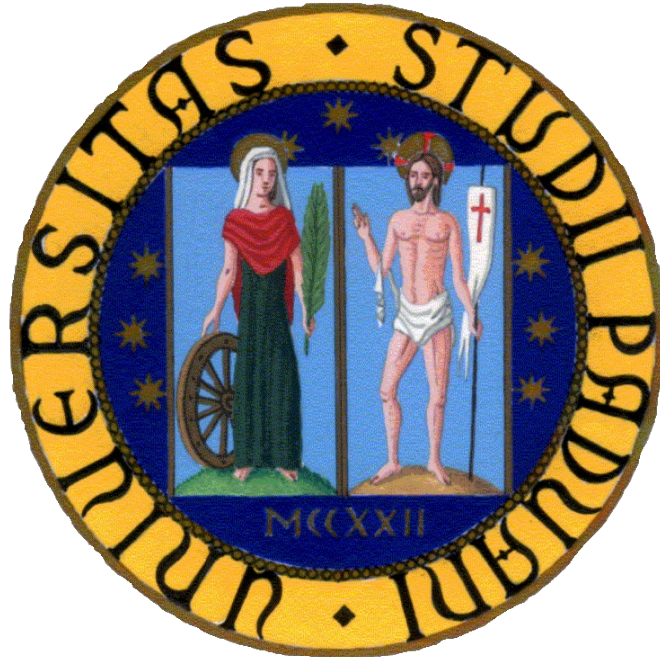


UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTÁ DI SCIENZE MM. FF.NN.
LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOTECNOLOGIE**



ELABORATO DI LAUREA

**RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE NKX 2.5 IN 53
SOGGETTI AFFETTI DA CARDIOPATIE CONGENITE**

Relatore: Dott.ssa ALESSANDRA RAMPAZZO
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa ALESSANDRA LORENZON
Dipartimento di Biologia

Laureando: BRUGIOLO MATTIA

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

INDICE

ABSTRACT	5
-----------------	----------

INTRODUZIONE	7
---------------------	----------

- Cardiopatie congenite	7
- Genetica molecolare delle Cardiopatie congenite	8
- NKX 2.5	10

MATERIALI E METODI	13
---------------------------	-----------

- Estrazione di DNA da globuli bianchi	13
- Amplificazione mediante PCR	14
- Sequenziamento	14
- DHPLC	14
- Tools bioinformatici	16

RISULTATI	19
------------------	-----------

- Progettazione dei primers per amplificazione mediante PCR	19
- Progettazione delle condizioni di amplificazione mediante PCR	19
- Condizioni per l'analisi mediante DHPLC	21
- Risultati ottenuti mediante sequenziamento diretto	22
- Analisi al DHPLC dei frammenti di DNA ottenuti da amplificazione mediante PCR	22
- Risultati del sequenziamento	23

CONCLUSIONE	25
--------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	27
---------------------	-----------

ABSTRACT

Le cardiopatie congenite (CHD) sono un tipo di malattia che presenta un alto tasso di incidenza (tra 4 a 50 su 1000 nati) nella popolazione e che comprende molteplici tipi di malformazioni cardiache.

Sono stati individuati numerosi geni le cui mutazioni sono coinvolte nelle CHD; tali geni codificano per proteine che svolgono funzioni importanti nella morfogenesi cardiaca.

Durante il mio tirocinio ho eseguito lo screening per la ricerca di mutazioni nel gene NKX2.5 in 53 pazienti affetti da varie forme di CHD, mediante DHPLC e sequenziamento diretto. Il gene NKX2.5 codifica per l'omonima proteina che regola la trascrizione di importanti fattori che portano ad una corretta morfogenesi del cuore.

Sono stati identificati numerosi polimorfismi e tre nuove variazioni nucleotidiche (Q181Q, c.334+59C>T, P67L). La variazione missenso P67L porta ad un cambiamento aminoacidico significativo, mentre le altre due apparentemente non alterano la sequenza aminoacidica della proteina.

