307:c.G97476C>p.E32492D,TTN:NM_003319:exon186:c.G77985C>p.E25995D,TTN:NM_133432:exon187:c.G78360C>p.E26120D	rs56308529	0.042	0.02	3.3344	chr2:179396162-179396162	C	G	HET	807	255	49.44
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon21:c.A3463G>p.K1155E,TTN:NM_133378:exon22:c.A3601G>p.K1201E,TTN:NM_003319:exon21:c.A3463G>p.K1155E,TTN:NM_133379:exon22:c.A3601G>p.K1201E,TTN:NM_133432:exon21:c.A3463G>p.K1155E	rs10497520	0.377	0.539	26.5108	chr2:179644855-179644855	T	C	HET	785	255	49.3
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon88:c.A22676G>p.W7559S	rs12693164	0.254	0.223	15.2866	chr2:179579093-179579093	T	C	HET	1246	255	46.95
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon137:c.C37589T>p.T12530I,TTN:NM_133378:exon257:c.G56504T>p.T18835I,TTN:NM_003319:exon136:c.C37013T>p.T12338I,TTN:NM_133432:exon137:c.C37388T>p.T12463I	rs2042996	0.492	0.426	31.2277	chr2:179451420-179451420	G	A	HET	590	255	50
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	P:TTN:NM_133437:exon147:c.G40627C>p.A13543I,TTN:NM_133378:exon267:c.G59542C>p.A19848P,TTN:NM_003319:exon146:c.G40051C>p.A13351P,TTN:NM_133432:exon147:c.G40426C>p.A13476P	rs4145333	0.985	0.995	0.4383	chr2:179444768-179444768	C	G	HOM	956	255	99.9
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon84:c.G21542A>p.S718I,N	rs13390491	0.237	0.219	15.4583	chr2:179582327-179582327	C	T	HET	893	255	50.95
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon118:c.A29482G>p.N9828D,TTN:NM_133378:exon238:c.A48397G>p.N16133D,TTN:NM_003319:exon117:c.A28906G>p.N9636D,TTN:NM_133432:exon118:c.A29281G>p.N	rs1001238	0.472	0.455	32.2054	chr2:179464527-179464527	T	C	HET	1046	255	49.52

Patient ID GE-06/11 **Date of birth**
Sample / Project S16900 / 53762 **Date of report** 29/10/2012

FUNC	GENE	EXONIC_FUNCTION	AACHANGE	DBSNP132	FREQ DBSNP	1000G ALL	5000G-MAF (ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
			9761D,											
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon147:c.G40456A:p.V13486 L:TTN:NM_133378:exon267:c.G58371A:p.V1979 I:TTN:NM_003319:exon146:c.G39880A:p.V132 94I:TTN:NM_133432:exon147:c.G40255A:p.V13 419L	rs2303838	0.351	0.317	22.3949	chr2:179444939-179444939	C	T	HET	633	255	45.18
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon7:c.C982T:p.R328C;TTN:NM_133378:exon7:c.C982T:p.R328C;TTN:NM_003319:exon7:c.C982T:p.R328C;TTN:NM_133379:exon7:c.C982T:p.R328C;TTN:NM_133432:exon7:c.C982T:p.R328C	rs16866538	0.256	0.222	8.8113	chr2:179659912-179659912	G	A	HET	355	255	48.45
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon116:c.A2783G:p.I9278V,	rs2042995	0.454	0.414	32.9662	chr2:179558366-179558366	T	C	HET	1160	255	47.5
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon130:c.C32966T:p.P10989 L:TTN:NM_133378:exon250:c.C51881T:p.P1729 4L:TTN:NM_003319:exon129:c.C32390T:p.P107 97L:TTN:NM_133432:exon130:c.C32765T:p.P10 92L	rs16866406	0.199	0.182	12.5295	chr2:179457147-179457147	G	A	HET	1272	255	48.82
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon43:c.G10118A:p.S3373N, TTN:NM_133378:exon44:c.G10256A:p.S3419N, TTN:NM_003319:exon43:c.G10118A:p.S3373N, TTN:NM_133379:exon44:c.G10256A:p.S3419N, TTN:NM_133432:exon43:c.G10118A:p.S3373N,	rs2291310	0.85	0.852	9.7647	chr2:179623758-179623758	C	T	HOM	968	255	100
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon44:c.G10739A:p.G3580D,	rs7585334	0.823	0.841	9.719	chr2:179620951-179620951	C	T	HOM	1064	255	100
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133437:exon127:c.G31817A:p.R10606 H:TTN:NM_133378:exon247:c.G50732A:p.R169 11H:TTN:NM_003319:exon126:c.G31241A:p.R1 0414H:TTN:NM_133432:exon127:c.G31616A:p. R10539H,	rs2288569	0.18	0.189	12.5231	chr2:179458591-179458591	C	T	HET	1036	255	49.32
exonic	TTN	nonsynonymous SNV	TTN:NM_133378:exon84:c.C21332A:p.A7111E,	rs2627043	0.433	0.403	26.5814	chr2:179582537-179582537	G	T	HET	1044	255	47.51

