

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

CARDIOMIOPATIE GENETICHE ARITMOGENE

Dottorando

Dott. Giuseppe Riccio

INTRODUZIONE

La sindrome di Brugada fa parte delle miocardiopatie genetiche con alterazioni dei canali ionici geneticamente determinate. È caratterizzata clinicamente da un pattern elettrocardiografico con presenza di un blocco di branca destro incompleto e un sopraslivellamento del segmento ST nelle derivate precordiali destre (V1-V3), e da un'elevata incidenza di morte cardiaca improvvisa in pazienti senza alterazioni strutturali miocardiche.

La sindrome di Brugada è trasmessa in modo autosomico dominante ed il primo e finora il solo gene coinvolto è il gene SCN5A. Il gene SCN5A codifica per la subunità α del canale del sodio voltaggio-dipendente, responsabile della depolarizzazione iniziale del ciclo cardiaco. Nel 1995 venne identificato sul braccio corto del cromosoma 3 (3p21). Il gene è diviso in 28 esoni ed ha una lunghezza di circa 80 Kb (Figura 1).

Il canale del sodio cardiaco è composto da due subunità: α e β . La subunità α è formata da 4 domini eterologhi (DI-DIV), ciascuno formato da 6 segmenti transmembrana (S1-S6), costituiti principalmente da aminoacidi idrofobici (Figura 2).

La posizione dei singoli segmenti nella struttura tetramerica è tale che i segmenti S5 ed S6 si trovano al centro, gli altri sono disposti più radialmente. Ognuno di questi segmenti, nonché i tratti di congiunzione tra i segmenti, svolge un ruolo specifico nelle varie attività del canale. Il segmento transmembranario S4 di ognuno dei 4 domini omologhi della subunità α del canale del sodio presenta una sequenza particolare: residui aminoacidici carichi positivamente si ripetono ad intervalli regolari, alternati ad aminoacidi idrofobici. In questo modo le cariche positive si trovano rivolte verso l'interno del canale, costituendo il "sensore" del canale. L'ansa intracellulare tra i domini III e IV presenta un motivo idrofobico costituito da isoleucina-fenilalanina-metionina (IFM), che ha il ruolo di inattivare e chiudere il canale. Il tratto che congiunge i segmenti transmembranari S5 e S6 contiene una sequenza di una ventina di aminoacidi che si insinua al centro dell'anello formato dagli altri segmenti e che presumibilmente forma il contorno del poro attraverso il quale passano gli ioni. Recenti studi hanno dimostrato il ruolo che il COOH terminale può avere nell'inattivazione del canale nella sua isoforma cardiaca e del cervello. L' α subunità della proteina forma il canale funzionale vero e proprio, ma la subunità accessoria β contribuisce al corretto assemblaggio, trasporto e localizzazione nella membrana plasmatica, nonché al corretto funzionamento del canale stesso.

Mutazioni nel gene SCN5A sono associate alla sindrome di Brugada, ma anche alla sindrome del QT lungo di tipo 3 e ad altre patologie correlate a disfunzioni della conduzione cardiaca. Fino ad

oggi sono state trovate 96 mutazioni (Tabella 1) in zone diverse del gene e che provocano diverse variazioni di funzione, lo studio di una parte di queste ha dimostrato la perdita di funzione del canale del sodio, con uno spostamento dell'attivazione, dell'inattivazione voltaggio e tempo dipendente della corrente di sodio passante per il canale. Anche il recupero dallo stato di inattivazione avviene più lentamente.

In generale la mutazione del gene SCN5A si riscontra nel 18-30% dei casi di sindrome di Brugada, nei rimanenti è possibile che siano mutate le regioni a monte, come regioni promotore, zone di splicing critiche oppure che vi siano grossi riarrangiamenti mai studiati. Quindi la conoscenza della genetica non ci guida nella formulazione della diagnosi o nella determinazione della prognosi, ma contribuisce a supportare una diagnosi fondamentalmente clinica e avvia nel campo della ricerca verso una maggiore consapevolezza del legame tra genotipo e fenotipo Brugada¹.

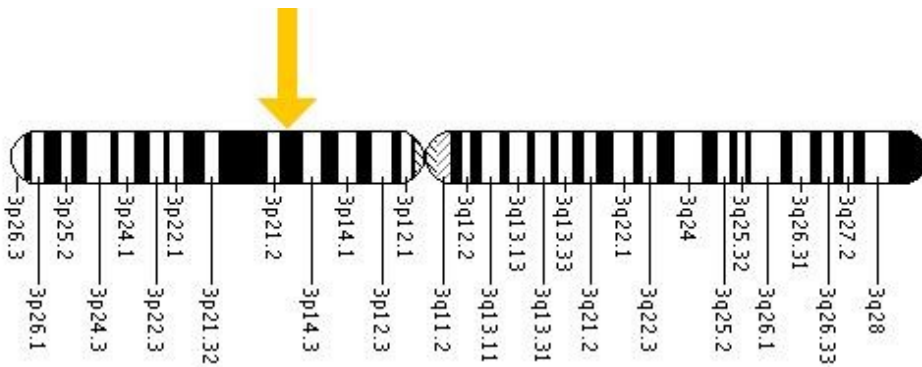


Figura 1: gene SCN5A, cromosoma 3p21

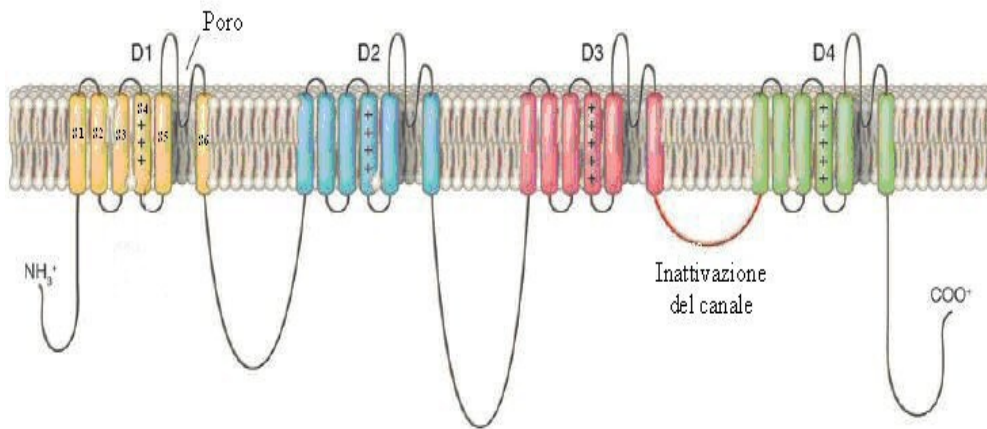


Figura 2: rappresentazione del canale del NA cardiaco

Nucleotide Change	Aminoacid Change	Mutation Type	Region	Phenotype
C559T	T187I	Missense		BrS+SSS
T635C	<u>L212P</u>	Missense	DI/S3-S4	Atrial standstill
G1066A	<u>D356N</u>	Missense	DI/S5-S6	BrS+CCD
n.a.	<u>R367C</u>	Missense	DI/S5-S6	BrS + ARVC
1177-1179del	<u>393delF</u>	Deletion	DI/S6	BrS
T1700A	<u>L567Q</u> 	Missense	DI-DII	BrS-SIDS
G3340A	<u>D1114N</u>	Missense	DII-DIII	BrS and RW

Tabella 1: alcune delle 96 mutazioni riscontrate sino ad oggi; [Legenda: n.a. = not available; ARVC= arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; SSS= sinus node disease; CCD= Cardiac Conduction Defect; RW = Romano-Ward (long QT) phenotype]²

Caratteristicamente la sindrome si manifesta nell'età adulta tra 25 e 55 anni. Si stima che tale patologia sia responsabile del 4% di tutte le morti improvvise, almeno del 20% di quelle in soggetti senza alterazioni strutturali miocardiche ed è la principale causa di morte in soggetti di età <40 anni, incidenti stradali esclusi. La prevalenza è stimata intorno a 5/10000 abitanti, ma è difficile quantificarne il valore vero poiché il pattern elettrocardiografico è dinamico e l'alterazione può essere latente³. Esistono infatti tre pattern elettrocardiografici diversi (figura 3): il tipo 1 è caratterizzato da un soprasslivellamento concavo del tratto ST (con onda J) $\geq 0,2$ mV nelle derivazioni destre seguito da un'onda T negativa. Il tipo 2 è detto saddleback per la morfologia elettrocardiografica a sella o a tetto a due spioventi sempre con un'elevazione $\geq 0,2$ mV, gradualmente discendente, ma che rimane sempre $\geq 0,1$ mV seguita da un'onda T positiva o bifasica. Il tipo 3 è caratterizzato da un soprasslivellamento $< 0,1$ mV con morfologia concava, a sella o con ambedue. Secondo il Consensus Report del 2005 solo il tipo 1 è diagnostico di Brugada⁴. Gli altri due pattern non sono diagnostici di sindrome di Brugada sebbene la loro prevalenza sembri essere molto più alta.