Come riportato in letteratura, il gene NKX2.5 risulta poco frequentemente coinvolto nella determinazione genetica di CHD.

INTRODUZIONE

– *Cardiopatie congenite*

Le cardiopatie congenite (CHD) sono malattie caratterizzate da malformazioni strutturali di una o più parti del cuore o dei grandi vasi, presenti fin dalla nascita. Esse sono clinicamente eterogenee e vengono classificate a seconda della malformazione riscontrata; le più frequenti sono: il difetto del setto ventricolare, il difetto del setto atriale, la tetralogia di Fallot, il ventricolo destro “double-outlet”, e la trasposizione delle grandi arterie.

Tali malattie hanno un'alta incidenza sulla popolazione, come riportato in Tabella 1 (Hoffman et al., 2002).

<i>CHD</i>	<i>Frequenza</i>
Difetto del setto ventricolare (VSD)	1:280
Difetto del setto atriale (ASD)	1:1062
Tetralogia di Fallot (TOF)	1:2375
Ventricolo destro “double-outlet” (DORV)	1:6369
Trasposizione delle grandi arterie (D-TGA)	1:3175

Tabella 1: incidenza delle più frequenti CHD.

Nonostante l'alta incidenza la mortalità a tutte le età causata da tali malformazioni è molto bassa; le CHD rimangono invece una forte causa di mortalità in età infantile (Engelfriet et al., 2005).

Le cause della malformazione possono essere diverse, infatti si sono riscontrate CHD legate ad anomalie cromosomiche quali la trisomia 21, trisomia 18 e la sindrome di Turner (Pierpont et al., 2007); mentre altri tipi di CHD sono causate da mutazioni in un singolo gene o mutazioni in più geni contemporaneamente (Pierpont et al., 2007); una piccola percentuale di CHD sono inoltre da ricondurre a cause ambientali (farmaci, alcol, malattie) che influenzano lo sviluppo fetale durante la gravidanza (Tikkanen et al., 1990).

– *Cardiopatie congenite comuni*

Difetto del setto ventricolare (VSD)

Il VSD è la forma di CHD più frequente, e si presenta spesso associata a forme più complesse di CHD (Hoffman et al., 1995).

La malformazione del setto interventricolare, è riscontrabile come un foro che mette in comunicazione i due ventricoli; tale difetto diventa emodinamicamente significativo intorno alle 5 settimane di vita e viene solitamente chiuso chirurgicamente (Wernovsky et al., 2004).

Difetto del setto atriale (ASD)

L'ASD è un'altra frequente forma di CHD, che presenta numerose similitudini con il VSD, anch'essa infatti è riscontrabile come un foro, ma nel setto interatriale. Gli affetti da tale cardiopatia se non curati chirurgicamente (di solito entro i primi 4 anni di vita) hanno un'aspettativa di vita di soli 45 anni (Wernovsky et al., 2004).

Tetralogia di Fallot (TOF)

La TOF è una cardiopatia congenita relativamente poco frequente. Essa presenta caratteristicamente 4 difetti anatomici: VSD, origine biventricolare dell'aorta (quest'ultima va infatti a trovarsi a livello della VSD), ipertrofia del ventricolo destro e stenosi della valvola polmonare. La malformazione dev'essere curata chirurgicamente nelle prime settimane di vita (Schoen, 2000).

Ventricolo destro "double-outlet" (DORV)

La DORV è una forma di CHD poco frequente. Comunemente in essa si riscontra che entrambe le arterie principali partono dal ventricolo destro; inoltre essa si presenta normalmente in compresenza con altre CHD. Attualmente si interviene chirurgicamente (Gruber et al., 2004).