Patient ID GE-06/11 **Date of birth** 29/10/2012
Sample / Project S16900 / 53762 **Date of report** 29/10/2012

List of probably non-disease causing intronic genetic variants in splicing zones

FUNC	GENE	DBSNP132	FREQ_OBSNP	1000G_ALL	5000G-MAF(ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
splicing	ABCC9	rs35857705	0.5			chr12:22063252-22063252	A	-	UNK	287	16.3	40.42
splicing	ABCC9	rs3759236	0.673	0.664	41.2063	chr12:22068849-22068849	G	T	HET	755	255	49.54
splicing	ACTN2	rs2288601	0.84	0.746	22.2513	chr11:236902594-236902594	C	G	HOM	245	255	99.59
splicing	AGL	rs3736296	0.543	0.54	49.5848	chr11:100346741-100346741	T	C	HOM	744	255	99.73
splicing	AGL	rs2307130	0.41	0.395	41.5731	chr11:100316589-100316589	A	G	HOM	1023	255	99.9
splicing	AKAP9	rs733957	0.365	0.35	42.6966	chr7:91707197-91707197	C	T	HET	687	255	47.89
splicing	BAG3	rs11199065	0.5	0.163		chr10:121437329-121437329	A	G	HET	681	255	47.72
splicing	CACNA1B	rs7034745	0.498	0.42	30.8202	chr9:140881314-140881314	A	C	HOM	264	255	100
splicing	CALR3	rs3810197	0.088	0.118	12.9556	chr19:16601168-16601168	G	A	HOM	906	255	99.78
splicing	CASQ2	rs9428083	0.572	0.604	29.1558	chr11:16283343-116283343	A	G	HET	719	255	47.84
splicing	FBN2	rs60746914	0.7			chr5:127640783-127640783	G	A	HET	638	255	44.67
splicing	FHL1	rs2076705	0.565		38.4834	chrX1:35292022-135292022	C	T	HET	737	255	40.43
splicing	GAA	rs28684874	0.5			chr17:78081529-78081529	G	A	HET	43	246	41.86
splicing	GAA	rs3816256	0.61	0.604	32.731	chr17:78079544-78079544	C	G	HOM	67	255	100
splicing	GAA	*				chr17:78081528-78081528	-	A	AGCGGGC	30	242	100
splicing	KCNE1L	*				chrX1:108868391-108868391	G	A	HET	14	10.4	14.29
intronic:splicing	KCNJ12	rs58780973	0.389			chr17:21318595-21318595	G	C	HET	51	111	37.25
splicing	KCNJ5	rs4937991	0.748	0.745	25.2155	chr11:128786294-128786294	G	A	HET	337	255	51.34
splicing	LAMA4	rs3734289	0.281	0.263	25.8112	chr6:112435273-112435273	A	C	HOM	1097	255	100
splicing	LDB3	rs56193959				chr10:88459024-88459025	CT	-	HET	450	175	73.33
splicing	LDB3	rs2803558	0.8	0.755		chr10:88428335-88428335	T	C	HOM	82	255	100
splicing	LDLR	rs2738442		1		chr19:11221454-11221454	T	C	HOM	179	255	100
splicing	LDLR	rs12710260	0.375	0.221	33.769	chr19:11221457-11221457	G	C	HOM	183	255	100