Circa il 20% dei pazienti con sindrome di Brugada sviluppa aritmie sopraventricolari: la fibrillazione atriale è associata nel 10-20% dei casi; sono state descritte associate anche la tachicardia da rientro nel nodo atrio ventricolare e la sindrome di Wolff-Parkinson-White⁵. Un recente studio riporta che l'inducibilità ventricolare e la storia di aritmia atriale sono correlate. Inoltre pazienti con indicazione all'impianto di defibrillatore hanno un'incidenza più alta di aritmia atriale rispetto a pazienti in cui non c'è indicazione all'impianto; questo deporrebbe per un avanzamento della malattia in quei soggetti con aritmia atriale.

Criteri diagnostici. Per la sindrome di Brugada sono stati descritti tre pattern di ripolarizzazione elettrocardiografici. Il tipo 1, caratterizzato da un soprasslivellamento concavo del tratto ST ≥ 2 mV seguito da un'onda T negativa, è diagnostico quando il segno è presente in più di una derivazione precordiale destra, sia con l'assunzione di farmaci bloccanti il canale del sodio che senza, insieme ad una delle seguenti caratteristiche: fibrillazione ventricolare documentata, tachicardia ventricolare polimorfa, storia familiare di morte cardiaca improvvisa prima dei 45 anni, ECG tipico in membri della famiglia, tachicardia ventricolare inducibile con stimolo elettrico, sincope o sofferenza respiratoria notturna. E' poco utile l'utilizzo di agenti bloccanti i canali del sodio in soggetti con pattern tipo 1 e asintomatici, non fornendo ulteriore valore diagnostico ne prognostico ed essendo gravato da rischio di aritmie.

In alcuni casi un ECG simile a quello del Brugada può comparire per un più o meno breve periodo dopo una cardioversione elettrica, e non si sa se questi siano dei portatori di sindrome di Brugada.

Un particolare pattern elettrocardiografico si riscontra in atleti ben allenati che mostrano un sopralivellamento del segmento ST che non si modifica con i bloccanti del canale del sodio. Ed ancora si può incontrare un pattern simile indotto da particolari farmaci, non si sa se per una personale predisposizione genica. In alcuni casi si può riscontrare un sopralivellamento nelle derivazioni inferiori o precordiali sinistre, alcuni di questi sono associati a mutazioni del gene SCN5A.

Il tipo 2 ha un aspetto a sella con un sopralivellamento ≥ 2 mV e un incavo ≥ 1 mV seguite da un'onda T positiva o bifasica. Il tipo 3 ha un aspetto concavo o a sella con sopralivellamento < 1 mV⁴. Questi due pattern non sono diagnostici di sindrome di Brugada, ma lo diventano quando essi sono presenti in più di una derivazione precordiale destra e il pattern si slatentizza con la somministrazione di bloccanti dei canali del sodio. Anche qui possono coesistere quelle particolari condizioni cliniche riportate sopra. La conversione farmaco indotta del tipo 3 in tipo 2 non dà una diagnosi certa. Il pattern elettrocardiografico tipo 1 può essere smascherato oltre che da farmaci anche da stati febbrili⁶, agenti vagotonici, agonisti α -adrenergici, β -bloccanti, antidepressivi triciclici, glucosio più insulina, ipokaliemia, ipercalcemia, tossicità da alcool e cocaina. Si può così spiegare la maggiore frequenza di eventi aritmici notturni per l'aumento del tono vagale, ma probabilmente anche per l'influenza di altri fattori (ormonali, metabolici).

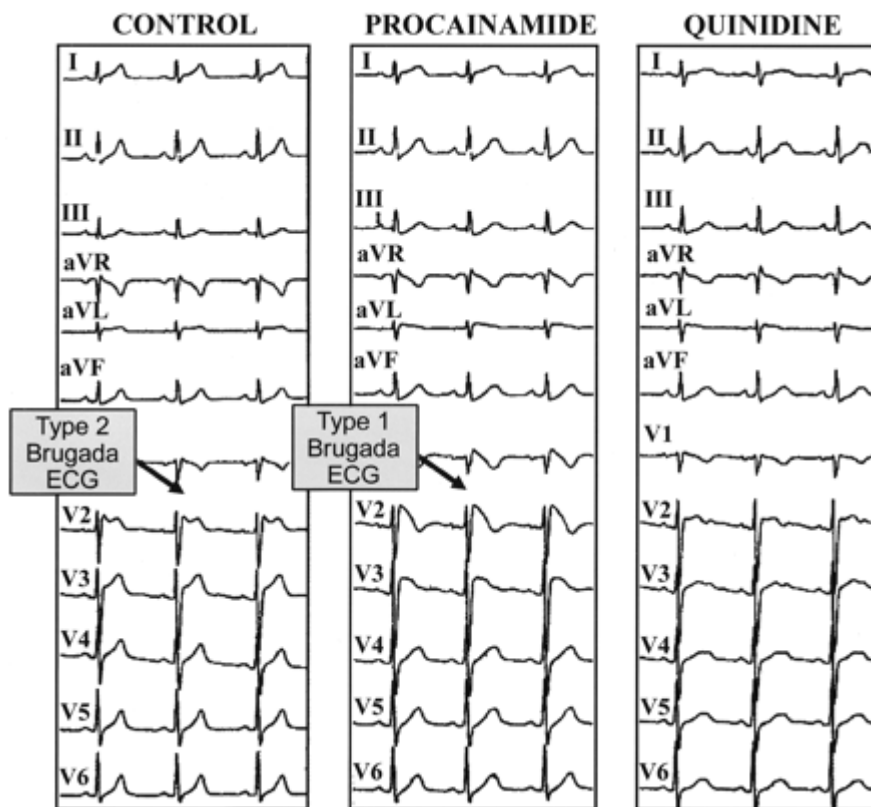


Figura 3: pattern elettrocardiografici

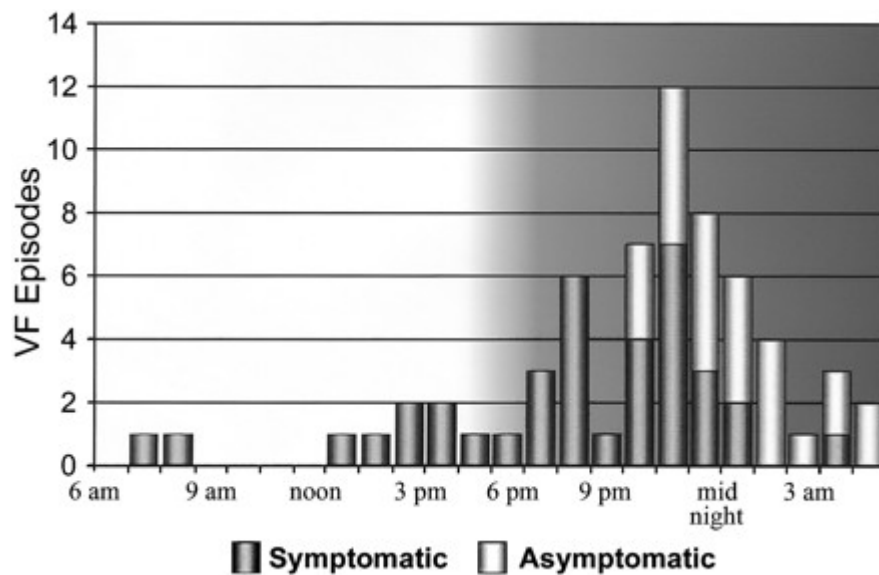


Figura 4: Andamento circadiano degli episodi di FV in pazienti Brugada.

Posizionando gli elettrodi delle derivazioni precordiali destre più in alto possiamo aumentare la sensibilità e rivelare un fenotipo Brugada in alcuni pazienti, con o senza l'utilizzo di agenti slatentizzanti.

Talvolta si osserva un lieve allungamento del tratto QT in associazione al sopralivellamento del segmento ST; questo risulta prolungato in misura maggiore nelle derivazioni precordiali destre, presumibilmente a causa di un prolungamento del potenziale d'azione a livello dell'epicardio ventricolare destro. Le anomalie della depolarizzazione si osservano frequentemente soprattutto in quei soggetti con mutazioni del gene SCN5A ed includono il prolungamento dell'onda P, del segmento PR e dell'intervallo QRS.