Trasposizione delle grandi arterie (D-TGA)

La TGA è una forma grave di CHD. Negli affetti si riscontra che al contrario della normale morfologia cardiaca, l'aorta arriva al ventricolo destro mentre l'arteria polmonare arriva al ventricolo sinistro (Gruber et al., 2004). Gli affetti da D-TGA devono presentare una comunicazione tra i due ventricoli per poter sopravvivere, ed infatti spesso essi presentano altre malformazioni quali il VSD (Kirby et al., 2002).

– Genetica molecolare delle CHD

Le forme ereditarie di CHD presentano una grande eterogeneità genetica, questo anche a causa del fatto che sotto tale nome sono comprese numerose e varie malformazioni cardiache. Esse possono essere causate da vari fattori quali difetti o mutazioni cromosomici, mutazioni in un solo gene o più geni contemporaneamente.

Attualmente numerosi geni sono coinvolti nella determinazione di CHD, alcuni di esse mostrano trasmissione familiare della malattia di tipo mendeliano (Pierpont et al., 2007).

In tabella 2 sono stati riportati alcuni geni che se mutati causano alcune delle più frequenti CHD (Gruber et al., 2004).

<i>Gene</i>	<i>Patologia</i>	<i>Reference</i>
Cited2	ASD, VSD, DORV	Bamforth et al. 2001
Tbx5	ASD, VSD, TOF	Basson et al. 1999
Fgf8	DORV, ASD, VSD	Ilagan et al., 2006; Abu-Issa et al., 2002
GATA4	ASD, VSD	Reamon-Buettner et al., 2007
NKX2.5	ASD, VSD, TOF	McElhinney et al., 2003; Reamon-Buettner et al., 2004;

Tabella 2: geni e malattie ad esse correlati.

Cited2

Cited2 è un gene molto importante nello sviluppo embrionale dell'organismo; la sua espressione è mediata da alcune citochine.

La proteina è costituita di tre regioni: CR1, CR2, CR3. Si conosce solo la funzione di CR2, che risulta necessaria per il legame con p300/CBP (Bhattacharya et al., 1999). Questo legame è fondamentale per l'attivazione del fattore di trascrizione AP2 che a sua volta determina l'espressione del gene AP-2RE (gene anti-apoptotico). E' stato dimostrato che la mancanza di questo legame causa malformazioni cardiache (Bamforth et al. 2001).

Fgf8

FGF8 fa parte della famiglia dei fattori di crescita extracellulari dei fibroblasti; esso ha un ampio spettro di effetti cellulari a seconda del contesto di morfogenesi. All'interno del cuore esso è fondamentale per la formazione dell'asse sinistra-destra (Albertson and Yelick, 2005; Meyers and Martin, 1999). Topi knockout per il gene Fgf8, hanno presentato vari tipi di CHD (Ilagan et al., 2006; Abu-Issa et al., 2002).

Gata4

GATA4 è un fattore di trascrizione facente parte della famiglia zinc-finger, esso è molto espresso nel cuore ed è essenziale per il suo sviluppo.

Alcune ricerche hanno evidenziato che mutazioni in GATA4 causano CHD (Reamon-Buettner et al., 2007; Rothrock et al., 2003); qualcuna di queste mutazioni determinano una diminuzione dell'affinità del legame di GATA4 con TBX5 e NKX2.5, legame fondamentale perché la trascrizione di alcuni geni viene attivata sinergicamente da Gata4 e Nkx2.5 o Tbx5 (Rothrock et al., 2003) .

Tbx5

Il gene TBX5 codifica una proteina che fa parte della famiglia di fattori di trascrizione contenenti una caratteristica sequenza di circa 180 aminoacidi altamente conservata detta T-box. Mutazioni nella sua sequenza nucleotidica sono state individuate come cause di CHD, per lo più come ASD, VSD, TOF e anche la

sindrome di Holt-Oram (una CHD complessa) (Basson et al. 1999). Tali mutazioni patogene sono state riscontrate per lo più all'interno della sequenza T-box del gene, dando come risultato la formazione di proteine tronche; tali proteine anomale non sono in grado di attivare la trascrizione dei geni ad esse legate dando così origine a malformazioni cardiache (Basson et al. 1999).