Patient ID GE-06/11 **Date of birth**
Sample / Project S16900 / 53762 **Date of report** 29/10/2012

FUNC	GENE	DBSNP132	FREQ_DBSNP	1000G_ALL	5000G-MAF(ALL)	GENOMIC_POSITION	REF	OBS	AF1	DP_QUAL	QUAL	FREQ_ALT
splicing	PLEC	rs11780911	0.8	0.607	30.1229	chr8:145004546-145004546	G	A	HOM	22	255	100
splicing	RDM20	rs7077757	0.16	0.187	21.901	chr10:112544655-112544655	C	T	HET	976	255	47.23
splicing	RDM20	rs7070640	0.929	0.964	2.869	chr10:112590810-112590810	G	C	HOM	228	255	100
splicing	RYR2	rs10925391	0.422	0.396	30.4341	chr1:237540615-237540615	A	C	HET	852	255	47.54
splicing	RYR2	rs790901	0.713	0.72	34.8622	chr1:237957161-237957161	A	G	HET	1055	255	49.38
splicing	SCNSA	rs41312433	0.147	0.13	16.6419	chr3:38647642-38647642	G	T	HOM	212	255	100
splicing	TNN3	rs7252610		1		chr19:55665584-55665584	A	C	HOM	325	255	100
splicing	TTN	rs719201	0.871	0.898	5.3514	chr2:179642425-179642425	G	A	HOM	883	255	99.89
splicing	TTN	rs3731750	0.474	0.437	30.1198	chr2:179406003-179406003	C	A	HET	593	255	48.74
splicing	TTN	rs2562830	0.425	0.406	28.1648	chr2:179585393-179585393	A	G	HET	772	255	49.22
splicing	TTN	rs2288325	0.248	0.187	14.4207	chr2:179404786-179404786	A	T	HET	818	255	49.14

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Jacoby D, et al. "Genetics of inherited cardiomyopathy" *Eur Heart J*. 2012; 33:296-304.
- ² Barsheshet A, et al. "Genetics of Sudden Cardiac Death" *Curr Cardiol Rep* 2011; 13:364–376.
- ³ Towbin JA, et al. "Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children." *JAMA*. 2006;296:1867–1876.
- ⁴ Webber SA. "New-onset heart failure in children in the absence of structural congenital heart disease." *Circulation*. 2008;117:11–12.
- ⁵ Massin MM, et al. "Epidemiology of heart failure in a tertiary pediatric center." *Clin Cardiol*. 2008;31:388–391.
- ⁶ Wilkinson JD, et al. "The Pediatric Cardiomyopathy Registry and Heart Failure: Key Results from the First 15 Years", *Heart Fail Clin*. 2010 October; 6(4): 401–413.
- ⁷ Schwartz ML, et al. "Clinical Approach to Genetic Cardiomyopathy in Children" *Circulation*. 1996; 94: 2021-2038.
- ⁸ Felker GM, et al. "Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially unexplained cardiomyopathy" *N Engl J Med*. 2000 Apr 13;342(15):1077-84.
- ⁹ Maron BJ, et al. "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2006;113:1807–1816.
- ¹⁰ Elliott P, et al. "Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases." *Eur Heart J*. 2008 Jan;29(2):270-6.
- ¹¹ Thiene G, et al. "Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J*. 2004; 25:1772-1775.
- ¹² Thiene G, et al. "Moderna classificazione delle cardiomiopatie" *Cardiology Science*. 2008; 6:62-68.
- ¹³ Jarcho JA, et al. "Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1." *N Engl J Med*. 1989;321:1372–1378.
- ¹⁴ Geisterfer-Lowrance AA, et al. "A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation." *Cell* 1990;62:999–1006.
- ¹⁵ ARVC Database List of Pathogenic Variants as of March 29, 2011.
- ¹⁶ Number of Sarcomere Gene Variants Updated from 2006, Harvard Partners.
- ¹⁷ Kearney D, et al. "Histiocytoid Cardiomyopathy: a cause of sudden death in infancy" *Pathol Res Pract*. 1997; 193:595-596.
- ¹⁸ Shehata BM, et al. "Histiocytoid cardiomyopathy: three new cases and a review of the literature." *Pediatric and Developmental Pathology*. 1998; 1:56–69.
- ¹⁹ Voth D. "On arachnocyotosis of the myocardium (a contribution to the problem of rhabdomyoma of the heart)". *Frankf Z Pathol*. 1962; 71:646–656.