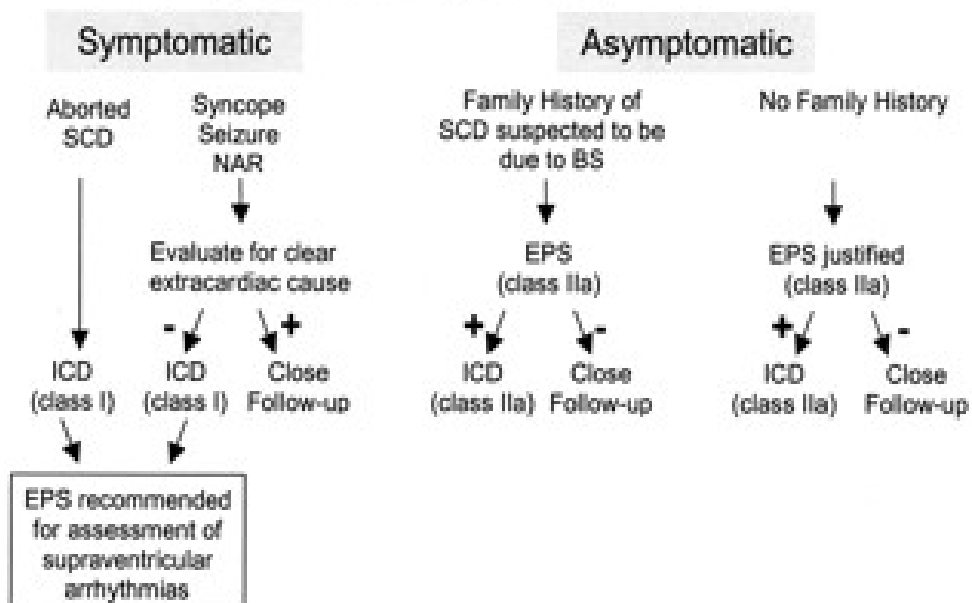
L'esistenza di numerose condizioni fisiopatologiche che si manifestano con uno slivellamento del tratto ST rende difficile la diagnosi differenziale, in particolar modo quando l'utilizzo dei bloccanti i canali del sodio, flecainide, aimalina, procainamide, disopiramide et al, non è dirimente. Il test alla flecainide deve essere monitorato elettrocardiograficamente in modo continuo e deve essere interrotto quando sia slatentizzato il Brugada tipo 1, o vi sia un innalzamento del tratto ST ≥ 2 mm in un Brugada tipo 2, o ancora un battito ventricolare prematuro o altre aritmie o un prolungamento del QRS $>$ del 130%. La somministrazione dei bloccanti i canali del sodio endovenosa deve avvenire con grande cautela, lentamente, sotto stretto monitoraggio e solo in presenza di rianimatore, con un'attenzione particolare in quei soggetti che mostrano anomalie compatibili con maggiore rischio aritmico⁴.

Stratificazione del rischio e interventi. La stratificazione del rischio si pone l'obiettivo di identificare i soggetti a rischio per morte cardiaca improvvisa, avvalendosi di dati clinici, elettrocardiografici e studi elettrofisiologici. Diversi autori si avvalgono di criteri in parte differenti per la valutazione del rischio, ma sembrano concordare col fatto che i soggetti a più alto rischio, Classe I, sono quelli con morte improvvisa "abortiva", potendo ricorrere tale evenienza con elevata frequenza, sia con pattern elettrocardiografico di tipo 1 spontaneo che dopo assunzione di agenti bloccanti i canali del sodio. In questi pazienti è pertanto raccomandato l'impianto di un defibrillatore automatico. Seguono in Classe IIa i soggetti con sintomi come sincope, respiro agonico notturna, accompagnati da pattern elettrocardiografico tipo 1 non spontaneo in questi pure è indicato l'impianto di ICD, anche non preceduto da studio elettrofisiologico. Sempre in Classe IIa ci sono pazienti asintomatici con pattern tipo 1 spontaneo sia con storia familiare di morte cardiaca improvvisa che senza, e pazienti asintomatici con pattern tipo 1 non spontaneo ma solo se presente storia di familiarità per morte cardiaca improvvisa. In questa classe è necessario lo

studio elettrofisiologico; in caso di negatività si eseguirà solo follow up; in caso di positività l'impianto di ICD. In realtà per la Classe II le evidenze sono discordanti circa l'efficacia dell'impianto di ICD. Per i pazienti con pattern di tipo 1 non spontaneo in cui la storia familiare è negativa è consigliata solo una stretta sorveglianza⁷, (figura 5) .

Accanto all'utilizzo di defibrillatori si pone un approccio farmacologico. Diverse sostanze sono state studiate, amiodarone e β -bloccanti sono inefficaci, antiaritmici di classe IC come propafenone e flecainide sono controindicati, così come alcuni agenti della classe IA; al contrario la quinidina, sebbene appartenga anch'essa alla classe IA, sembra essere efficace.

Spontaneous Type 1 ECG



Sodium Channel Block-induced Type 1 ECG

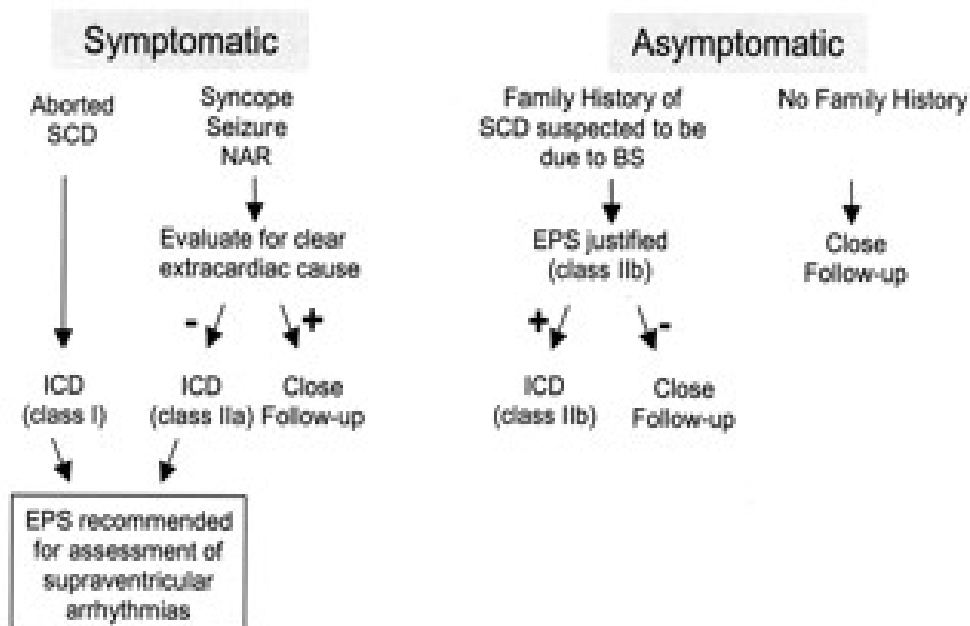


Figura 5: indicazioni per l'impianto di ICD, da Maron et al⁽⁸⁾

SCOPI

Il presente lavoro si inquadra nell'ambito di un progetto più ampio svolto in collaborazione con il CEINGE, in particolare con i laboratori del Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie mediche dell'Università Federico II di Napoli, e disegnato per valutare l'incidenza delle mutazioni genetiche come base delle cardiomiopatie. Nell'ambito di questo progetto, tutti i pazienti con diagnosi di cardiomiopatia dilatativa familiare o di cardiomiopatia aritmogena ed i loro familiari sono sottoposti ad analisi genetica per l'identificazione delle più comuni forme di difetto genetico come base etiologica della malattia. Per quanto riguarda più specificamente la malattia di Brugada sono state studiate tre famiglie. In due di queste famiglie non abbiamo riscontrato la presenza di alterazioni a livello genico. La terza famiglia studiata (famiglia E) ha tra i suoi componenti alcuni soggetti positivi al test genetico. La peculiarità di tale alterazione genetica ha fornito lo spunto per la ricerca di un possibile legame tra alterazioni genetiche e risvolti prognostici.

MATERIALI E METODI

Lo studio svolto è costituito da una fase clinico/strumentale e da una fase di analisi genetiche.

FASE CLINICA: I soggetti arruolati per lo studio sono pazienti con sospetto o diagnosi clinica di Sindrome di Brugada indirizzati al nostro dipartimento per gli accertamenti e le cure del caso. La valutazione clinica eseguita comprende un'accurata anamnesi, esame obiettivo, l'esame emocromocitometrico, la routine laboratoristica, l'acquisizione di elettrocardiogramma a riposo, l'esecuzione di ecocardiogramma, di Rx torace. I pazienti sono stati inquadrati dal punto di vista prognostico in due classi come precedentemente descritto.