- *Nkx2.5*

La proteina codificata dal gene NKX2.5 fa parte della famiglia dei fattori di trascrizione contenenti un homeodomain e più specificamente della sotto famiglia NK-2 (Lints et al., 1993). Essa svolge una funzione fondamentale nello sviluppo del cuore, attivando la trascrizione di numerosi geni che portano ad una corretta morfogenesi cardiaca (Akazawa et al., 2005).

Il gene NKX2.5 consta di soli due esoni e codifica per una proteina di 324 aminoacidi. Esso è localizzato sul cromosoma 5 in posizione 5q34.

La proteina è costituita da tre regioni conservate (Harvey, 1996; Akcaboy et al., 2007):

- il dominio TN, con funzione sconosciuta;
- l'homeodomain, che media interazioni proteina-proteina nella dimerizzazione e lega il DNA;
- il dominio NK2, repressore trascrizionale e nell'interazioni con altre proteine.

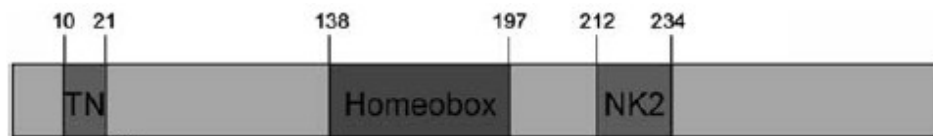


Figura1: posizione nella proteina Nkx2.5 dei domini conservati (Akcaboy et al., 2007).

Numerosi studi dimostrano il legame tra mutazioni missenso in Nkx2.5 e alcune forme di CHD (McElhinney et al., 2003; Reamon-Buettner et al., 2004; Zhu et al., 2000). Modelli animali quali topi knockout dimostrano come la mancanza della proteina Nkx2.5 risulti letale già durante lo sviluppo embrionale (Lyons et al., 1995; Tanaka et al., 1999; Biben et al., 2000).

Nella maggior parte dei casi le mutazioni patogene sono state individuate nell'homeodomain (vedi Figura 2) ed esse alterano la capacità della proteina di legarsi alle sequenze di DNA che normalmente attiva. Tali mutazioni probabilmente alterano anche la capacità di legare le proteine che coadiuvano l'azione di Nkx2.5, TBX5 e GATA4 (Weidong Zhu et al., 2000; Lien et al., 1999; Akazawa et al., 2005).

Si sono però anche rilevate mutazioni, quali Gln198Ter, che aumentano l'attività di Nkx2.5, che causano comunque CHD; questo perchè alcune delle proteine controllate da Nkx2.5 se espresse in eccesso possono portare ad apoptosi (Zhu et al., 2000).

Non sono tuttavia ancora completamente chiare tutte le vie che portano allo svilupparsi di particolari CHD in presenza di determinate mutazioni.

Nel corso del mio tirocinio sono state ricercate mutazioni patogene nel gene NKX2.5 in 53 pazienti affetti da varie forme di CHD.