-
- ²⁰ Shehata B, et al. "Identification of Candidate Genes for Histiocytoid Cardiomyopathy (HC) Using Whole Genome Expression Analysis: Analyzing Material from the HC Registry" *Pediatr Dev Pathol*. 2011; 14(5):370–377.
- ²¹ Saffitz JE, et al. "Histiocytoid cardiomyopathy: a cause of sudden death in apparently health infants." *Am J Cardiol*. 1983; 52:215–217.
- ²² Cunningham NE, et al. "A rare cause of cot death – infantile xanthomatous cardiomyopathy." *Med Sci Law*. 1985; 25:149–152.
- ²³ Bruton D, et al. "Histiocytoid cardiomyopathy of infancy: an unexplained myofibre degeneration." *Pathology*. 1977; 9:115–122.
- ²⁴ Suarez V, et al. "Foamy myocardial transformation of infancy: an inherited disease." *J Clin Pathol*. 1987; 40:329–334.
- ²⁵ Burke A, et al. "Pediatric heart tumors" *Cardiovascular Pathology*. 2008; 17:193-198.
- ²⁶ Franciosi RA, et al. "Oncocytic cardiomyopathy syndrome" *Hum Pathol*. 1988; 19:1361-1362.
- ²⁷ Bird LM, et al. "Female infant with oncocytic cardiomyopathy and microphthalmia with linear skin defects (MLS): a clue to pathogenesis of oncocytic cardiomyopathy?" *Am. J. Med. Genet*. 1994; 53:141–148.
- ²⁸ Keller BB, et al. "Oncocytic cardiomyopathy of infancy with Wolff-Parkinson-White syndrome and ectopic foci causing tachydysrhythmias in children, *Am. Heart J*. 1987; 114:782–792.
- ²⁹ Silver MM, Jet al. "Oncocytic cardiomyopathy in an infant with oncocytosis in exocrine and endocrine glands" *Hum. Pathol*. 1980; 11:598–605.
- ³⁰ Andreu AL, et al. "A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy." *Pediatr Res*. 2000; 48:311–314.
- ³¹ Cohen-Barak O, et al. "Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene." *Gene*. 2001; 265:157–164.
- ³² Vallance HD, et al. "A case of sporadic infantile Histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation." *Pediatr Cardiol*. 2004; 25:538–540.
- ³³ Gelb AB, et al. "Infantile histiocytoid cardiomyopathy—myocardial or conduction system hamartoma: what is the cell type involved?" *Hum. Pathol*. 1993; 24:1226–1231.
- ³⁴ Malhotra V, et al. "Infantile histiocytoid cardiomyopathy: three cases and literature review" *Am. Heart J*. 1994; 128:1009–1021.
- ³⁵ Hotárková S, et al. "Demonstration of MyoD1 expression in oncocytic cardiomyopathy: report of two cases and review of the literature" *Pathology Research and Practice* 2004; 200:59–65.
- ³⁶ Edston E, et al. "Histiocytoid cardiomyopathy and ventricular non-compaction in a case of sudden death in a female infant" *Int J Legal Med*. 2009 123:47–53
- ³⁷ Baille T, et al. "TEST AND TEACH: Ill-defined subendocardial nodules in an infant" *Pathology*. 2001; 33:230-234.
- ³⁸ Rossi L, et al. "Multifocal Purkinje-like tumor of the heart. Occurrence with other anatomic abnormalities in the atrioventricular junction of an infant with junctional tachycardia, Lown-Ganong-Levine syndrome and sudden death." *Chest*. 1985; 87:340-345.