Nei soggetti analizzati si è eseguita una ricostruzione dell'albero genealogico ponendo particolare attenzione alla storia di morti improvvise in soggetti di giovane età e ad eventi che potessero far sospettare di malattie aritmiche. I figli dei soggetti con sindrome di Brugada sono stati esaminati dal punto di vista cardiologico con esecuzione di ECG ed ecocardiogramma. Sono stati eseguiti inoltre prelievi di sangue venoso periferico contestualmente alla visita, per eseguire la ricerca delle mutazioni del familiare con sindrome di Brugada.

ANALISI GENETICHE: Gli esami genetici, eseguiti su un prelievo ematico periferico, sono stati caratterizzati, come descritto dettagliatamente di seguito, da estrazione del DNA, amplificazione del DNA mediante PCR, elettroforesi su gel di agarosio, ricerca di mutazioni mediante dHPLC e sequenziamento

Estrazione del DNA: Per effettuare le indagini genetiche sono stati prelevati 5 mL di sangue da ciascun soggetto sottoposto all'indagine genetica. L'estrazione del DNA dal sangue periferico è eseguita mediante kit Nucleon. In seguito all'estrazione, il DNA è stato amplificato mediante la PCR.

Amplificazione del DNA mediante PCR: L'amplificazione del DNA è eseguita mediante PCR, metodo attraverso il quale una sequenza di acido nucleico è amplificata esponenzialmente in vitro. È necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute con sufficiente precisione per poter sintetizzare degli oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad esse. Il prodotto della reazione sarà una molecola di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligonucleotidi utilizzati.

In pratica la reazione di PCR viene allestita all'interno di una provetta sterile dove vengono mescolati:

- DNA da amplificare;
- due oligonucleotidi (senso e antisenso), generalmente di circa 18-20 basi;
- la miscela di desossinucleotidi trifosfato (dNTP) che la polimerasi aggiunge per sintetizzare il nuovo filamento;
- $MgCl_2$ (cloruro di Magnesio), indispensabile per il buon funzionamento della Taq polimerasi e per la stabilizzazione dei nucleotidi;
- il tampone, ovvero una soluzione in grado di tamponare le variazioni di pH e che contiene altri fattori in grado di stabilizzare ed aumentare l'efficienza dell'enzima;
- la Taq polimerasi (l'enzima derivato dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*), responsabile dell'avanzamento dell'amplificazione del frammento d'interesse;
- l'acqua per portare il tutto alla giusta concentrazione e favorire il mescolamento dei vari reagenti.

La reazione avviene in una particolare macchina detta *Thermal cycler*, uno strumento computerizzato capace di controllare con grande precisione e omogeneità le differenti temperature richieste nel corso della reazione.

Un tipico ciclo di PCR è costituito da tre fasi:

1. Denaturazione: il DNA contenente il segmento da amplificare è inizialmente denaturato ad una temperatura superiore alla temperatura di melting dei primers (solitamente $94^{\circ}C$ per un periodo compreso tra dieci e sessanta secondi).
2. Ibridazione o appaiamento: la temperatura di appaiamento è specifica per ogni coppia di oligonucleotidi usata.
3. Estensione: la temperatura viene portata a $72^{\circ}C$ per consentire alla DNA polimerasi termoresistente di replicare il DNA bersaglio.

Durante il primo ciclo di reazione l'estensione di ogni oligonucleotide sullo stampo originale produrrà una nuova molecola di ssDNA di lunghezza indefinita. I prodotti originati in questo modo fungeranno da stampi per gli oligonucleotidi durante i cicli successivi, e l'estensione di questi oligonucleotidi da parte della Taq polimerasi produrrà molecole di una lunghezza definita, corrispondente a quella del frammento di interesse. In questo modo si svilupperà una reazione a catena che porterà all'accumulo di uno specifico dsDNA, la cui quantità aumenta in maniera esponenziale rispetto al numero di cicli di reazione, che solitamente è di 30-35. Non è consigliabile

amplificare per più di 40 cicli, poiché ad un certo punto l'amplificazione non è più esponenziale ma raggiunge un plateau, dovuto a carenza di oligonucleotidi, di dNTPs, e ad aumento di pirofosfato (PPi). Molti termociclatori possono essere programmati per realizzare amplificazioni nelle quali la temperatura di appaiamento viene ridotta progressivamente durante i cicli di PCR. In questo modo, mantenendo la stringenza dell'ibridazione inizialmente molto alta, si scoraggia la formazione di prodotti aspecifici, consentendo il predominare della sequenza attesa. Questo tipo di approccio viene indicato come *PCR Touchdown*.

Per la nostra popolazione di pazienti e di controllo è stata amplificata l'intera regione codificante, più le zone di splicing e quelle immediatamente fiancheggianti gli esoni del gene SCN5A.

Per il gene SCN5A sono state disegnate 43 coppie di oligonucleotidi. SCN5A è composto da 28 esoni, alcuni dei quali hanno una notevole lunghezza, per questo alcuni di essi (esoni 12, 16, 17 e 28) sono stati divisi in più parti. Inoltre per amplificare l'esone 1 è stato aggiunto glicerolo in concentrazione del 10% (V/V), al fine di aumentare la specificità della reazione.

Elettroforesi su gel di agarosio. Dopo l'amplificazione, i prodotti di PCR sono corsi su gel di agarosio al 2,5% per verificare l'avvenuta amplificazione e la grandezza dell'amplificato. I campioni di DNA vengono preparati aggiungendo un colorante (come il blu di bromofenolo) e corsi insieme ad un marcatore di peso molecolare noto. Perché l'elettroforesi abbia luogo, la corsa deve avvenire in un tampone per consentire la conduzione della corrente e per mantenere costante lo stato di ionizzazione delle molecole da separare, la cui carica cambia con il pH. Il tampone utilizzato è il TBE in concentrazione 1X (0,1M Tris; 0,09M Acido Borico; 1mM EDTA). Grazie alla presenza dei gruppi fosfato il DNA è carico negativamente e migrerà quindi verso il polo positivo.

Per visualizzare le bande del DNA (Figura 6) si utilizza il bromuro di etidio, molecola organica aromatica planare, altamente cancerogena, in grado di intercalarsi tra le basi azotate e di emettere luce arancio se eccitata da radiazione UV con λ compreso tra 254 e 306 nm.

Ricerca di mutazioni mediante dHPLC. La cromatografia liquida ad elevate prestazioni in condizioni denaturanti (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) o dHPLC è una tecnica messa a punto nei laboratori della Stanford University per la rilevazione di mutazioni puntiformi nel DNA.

Nel 1993 Huber e Oefner hanno sviluppato un nuovo tipo di colonna per la cromatografia liquida, capace di separare frammenti di DNA con dimensioni comprese tra 50 e 700 bp in soli 6 minuti. Le tecniche cromatografiche impiegate precedentemente avevano una bassa risoluzione nei

confronti degli acidi nucleici, richiedevano oltre un'ora per la separazione e non erano in grado di correlare i tempi di ritenzione con le dimensioni del frammento. Di fondamentale importanza è che la dHPLC è completamente automatizzata, rapida (3-7 minuti per ciascun campione) e, salvo l'investimento iniziale, ha costi operativi ridotti. Inoltre, con una sensibilità superiore al 97%, è uno strumento d'eccezione per l'individuazione di mutazioni note in una sequenza, ma soprattutto per la ricerca di nuove mutazioni. La dHPLC impiega il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico, che separa le molecole di DNA e le eluisce in base alle loro dimensioni. L'accoppiamento ionico è ottenuto con l'ausilio di un "controione", presente nella fase mobile, ossia una molecola che presenta una doppia polarità (lipofila e idrofila), che è in grado di interagire sia con il campione da analizzare sia con la fase stazionaria (supporto cromatografico con il quale viene impaccata la colonna) facilitando l'interazione e migliorando la risoluzione della separazione. Nella dHPLC il controione è il TEAA (Trietil Ammonio Acetato), molecola che funge da ponte, in quanto attraverso la parte idrofila interagisce con i gruppi fosfato del DNA da analizzare e con la parte lipofila interagisce con la fase stazionaria della colonna cromatografica.

I componenti più importanti di uno strumento per dHPLC sono:

1. un sistema di iniezione del campione;
2. due tamponi differenti che costituiscono la fase mobile (tamponi A e B);
3. una colonna impaccata con il materiale inerte costituito da particelle di polistirene-divinilbenzene (PSDVB), che costituisce la fase stazionaria;
4. un sistema di lavaggio della siringa di iniezione e della colonna cromatografica (tamponi C e D);
5. una pompa ad alta pressione che assicura un flusso costante (0,9 mL/min) attraverso la colonna;
6. un sensore spettrofotometrico di rilevamento del DNA;
7. un collettore delle frazioni eluite;
8. un sistema di controllo ed elaborazione dei dati composto da due software:
 - ✓ il Navigator Operator, che permette di stabilire la comunicazione tra il computer e la strumentazione, fornendo le informazioni relative alla configurazione e allo stato attuale dello strumento;
 - ✓ il Navigator Software, che è il programma che gestisce le condizioni sperimentali di analisi dei frammenti di DNA.