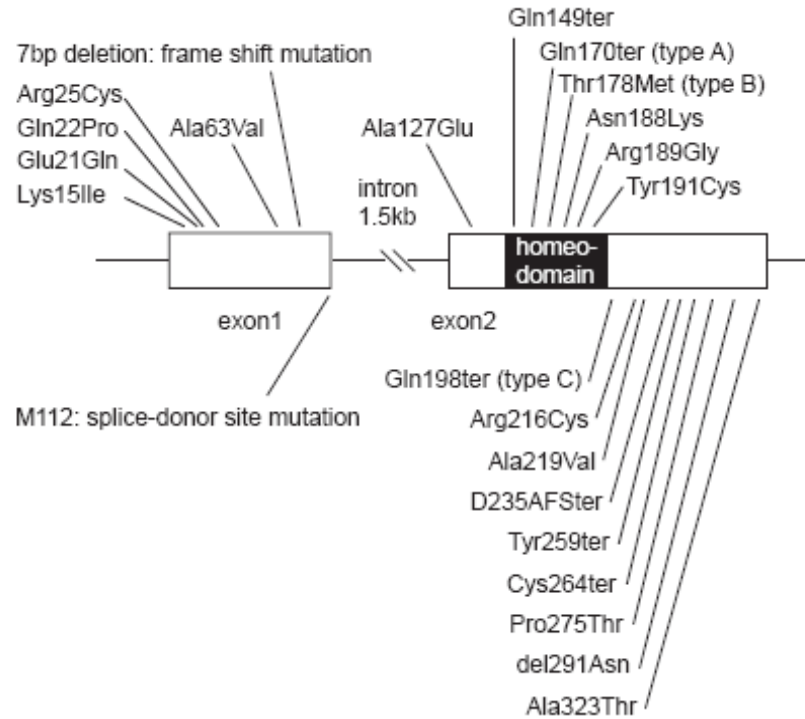


Figura 2: Rappresentazione schematica del gene NKX2.5 e alcune mutazioni riscontrate (Akazawa et al., 2005).

MATERIALI E METODI

In seguito all'estrazione del DNA di 53 pazienti affetti da CHD, previo consenso informato, si è proceduto all'analisi molecolare dei due esoni del gene NKX2.5 mediante DHPLC e sequenziamento diretto.

– Estrazione di DNA da globuli bianchi

I globuli bianchi sono stati isolati da sangue intero mediante separazione in gradiente di Ficoll presso l'istituto di anatomia patologica dell'Università di Padova. L'estrazione del DNA da globuli bianchi è stata fatta con il metodo del "salting out" (Miller et al., 1988), ottimizzato dal Dott. M. Rosa del Laboratorio di Genetica Umana Molecolare. Questo metodo si basa sul principio chimico-fisico per cui ad elevate concentrazioni di sali si determina un abbassamento della solubilità delle macromolecole.

I campioni sono stati inizialmente centrifugati per 15 minuti a 12000 rpm, in modo da far riprecipitare i globuli bianchi; quindi il surnatante è stato eliminato e si è risospeso il pellet in circa 1.5 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%); i campioni sono stati poi centrifugati nuovamente a 12000rpm per 15 minuti. Ancora una volta è stato eliminato il surnatante ed il pellet è stato risospeso in 4 ml di TEN (TrisHCl 10 mM; EDTA 2 mM, pH 8; NaCl 400 mM), un tampone di lisi necessario a rompere la membrana dei globuli bianchi. Alla miscela sono stati aggiunti 600 µl di SDS 10% e i campioni sono stati incubati a 80°C, per 3 ore.

Al termine dell'incubazione ai campioni è stato aggiunto 1 ml di NaCl saturo, così da favorire la precipitazione delle proteine. Dopo una centrifugata a 6000 rpm per 10 minuti, il surnatante è stato trasferito in una Sterilin da 15 ml e ad esso è stato aggiunto un volume di isopropanolo. Una delicata agitazione ha permesso la formazione del "flocculo", costituito dal DNA estratto condensato. Quindi i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione a 6000 rpm per 20 minuti. Il surnatante così ottenuto è stato eliminato mentre il pellet è stato lavato dai residui di isopropanolo con 2 ml di EtOH 70%.

E' stata effettuata un'ultima centrifugata a 4000 rpm per 10 minuti, dopo la quale il pellet è stato fatto asciugare.

Una volta asciutto, il pellet è stato risospeso in circa 300 µl di TE autoclavato (TrisHCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM).