-
- ³⁹ Ruskiewicz AR, et al. "Sudden death in an infant due to histiocytoid cardiomyopathy. A light microscopic, ultrastructural and immunohistochemical study." *Am J Forensic Med Pathol.* 1995; 16:74-80.
- ⁴⁰ Zimmermann A, et al. "Congenital histiocytoid cardiomyopathy: evidence suggesting a developmental disorder of the Purkinje cell system of the heart" *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 1982; 396:187-195.
- ⁴¹ Malhotra V, et al. "Infantile histiocytoid cardiomyopathy: three cases and literature review." *American Heart Journal.* 1994; 128:1009-1021.
- ⁴² Edson E, et al. "Histiocytoid cardiomyopathy and ventricular non-compaction in a case of sudden death in a female infant" *Int J Legal Med* 2009; 123:47-53.
- ⁴³ Kauffman SL, et al. "Idiopathic infantile cardiomyopathy with involvement of the conduction system" *Am J Cardiol.* 1972; 30:648.
- ⁴⁴ Van Hare GF. "Radiofrequency ablation of the cardiac arrhythmias in pediatric patients" *Adv Pediatr.* 1994; 41:83.
- ⁴⁵ Zangwill SD, et al. "Orthotopic heart transplantation in a child with histiocytoid cardiomyopathy" *J Heart Lung Transplant.* 2004;23:902-904.
- ⁴⁶ Moss A J, "25th Anniversary of the International Long-QT Syndrome Registry : An Ongoing Quest to Uncover the Secrets of Long-QT Syndrome." *Circulation.* 2005; 111:1199-1201.
- ⁴⁷ Burashnikov E, et al. "Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death." *Heart Rhythm* 2010;7:1872-1882.
- ⁴⁸ Antzelevitch C, et al. "J wave syndromes." *Heart Rhythm* 2010;7:549-558.
- ⁴⁹ Kent WJ, et al. "The human genome browser at UCSC." *Genome Res.* 2002; 12:996-1006. (<http://genome.ucsc.edu/>)
- ⁵⁰ Abriel H. "Cardiac sodium channel Na_v1.5 and interacting proteins: physiology and pathophysiology." *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 1:2-11.
- ⁵¹ Wu L, et al. "Identification of a new cofactor, MOG-1, required for the full function of cardiac sodium channel Na_v1.5." *J Biol Chem.* 2008; 283:6968-6978.
- ⁵² Davey JW, et al. "Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing." *Nat Rev Genet.* 2011; 12:499-510.
- ⁵³ Su Z, et al. "Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics." *Expert Rev Mol Diagn.* 2011; 11:333-343.
- ⁵⁴ Metzker ML. "Sequencing technologies - the next generation." *Nat Rev Genet.* 2010; 11:31-46.
- ⁵⁵ Fajta F, et al. "Next generation sequencing in cardiovascular diseases." *World J Cardiol* 2012; 4:288-295.
- ⁵⁶ Hug G, et al. "Idiopathic cardiomyopathy: Mitochondrial and cytoplasmic alterations in heart and liver." *Lab Invest.* 1970; 22:541-522.
- ⁵⁷ Reid JD, et al. "Infantile cardiomyopathy: A previously unrecognized type with histiocytoid reaction." *J Pediatr.* 1968;73:335-339.
- ⁵⁸ Witzleben CL, et al. "Foamy myocardial transformation of infancy." *Arch Pathol Lab Med.* 1978;102:306-311.
- ⁵⁹ Priori SG, et al. "Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology." *Europace* 2002;4:3-18.