Il frammento di DNA, precedentemente amplificato mediante la reazione di PCR, viene aspirato automaticamente ed iniettato nella colonna. La fase stazionaria della colonna cromatografica è costituita da polimeri non porosi di PSDVB. La misura piccola ed uniforme di queste particelle permette la facile diffusione della fase mobile sulla superficie della colonna. La fase mobile è costituita dalla miscela di due tamponi: il tampone A, costituito da TEAA 0.1 M, ed il tampone B, formato da TEAA 0.1 M + acetonitrile al 25% (V/V). I due tamponi sono miscelati in rapporto 1:1. Durante la corsa cromatografica questo rapporto cambia, in modo tale da raggiungere la concentrazione di acetonitrile che è necessaria per l'eluizione del campione in esame. Infatti le interazioni idrofobiche tra le catene alchiliche di TEAA e la fase stazionaria si modificano con la concentrazione di acetonitrile che, durante la corsa, aumenta, in genere del 2% al minuto. Durante il flusso del campione nella colonna, i gruppi fosfato del DNA interagiscono con le molecole del TEAA. L'acetonitrile compete con questi legami e determina il rilascio del frammento di DNA. Infatti la separazione di diversi frammenti di DNA si basa sulla differente interazione che le molecole di DNA hanno nei confronti della fase stazionaria. La molecola caratterizzata da minor numero di interazioni è eluita più velocemente e via via tutte le altre molecole eluiscono in base alla sempre maggiore interazione, quindi le molecole di lunghezza minore fluiscono per prime. La concentrazione crescente di acetonitrile può separare le molecole a singola elica da quelle a doppia elica. Infatti, il DNA presente come singola elica crea meno interazioni con il TEAA, quindi è eluito per primo; successivamente si separa il DNA parzialmente denaturato, che presenta una densità di carica intermedia tra quella del singolo filamento e quella del filamento a doppia elica; infine, è eluito dalla fase stazionaria il DNA che è ancora sotto forma di doppia elica.

Per monitorare le separazioni ottenute in colonna si usa uno spettrofotometro munito di microcella a flusso, dove l'eluato passa continuamente e viene effettuata la lettura dell'ultravioletto a 260 nm, la lunghezza d'onda alla quale assorbono gli acidi nucleici.

La dHPLC è attualmente utilizzata per la ricerca di sostituzioni nucleotidiche in frammenti di DNA, sfruttando la differente velocità di migrazione sulla colonna cromatografica degli *omoduplex* rispetto agli *eteroduplex*. Quando i frammenti amplificati di DNA sono denaturati a 95°C e lasciati raffreddare, passando da 95°C a 37°C circa in 30 minuti, si ricombinano lentamente e possono formare specie molecolari differenti (Figura 8).

Se il DNA non contiene variazioni di sequenza, nella fase di appaiamento si formano solo *omoduplex*, cioè molecole a doppia elica costituite da due filamenti perfettamente complementari. Invece, una qualsiasi variazione della molecola originale (wild-type) porta alla formazione di un

eteroduplex, che è una combinazione di due filamenti di DNA non perfettamente complementari e che quindi, quando si appaiano, presentano una “bolla” nel sito della variazione di sequenza. La molecola dell'*eteroduplex* è più instabile rispetto all'*omoduplex*, pertanto, ad una determinata temperatura l'*omoduplex* è ancora sotto forma di doppia elica, mentre l'*eteroduplex* mostra una parziale denaturazione in corrispondenza del punto in cui è presente la variazione di sequenza. Questa temperatura è la temperatura di “parziale denaturazione”, ed è specifica per ogni sequenza. All'analisi cromatografica la presenza di una mutazione si evidenzia quando il cromatogramma riporta più di un picco di eluizione. In condizioni ideali potremmo individuare, in presenza di mutazioni, 4 picchi cromatografici: 2 appartenenti ai due *omoduplex* e 2 agli *eteroduplex*. L'*eteroduplex* ha generalmente tempo di eluizione inferiore rispetto a quello dell'*omoduplex* in quanto viene trattenuto meno dalla fase stazionaria (Figura 9).

Ovviamente solo in soggetti eterozigoti si formeranno *eteroduplex*; in un campione omozigote per una variazione di sequenza, non c'è possibilità di formazione diretta degli *eteroduplex*. Quando si prospetta questa eventualità, si miscela il campione di DNA da analizzare con un'uguale quantità di DNA sicuramente normale (generalmente controllato mediante sequenziamento): questo passaggio favorirà la formazione di *eteroduplex* per evidenziare la mutazione.

Per iniziare l'analisi è necessario aver scelto la temperatura di parziale denaturazione ed il gradiente di acetonitrile al quale eseguire la corsa cromatografica. Di solito gli apparecchi di dHPLC sono dotati di un software che stabilisce automaticamente questi parametri dopo aver analizzato la sequenza del frammento in esame. In alternativa, si può usare l'algoritmo consigliato dalla Stanford University, collegandosi al sito <http://insertion.stanford.edu/melt.html>. A volte la corsa eseguita alla temperatura “ideale” dà origine a picchi di eluizione troppo ritardati o troppo anticipati. In questo caso si può manualmente modificare il gradiente di acetonitrile, aumentando o diminuendo la quantità di tampone B all'inizio della corsa. Questa operazione è indicata come “time shift” che può essere negativo o positivo: quello negativo sposta il picco verso sinistra, perchè si aumenta la percentuale di acetonitrile del tampone B e quindi il picco eluisce prima; il time shift positivo, al contrario, sposta il picco a destra diminuendo la concentrazione di acetonitrile e posticipando l'eluizione.

I campioni in studio amplificati sono stati analizzati mediante dHPLC per la ricerca di eventuali mutazioni puntiformi e/o polimorfismi. Prima dell'analisi cromatografia i prodotti di PCR vengono denaturati a 95 °C per 5 minuti e lasciati rinaturare a temperatura ambiente per circa 30 minuti, per favorire la formazione degli *eteroduplex*.

Sequenziamento. Il sequenziamento del DNA è una tecnica di biologia molecolare usata per “leggere” l'ordine in cui sono disposte le basi lungo il DNA. Il principio che sta alla base della tecnica di sequenziamento attualmente impiegata deriva dal sistema ideato da Sanger nel 1977. Tale metodo consiste nell'utilizzo di dideossiribonucleotiditri-fosfato (ddNTP) che vengono incorporati dalla DNA polimerasi nella catena di oligonucleotidi nascente. Poichè i ddNTP non presentano il gruppo OH sul C3' ribosio, necessario per formare il legame con il nucleotide successivo, una volta inseriti sul filamento nascente bloccano la reazione della polimerasi in corrispondenza del ddNTP inserito. A questi dideossiribonucleotidi è inoltre legato un diverso colorante fluorescente, ciascuno caratterizzante la base a cui è coniugato. Il rapporto di concentrazione tra i ddNTP ed i dNTP è tale che l'enzima DNA-polimerasi statisticamente terminerà la catena nascente in tutte le posizioni possibili in cui un dideoossiribonucleotide può essere inserito. Il DNA ottenuto è introdotto nel Cycle sequencing e qui sottoposto ad un'elettroforesi capillare: il campione passa attraverso dei capillari riempiti di polimero capace di separare i diversi frammenti in base alle loro dimensioni, secondo il principio dell'elettroforesi. La fluorescenza dei vari frammenti di DNA marcati è rivelata man mano che questi si spostano lungo il capillare elettroforetico, che è irradiato da un raggio laser. La fluorescenza emessa è letta da un detector e rielaborata sotto forma di picchi cromatografici (elettroferogramma) con la relativa sequenza. I campioni che, precedentemente analizzati al dHPLC, presentavano un profilo di eluizione alterato sono stati sottoposti al sequenziamento automatico utilizzando il sequenziatore automatico ABI3100 (Applied Biosystem). Il sequenziamento rivela l'esatta sequenza nucleotidica del campione di DNA di interesse e di conseguenza eventuali variazioni di sequenza⁹.