Una volta completata l'estrazione si procede ad un'analisi quantitativa del DNA, su gel di agarosio allo 0,8%. Ciò permette di osservare la qualità del DNA, che deve mostrarsi come un insieme di bande ad alto peso molecolare, senza eventuali smears o bande a più basso peso molecolare, proprie di un DNA degradato.

– Amplificazione mediante PCR

Per ognuno dei 53 pazienti più un controllo negativo e un controllo positivo (contenente il DNA di un soggetto sano utilizzabile come riferimento nell'analisi

al DHPLC) si è proceduto ad amplificazione dei frammenti genici tramite PCR. Questa tecnica consente di amplificare, rapidamente e selettivamente, in vitro, sequenze specifiche di DNA genomico. Per l'esone 1 sono stati utilizzati primers intronici, permettendo in questo modo l'analisi dei siti accettori e donatori di splicing. L'esone 2 è stato suddiviso in tre frammenti e i primers sono stati disegnati in modo che essi avessero sequenze parzialmente sovrapponibili. Questo garantisce di riuscire ad analizzare tutto l'esone.

I protocolli di amplificazione sono riportati in tabella 5.

– *Sequenziamento*

Il sequenziamento è stato effettuato con un sequenziatore automatico ABI PRISM 3730XL a 96 capillari (Applied Biosystems), presso il BMR-Genomics (Padova). La successiva analisi degli elettroferogrammi è stata effettuata via software tramite SeqManII (DNASTAR).

Prima del sequenziamento gli amplificati sono purificati con un kit apposito ("PCR Product Pre-Sequencing Kit", Amersham Pharmacia Biotech), composto da una fosfatasi alcalina (SAP) e un esonucleasi (EXO I), in grado di degradare rispettivamente i dNTPs e i primers rimasti nel prodotto di PCR. Ogni campione di DNA da purificare richiede l'utilizzo di 0.5µl di SAP e 0.5 µl di EXO I. Si effettua quindi un ciclo di attivazione (37° C per 15 minuti) e inattivazione (80° C per 15 minuti) dei due enzimi. Al termine viene aggiunto 1 µl del primer impiegato per il sequenziamento ed il tutto viene disidratato a 70°C per circa 20 minuti.

– *DHPLC*

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) è un sistema cromatografico liquido ad accoppiamento ionico in fase inversa, che può essere utilizzato per lo screening di mutazioni a livello di DNA, permettendo l'analisi di frammenti di varia lunghezza, tra 100 e 700 bp; esso per mutazioni puntiformi presenta una sensibilità del 97% circa (Xiao et al., 2001).

La fase mobile, polare, è costituita di una miscela di H₂O, TEAA ed acetonitrile (ACN), in grado di competere per la carica positiva del controione; il rapporto tra i due buffer, A (0.1M TEAA; pH 7.0) e B (0.1M TEAA; pH 7.0; 25% ACN) è usato per creare il gradiente di eluizione. Tale gradiente è comunque suggerito dal NAVIGATOR™SOFTWARE a seconda della sequenza nucleotidica del frammento di DNA da analizzare.

La fase stazionaria è fatta di una matrice non porosa idrofobica costituita dal copolimero polistirene-divinilbenzene, alle cui sfere sono associati in maniera covalente molecole di octadecilsilano (C₁₈).

L'adesione del DNA alla matrice è mediata dalla presenza di TEAA (trimetilammonioacetato), un controione, la cui testa positiva va ad interagire con i gruppi fosfato, negativi, presenti sul DNA, mentre la coda idrofobica è in grado di interagire con l'octadecilsilano della colonna.

La quantità stabilita di prodotto di PCR viene iniettata nel sistema, quindi il DNA va inizialmente a legarsi, grazie alla propria carica negativa, dovuta ai gruppi fosfato, alla fase stazionaria.

L'eluizione avviene grazie all'aumento della concentrazione di acetonitrile, nella fase mobile. L'acetonitrile, essendo più affine al DNA rispetto al controione, ne favorisce il distacco dalla matrice.