-
- ⁶⁰ Antzelevitch C. “Molecular genetics of arrhythmias and cardiovascular conditions associated with arrhythmias.” *Heart Rhythm* 2004;1:42C–56C
- ⁶¹ Tu E, et al. “Post-mortem review and genetic analysis of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) cases.” *Brain Pathol.* 2011;21:201-208.
- ⁶² Reuter H, et al. “Voltage-dependent mechanisms for raising intracellular free calcium concentration: calcium channels.” *Ciba Found Symp* 1986; 122:5-22.
- ⁶³ Glossmann H, et al. “Purified L-type calcium channels: only one single polypeptide (alpha 1-subunit) carries the drug receptor domains and is regulated by protein kinases.” *Biomed Biochim Acta* 1987; 46:S351-S356.
- ⁶⁴ Dolphin AC. “Assembly and targeting of voltage-dependent calcium channels.” In: Moss SJ, Henley J, eds. *Receptor and Ion Channel Trafficking.* Oxford University Press. 2002; p58–86.
- ⁶⁵ Wilde AAM, et al. “Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel.” *Circ Res.* 2011; 108:884-897.
- ⁶⁶ Marfatia KA, et al. “Identification and characterization of the human MOG1 gene.” *Gene.* 2001; 266:45-56.
- ⁶⁷ Olesen MS, et al. “A novel nonsense variant in Na_v1.5 cofactor MOG-1 eliminates its sodium current increasing effect and may increase the risk of arrhythmias.” *Canadian Journal of Cardiology.* 2011; 27:523.e17-523.e2.
- ⁶⁸ Johnson JN, et al. “Cardiac channel molecular autopsy for sudden unexpected death in epilepsy.” *J Child Neurol.* 2010; 25:916-921.
- ⁶⁹ Tu E, et al. “Post-mortem review and genetic analysis of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) cases.” *Brain Pathol.* 2011; 21:201-208.
- ⁷⁰ Aurlien D, et al. “New SCN5A mutation in a SUDEP victim with idiopathic epilepsy.” *Seizure.* 2009;18:158-60.
- ⁷¹ Ackerman MJ. “Cardiac causes of sudden unexpected death in children and their relationship to seizures and syncope: genetic testing for cardiac electropathies.” *Semin Pediatr Neurol.* 2005; 12:52-8.
- ⁷² Lobo, I. “Same genetic mutation, different genetic disease phenotype.” *Nature Education* 2008; 1(1).
- ⁷³ Nadeau JH. “Modifier genes in mice and humans.” *Nat Rev Genet.* 2001;2:165-174.
- ⁷⁴ Strbak V. “Heart: The source and target of “hypothalamic neurohormones”: Do they provide a delicate regulation complementary to the conduction system in the heart?” *Gen. Physiol. Biophys.* 2000; 19:341–343 .
- ⁷⁵ Flynn TG, et al . “The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 117:859-865.
- ⁷⁶ Kakar SS, et al. “Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues.” *Cancer Lett.* 1995; 98:57–62.
- ⁷⁷ McArdle CA, et al. “Cyclic guanosine monophosphate production in the pituitary: Stimulation by C-type natriuretic peptide and inhibition by gonadotropin-releasing hormone in alpha T3-1 cells.” *Endocrinology* 1993; 132:2065–2072.
- ⁷⁸ Middendorff R, et al. “Synthesis of C-type natriuretic peptide (CNP) by immortalized LHRH cells.” *J.Neuroendocrinol.* 1997; 9:177–182.
- ⁷⁹ Schmid H, et al. “Serum concentrations of LH and FSH in the healthy newborn.” *European Journal of Endocrinology* 2000; 143:213-215.

⁸⁰ Bhupathy P, et al. "Influence of sex hormones and phytoestrogens on heart disease in men and women." *Womens Health. (Lond Engl)* 2010; 6:77–95.

⁸¹ Lehmann MH, et al. "Sex difference in risk of torsade de pointes with d,l-sotalol." *Circulation*. 1996; 94:2535–2541.

⁸² Romhilt DW, et al. "Arrhythmias on ambulatory electrocardiographic monitoring in women without apparent heart disease." *Am J Cardiol*. 1984; 54:582–586.

⁸³ Kawasaki R, et al. "Increased propensity of women to develop torsades de pointes during complete heart block." *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995; 6:1032–1038.

⁸⁴ James AF, et al. "Sex, drugs and arrhythmia: are gender differences in risk of torsades de pointes simply a matter of testosterone?" *Cardiovasc Res*. 2003; 57:1–4.