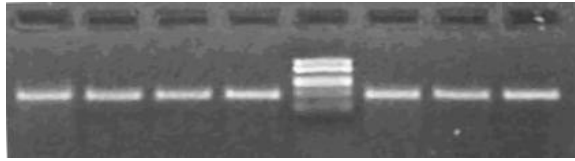


Figura 6: visualizzazione delle bande di DNA marcate con bromuro di etidio

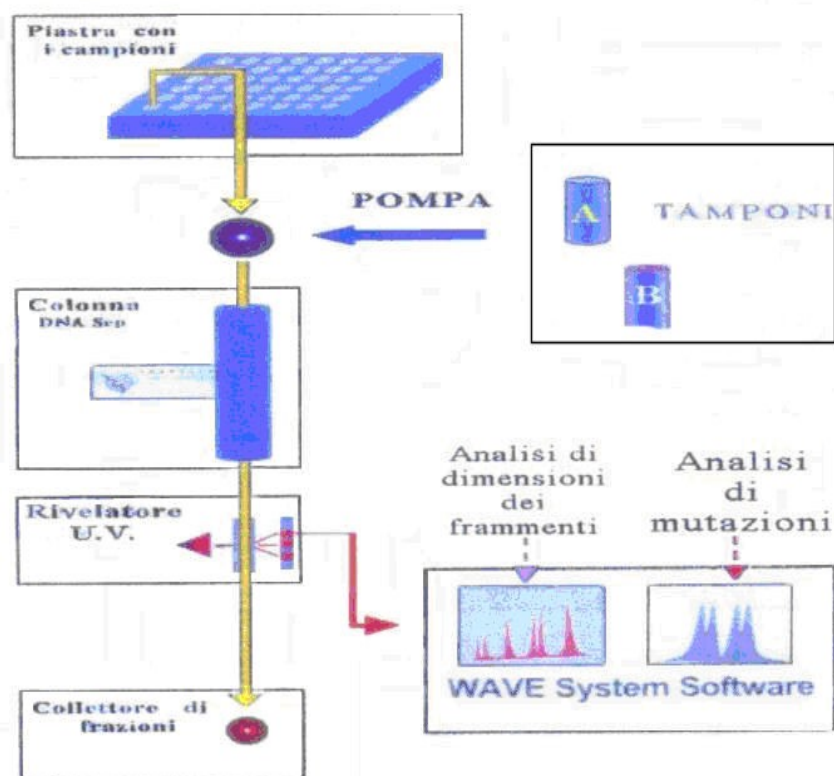


Figura 7: componenti della dHPLC

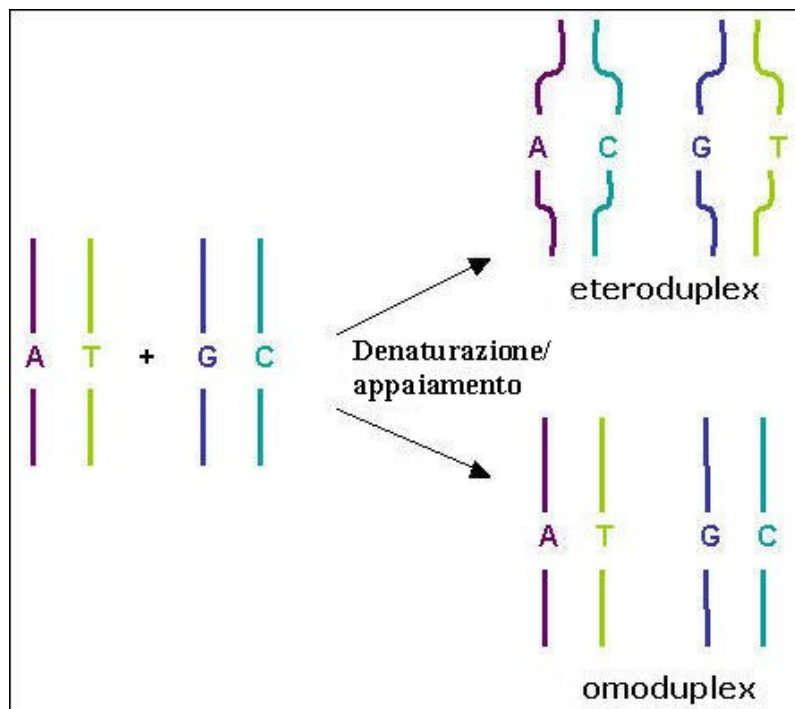


Figura 8: denaturazione ed appaiamento

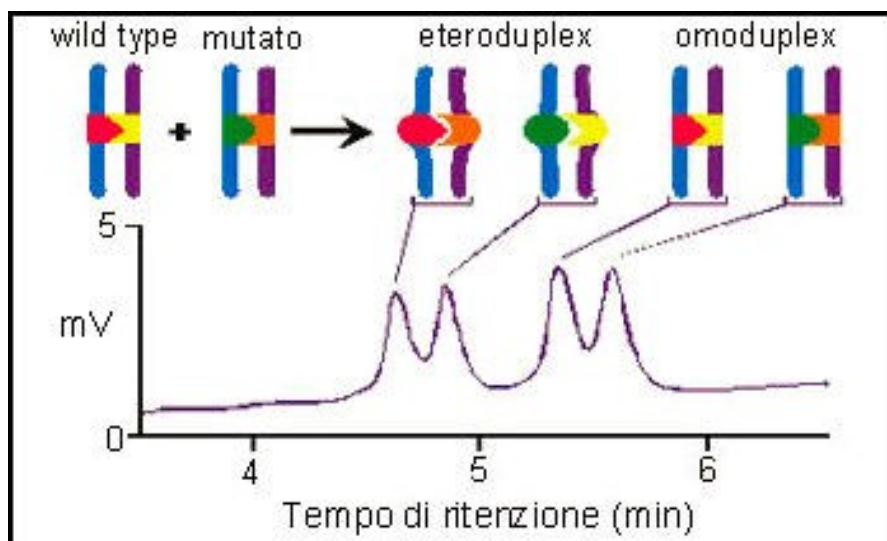


Figura 9: eluizione cromatografia di molecole eteroduplex ed omoduplex

RISULTATI

FASE CLINICA: Tra le famiglie reclutate per lo studio genetico della sindrome di Brugada, come precedentemente anticipato, lo studio della famiglia E ha fornito interessanti spunti di ricerca clinica laboratoristica. Questa famiglia è costituita dal padre, il primo soggetto della famiglia giunto alla nostra osservazione, dai suoi tre figli, dai suoi fratelli e nipoti. Si è eseguita una ricostruzione dell'albero genealogico ponendo particolare attenzione alla storia di morti improvvise in soggetti di giovane età e ad eventi che potessero far sospettare di malattie aritmiche.

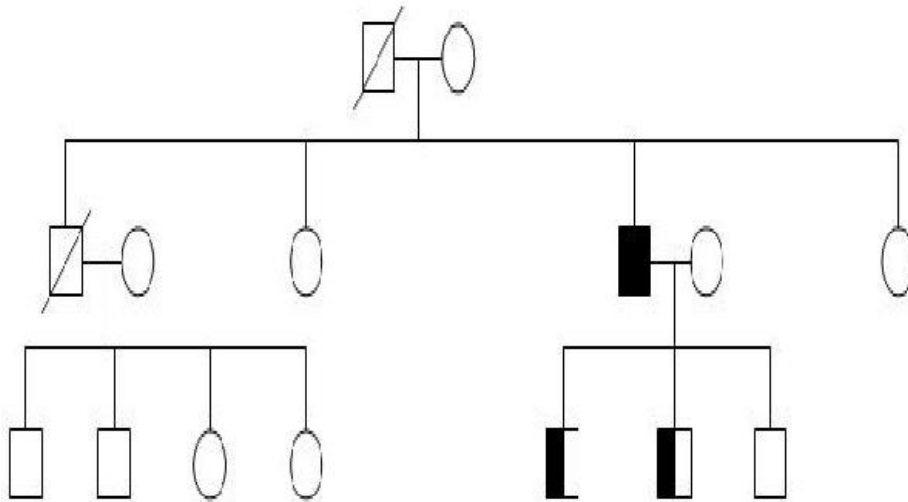


Figura 10: albero genealogico famiglia E (Quadrato=uomo; cerchio=donna; barrato=deceduto; pieno=malato; semipieno=portatore)

L'uomo E.F. attualmente 51enne, iperteso, fumatore, affetto da ernia iatale in trattamento con lanzoprazolo 30 mg, con familiarità per morte cardiaca improvvisa (un fratello). Dal punto di vista laboratoristico nessuna modifica dei valori ematochimici risultava clinicamente significativa. Così anche per l'esame radiografico del torace. L'ecocardiogramma evidenzia normali parametri morfologici con conservata funzione di pompa del ventricolo sn a riposo (frazione d'eiezione: EF=60%). Il paziente giunge alla nostra osservazione con diagnosi di Sindrome di Brugada: mostra un pattern elettrocardiografico a riposo tipo II, morfologia del tratto ST a sella o a tetto a due spioventi nelle derivazioni precordiali destre (figura 12), e positività al test alla fleicanide, con slantizzazione di un pattern elettrocardiografico tipo I. Il paziente ha anche eseguito studio

elettrofisiologico che ha mostrato indicibilità di aritmie ventricolari sostenute ed è stato sottoposto ad impianto di defibrillatore. Dopo aver informato il paziente circa le finalità dello studio e aver raccolto il suo consenso abbiamo prelevato il campione di sangue, sul quale eseguire le appropriate indagini genetiche, e lo abbiamo inviato presso i laboratori del suddetto Dipartimento.

I figli del soggetto con sindrome di Brugada sono stati sottoposti ad ECG, ecocardiogramma ed a prelievo per il test genetico. I tre figli E.E., E.S., E.V. tutti di sesso maschile hanno rispettivamente 15, 23, 11 anni. L'elettrocardiogramma è attualmente non diagnostico di sindrome di Brugada (Figure 13, 14, 15).

Quattro dei nipoti del soggetto affetto sono stati sottoposti anch'essi ad ECG, ecocardiogramma ed a prelievo per test genetico. Costoro in particolare sono i figli del soggetto deceduto per morte cardiaca improvvisa in giovane età (36 anni).

Stratificazione del Rischio ed interventi. Il soggetto E.F. rientra secondo lo schema riportato sopra in classe II b (ECG tipo 2, asintomatico, positività al test alla flecainide con slatentizzazione di un pattern tipo 1, studio elettrofisiologico positivo). Si è così ritenuto opportuno procedere all'impianto di defibrillatore (ICD VDD Biotronik).

Per gli altri due soggetti positivi al test genetico, i figli E.E ed E.S. si attende l'esecuzione del test alla flecainide ed il suo risultato prima di ulteriori decisioni.

Per i soggetti negativi al test genetico si prospetta un periodo di osservazione.

Follow up. Nei soggetti positivi al test genetico è molto importante eseguire uno stretto monitoraggio. Nel soggetto con ICD sia mediante visita e indagini strumentali che interrogando il dispositivo circa possibili attacchi aritmici, sono previsti controlli semestrali.

Per i soggetti portatori di mutazione si prospetta uno stretto monitoraggio qualunque sia l'esito del test alla flecainide. Anzi qualora il test dovesse risultare negativo i controlli dovranno essere frequenti, ma soprattutto si dovrà osservare i pazienti in quelle situazioni comuni che pure agiscono slatentizzando il pattern ECGgrafico, come gli stati febbrili (Shinohara)

Per i soggetti negativi al test genetico che in tal caso presentano chiara familiarità è importante un periodico controllo, soprattutto per l'ultimo figlio E.V., data la giovane età; infatti gli studi dimostrano una particolare distribuzione della frequenza di tale patologia che è più bassa nell'infanzia, subisce un incremento nell'adolescenza e ha il suo picco intorno ai 40 anni, come meglio specificato nella trattazione epidemiologica. E' bene quindi che il figlio E.V. di 11 anni venga seguito accuratamente.

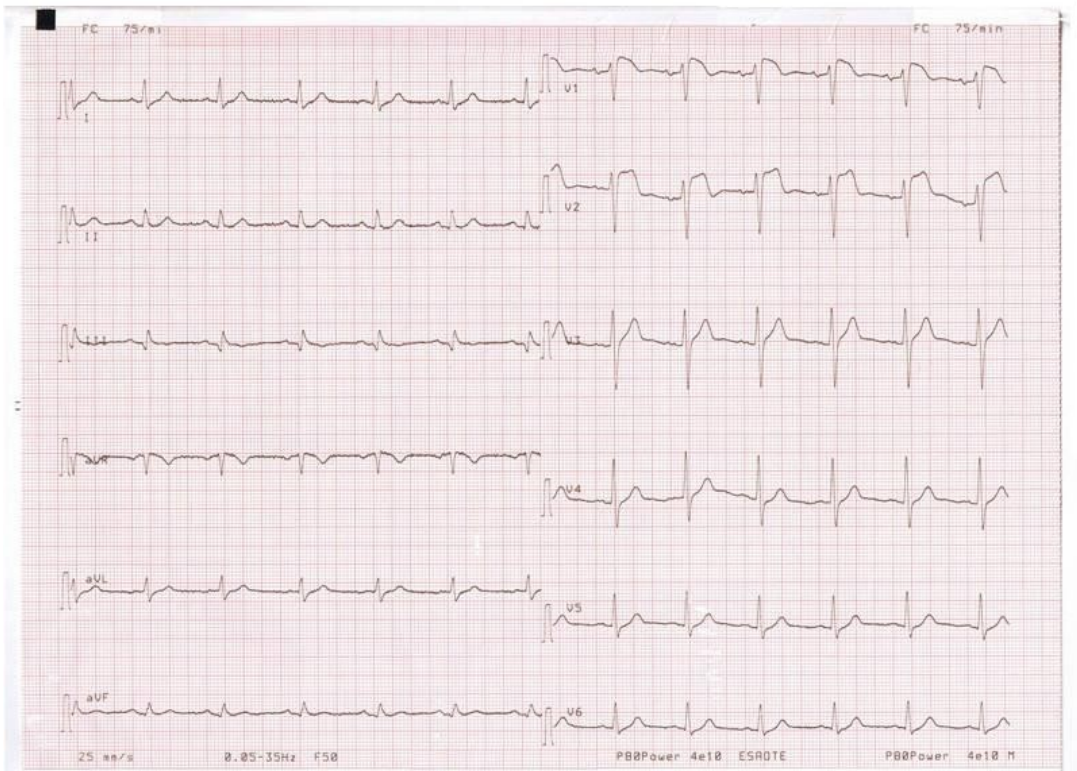


Figura 11: ECG E.F.

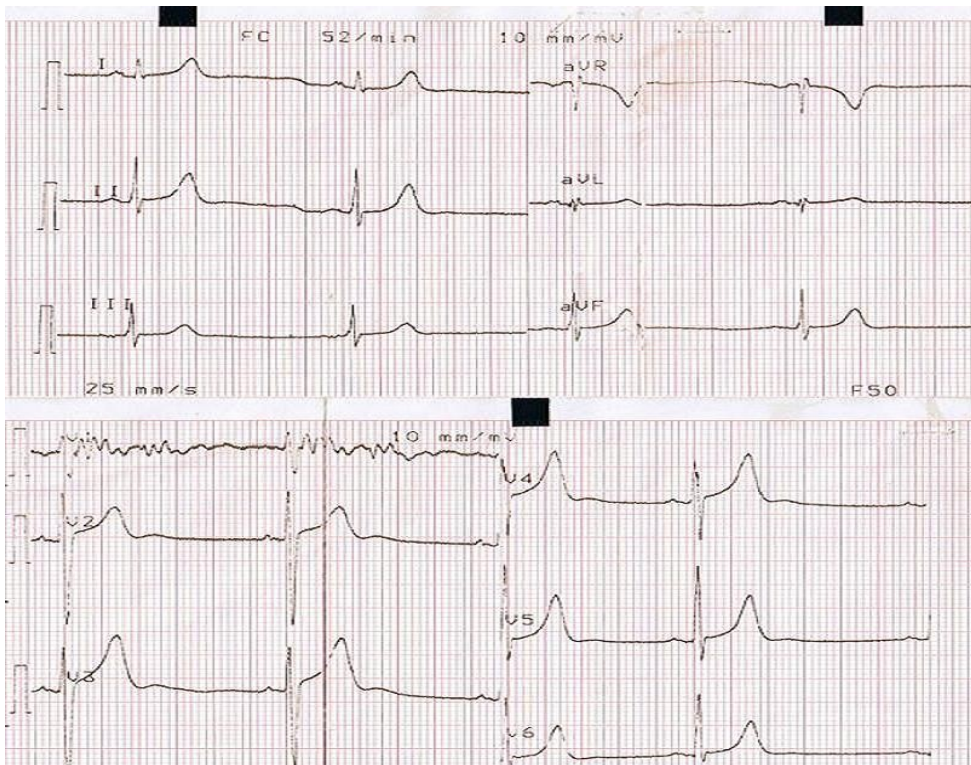


Figura 12: ECG E.E.