⁸⁵ Sclarovsky S, et al. "The role of oestrogen in the pathophysiologic process of the Tako-Tsubo cardiomyopathy." *European Heart Journal* 2010; 31:377–379.

RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere la mia gratitudine al Prof. Grasso, per avermi dato la possibilità di frequentare questo corso di dottorato e i laboratori del Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute.

Ringrazio sentitamente il Prof. Intriery per l'attenzione che mi ha dedicato in questi anni nello svolgimento delle attività di laboratorio e nella stesura di questo lavoro, ma soprattutto per avermi dato l'opportunità di crescere, non negandomi mai la possibilità di collaborazioni sia in Italia che all'estero.

La mia profonda riconoscenza va al Prof. Marziliano, che ha creduto in me dal primo momento e mi ha aiutato ogni volta che ne ho avuto bisogno. Grazie al suo prezioso ausilio sono riuscita a completare questo lavoro di tesi e grazie alla fiducia che mi ha dimostrato mi ha reso consapevole delle mie capacità. A lui va tutta la mia stima e gratitudine.

Intendo ringraziare l'Ospedale Niguarda Ca'Granda di Milano, in particolare il Dipartimento di Cardiologia e Anatomia Patologica, per avermi offerto la possibilità di studiare e analizzare questo caso clinico unico.

Un ringraziamento sincero va anche a l'Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (Inibic-Spagna) e all'University College of London (UCL-Inghilterra), che ospitandomi, mi hanno dato la possibilità di apprendere e crescere professionalmente e personalmente. In particolare, grazie al Prof. Monserrat e al Prof. Syrris, per avermi permesso di lavorare nei loro laboratori, alla dott.ssa Maneiro, per la fiducia che ha riposto in me e gli apprezzamenti che non dimenticherò mai, e soprattutto grazie alla disponibilità del dott. Lesende, che mi ha "illuminata" sulle potenzialità della NGS e mi ha fatto ricordare perché amo questo lavoro, ma anche perché si è dimostrato un vero amico.

Desidero poi, ringraziare tutti i docenti, i colleghi dottorandi e post-doc, e tutto il personale del Dipartimento DiMeS: sono stati un supporto importante in questa tappa della mia vita.

Non essendo possibile citare tutte le persone che ho incontrato e che mi sono stati vicini in questi anni, rivolgo un grazie particolare:

al Prof. Calcagno e a Marilù, con cui tutto è cominciato;

al Prof. Oriani, che è stato tra i primi a credere nelle mie potenzialità;

alla dott.ssa Filetti, "Fede", che in questo percorso è stata una mamma, un tutor, ma soprattutto un'amica che nei numerosi momenti di sconforto ha sempre trovato il modo di risollevarmi e calmarmi, ma soprattutto perché le basta uno sguardo per capire come mi sento;

a tutte le colleghe, in realtà amiche del laboratorio, che mi hanno sopportato e supportato in tutte le discussioni scientifiche e soprattutto in quelle personali: Erika, con cui ho condiviso anche tante notti e “dubbi”, Carola, conosciuta davvero anche grazie ad un concorso (e una birra!), Federica, che da “new entry” è arrivata subito in pole position, Sergio “aso” con il suo ottimismo, Manuela, Giampaolo, Alessia e in particolare Daniela con cui ho iniziato e concluso questa esperienza. Spero di poter continuare a lavorare a lungo con loro e qualora ciò non fosse possibile, spero che il nostro rapporto rimanga sempre così profondo;

a tutti gli amici di sempre, che ho poche occasioni di rivedere, ma ogni volta che ci sentiamo o vediamo è come se fossero passati pochi giorni, e tra questi grazie a Fabio e Gabriella per l’ospitalità, a Domenico e Maria per l’affetto, a Maria José, Antonella e Alessandra per l’amicizia e per continuare a camminare fianco a fianco verso il futuro;

ai miei nuovi amici, Marian, la compagnia del Cachivachi e dell’Hostal: hanno reso questi ultimi mesi di dottorato indimenticabili e grazie a loro ho imparato una nuova lingua, nuovi usi e costumi e nuove cose anche su me stessa.