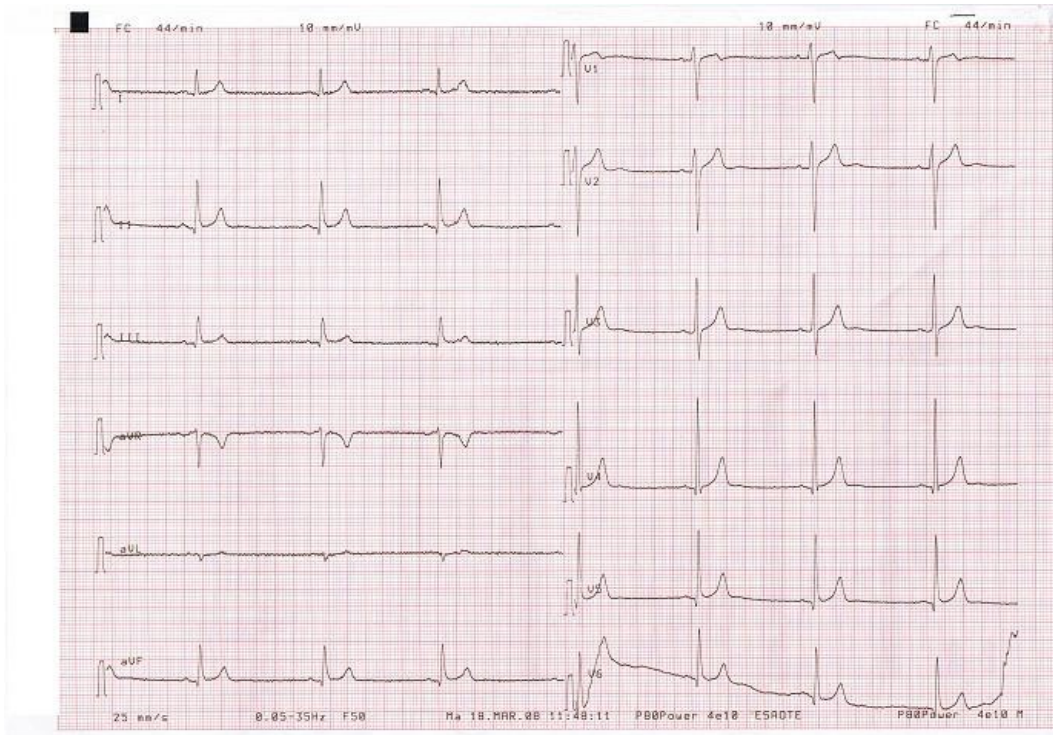


Figura 13: ECG E.S.

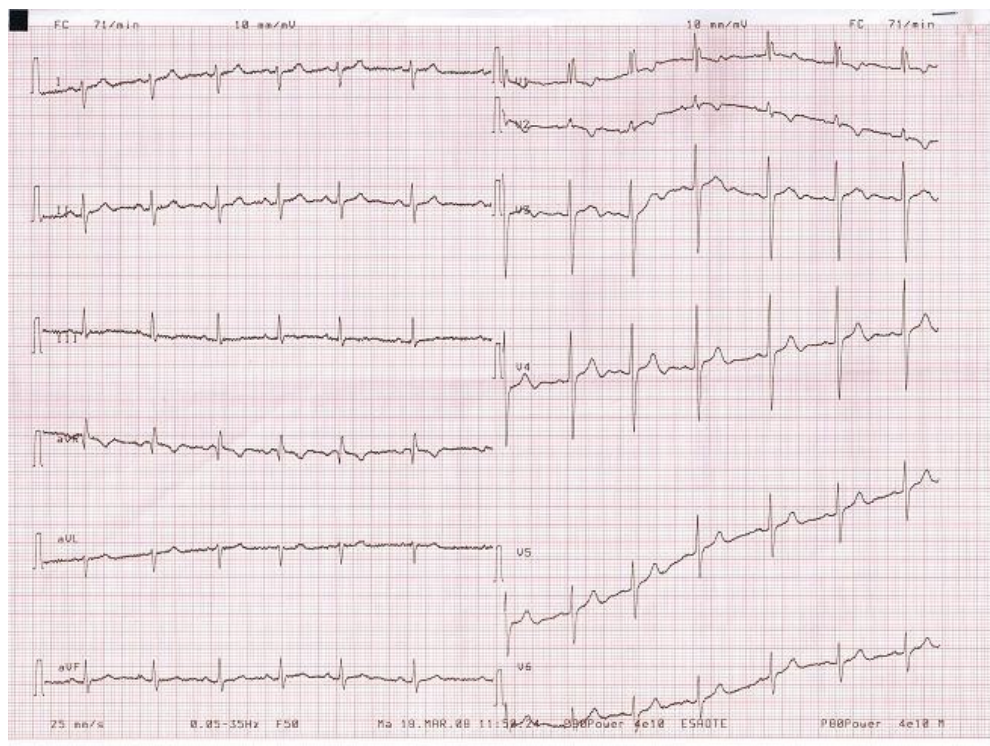


Figura 14: ECG E.V.

ANALISI GENETICHE. I risultati del test genetico sono positivi per E.F. soggetto in cui la patologia era già stata diagnostica e confermata mediante il test alla flecainide. Nel soggetto E.F. è stata riscontrata la presenza di una mutazione non nota in letteratura nel gene SCN5A, G2284A, localizzata in una regione altamente conservata del gene che si traduce nello scambio del 762esimo amminoacido (Treonina in luogo di Alanina) e in una proteina alterata a livello del segmento S2 del dominio D2. Tale mutazione non è stata ritrovata in 270 cromosomi di soggetti sani, pertanto può essere verosimilmente ritenuta causativa di malattia. Sono attualmente incompleti i risultati circa l'effetto della mutazione sulla funzionalità del canale.

Per quanto riguarda i figli il test genetico è risultato positivo sia per E.E. che per E.S. con la stessa mutazione riscontrata nel familiare affetto; mentre è negativa per E.V. nel quale è presente BBD incompleto compatibile con l'età. I tre figli sono in attesa di praticare test alla flecainide.

Per quanto riguarda i nipoti, risultano tutti negativi allo studio genetico per la ricerca della stessa mutazione rispetto al familiare affetto.

Nucleotide Change	Aminoacid Ch'ange	Mutation Type	Region	Phenotype
c.G2284A	A762T	Missense	DII/S2	BrS

Tabella 2: descrizione nuova mutazione riscontrata

CONCLUSIONI

Il nostro lavoro, teso a ricercare la presenza di mutazioni geniche come base etiologica delle cardiomiopatie primitive, in particolare dilatative ed aritmogene, è utile per inquadrare al meglio queste malattie sul piano etiopatogenetico e prognostico per agire quanto prima in modo preventivo appropriato. Nel caso di E.F. l'impianto del defibrillatore permette un adeguato ed immediato trattamento efficace delle eventuali tachiaritmie ventricolari. Attualmente ad un anno di follow up non ci sono episodi di eventi aritmici. L'impianto, però, è quanto mai utile in termini di ricerca per monitorare cosa può accadere in un soggetto con tale mutazione, e quindi chiarire qualcuna delle controversie esistenti per quanto riguarda gli interventi. Infatti sebbene negli ultimi anni ci siano numerosi lavori per il grande interesse suscitato nella comunità scientifica da tale sindrome, non siamo ancora ad un livello di conoscenza tale da determinare scelte terapeutiche univoche. Specificamente, secondo le attuali linee guida un soggetto con le caratteristiche cliniche come il nostro, in classe II b, non ha una netta indicazione all'impianto; i risultati dell'impianto di un defibrillatore in soggetti in classe b hanno fornito risultati discordanti. Il riscontro nel nostro soggetto sottoposto ad impianto e nei suoi familiari di una mutazione non nota, l'impianto del defibrillatore e alla possibilità di monitoraggio a lungo termine del soggetto fornirà forse un ulteriore elemento a favore della terapia con impianto in tali situazioni e soprattutto si potrebbe, qualora ci fossero eventi aritmici trattati dal dispositivo, attribuire ad una mutazione genica un valore prognostico inequivocabile.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Huber C.G., Oefner P.J., Preuss E., High-resolution liquid chromatography of DNA fragment on porous poly (styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:1061-1066;
2. <http://www.fsm.it/cardmoc/>
3. Hermida J.S., Lemoine J.L., Aoun F.B., Prevalence of Brugada syndrome in an apparently healthy population. *Am J Cardiol* 2000; 96:91-94
4. Shimizu W. The Brugada syndrome- an Update- *Internal Medicine* 2005; Vol 44, No 12: 1224-1231;
5. Eckardt L., Kirchhof P., Johna R., Wolff-Parkinson-White syndrome associated with Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2001; 24:1423-1424
6. Antzelevitch C., Brugada R., Fever and Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 2002; 25:1537-1539;
7. Brugada P., Brugada R., Brugada J., Use of the prophylactic implantable cardioverter defibrillator for patients with normal hearts. *Am J Cardiol* 1999; 83:98D-100D;
8. Maron B.J., Towbin J.A., Thiene G., 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;
9. Wilde A.A., Antzelevitch C., Borggrefe M., Study group on molecular basis of arrhythmias of the european society of cardiology. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation* 2002; 106:2514-2519.