Infine, desidero ringraziare la persone più importanti della mia vita, senza le quali non sarei riuscita a raggiungere questo ed altri traguardi anche più importanti: la mia famiglia. I miei genitori, che mi hanno dato la vita e mi sono stati accanto nelle gioie e nei dispiaceri, aiutandomi e spingendomi ad andare sempre avanti; mia sorella, il mio nipotino e mia zia che, anche se lontani, mi danno una grande forza dimostrandomi ogni giorno tutto il loro affetto; mio zio, che sono sicura che anche dal cielo mi abbia aiutato e che sarebbe stato orgoglioso di questo lavoro da “miezz-medico”; Giosuè, che rappresenta la mia nuova famiglia e che spero rimanga per sempre al mio fianco, nonostante tutte le difficoltà che dovremmo affrontare, aiutandomi e appoggiandomi come ha fatto in tutti questi anni.

PUBBLICAZIONI E PRESENTAZIONI A CONFERENZE

Scapagnini G, Caruso C, Vasto S, Pascale A, Intrieri M, **Sapere N**, Li Volti G.

“Biomarkers for Alzheimer’s disease”

Frontiers in Bioscience 2010 Jan 1;2:616-22

Marziliano N, **Sapere N**, Orsini F, Motta V, Veronese S, Gambacorta M, Merlini P, Intrieri M.

“A quantitative-PCR protocol rapidly detects alpha-GAL deletions/duplications in patients with Anderson-Fabry disease”

Molecular Genetics and Metabolism 2012 Apr 105; 4:687–689

Davinelli S, **Sapere N**, Bracale R, Intrieri M, Scapagnini G.

“Pleiotropic Protective Effects of Phytochemicals in Alzheimer's Disease”

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2012, Article ID 386527

Di Cagno A, **Sapere N**, Piazza M, Aquino G, Iuliano E, Intrieri M, Calcagno G.

“ACE and AGTR1 Polymorphisms in Elite Rhythmic Gymnastics”

Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2012 Nov 12

Motta V, Orsini F, Merlini P, Veronese S, Gambacorta M, Mauri F, **Sapere N**, Intrieri M, Marziliano N.

“Clinical applications in cardiovascular pharmacogenomics: is the Warfarin dosing genotype-driven here to stay?”

Under Submission

Motta V, Orsini F, Merlini P, Veronese S, Gambacorta M, Mauri F, **Sapere N**, Intrieri M, Marziliano N.

"Clinical and biomolecular characteristics of a Caucasian male with a typical presentation of Anderson-Fabry disease and carrier of the p.His186Pro GLA gene variant: SNP or causative mutation?"

Under Submission

Scognamiglio G, **Sapere N**, Gaudio G, Zito Marino F, Tisci F, La Sala L, La Mantia E, Manna A, Franco R, Botti G, Intrieri M

“Protein detection/localization and genotyping of SIRT1 polymorphisms in NSCLCS”

Poster presentato al Congresso Annuale di Anatomia Patologica SIAPEC-IAP, ottobre 25-27, 2012, Firenze

Scapagnini G, Davinelli S, **Sapere N**, Zella D, Fortunati N.

“Heat-shock protein 70 is affected by thermal treatment”

Poster presentato al 38th ISMH World Congress, June 20-23, 2012, Lanjaròn (Granada, Spain)

Sapere N, Marziliano N, Merlini PA, Frigerio M, Giannattasio C, Intriери M.

“A quantitative-PCR protocol rapidly detects alpha-GAL deletions/duplications in patients with Anderson-Fabry disease”.

Oral communication and symposium.

PhD Fabry Research Initiative, May 31, 2012, Berlin

Fabry Round Table Symposium June 1 – 2, 2012, Berlin.

Calcagno G, **Sapere N**, Piazza M, Cordi MC, D’Artibale E, Intriери M, Di Cagno A.

“The ACE gene insertion/deletion polymorphism in the 2010 World Champion group of Rhythmic Gymnastics.”

Poster presentato al 16th Annual Congress of the European College of Sport, July 6-9, 2011, Liverpool