Condizione essenziale per la corsa DHPLC è il mantenimento di una temperatura costante di "quasi-denaturazione", in grado di mantenere circa il 75% dell'amplificato da analizzare nella condizione di dsDNA e il 25% a ssDNA; tale temperatura dovrà essere ottimizzata per ogni target, tenendo conto della diversa composizione in basi dei vari frammenti, della loro diversa lunghezza e della presenza di domini di melting differenti.

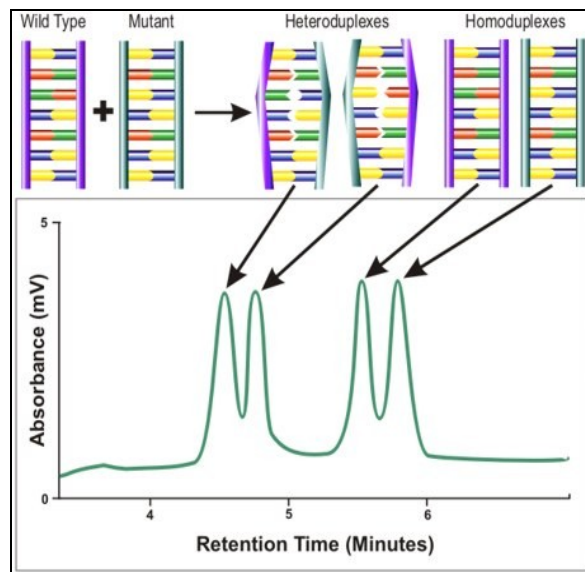


Figura 3: formazione di molecole omoduplex ed eteroduplex in seguito a denaturazione di un campione in cui è presente una variazione nucleotidica in eterozigosi. Sotto invece è rappresentato il cromatogramma in cui sono rappresentati i picchi dati dalle diverse molecole che si sono originate (immagine disponibile al sito <http://www.transgenomic.com>).

Il funzionamento del DHPLC si basa sulla diversa affinità alla fase stazionaria, e quindi velocità di eluizione, tra omoduplex ed eteroduplex. Queste specie vengono ottenute tramite una denaturazione dei prodotti di PCR, ottenuti tramite PCR, (95°C per 5 minuti), e successiva rinaturazione a temperatura ambiente. Se una variazione è presente in eterozigosi, la PCR avrà generato due popolazioni di frammenti: una contenente una variazione (SNP o mutazione), ed un'altra avente sequenza wild-type. La denaturazione seguita da riannealing casuale porterà quindi alla formazione di omoduplex (riappaiamento tra frammenti perfettamente complementari) ed eteroduplex (appaiamento tra frammenti non perfettamente complementari). Analizzando la miscela delle due specie alla temperatura di quasi denaturazione, gli eteroduplex formano una "bolla di denaturazione" a livello dell'appaiamento scorretto. Essendo più denaturati, avranno quindi un minore livello d'interazione con la matrice, e verranno eluiti a concentrazioni minori di acetonitrile rispetto agli omoduplex.

L'eluato attraversa una microcella a flusso dello spettrofotometro correlato allo strumento, il quale, misurando l'assorbanza a 260 nm, stabilisce la quantità di DNA in uscita in ogni istante. Una successiva analisi computerizzata riporterà i valori ottenuti in un cromatogramma.

Il pattern cromatografico che si ottiene dal controllo positivo si presenta normalmente come un solo picco, netto e stretto. Eventuali anomalie nella forma o presenza di un maggior numero dei picchi sono indicativi di variazioni in eterozigosi.

Per quei campioni che danno un profilo di eluizione diverso rispetto a quello di un controllo, si è proceduto con il sequenziamento dell'amplificato, per identificare la variazione presente.

E' molto importante valutare, come detto in precedenza, la temperatura di quasi-denaturazione che è strettamente correlata alla composizione in basi dei frammenti in esame. Un'analisi accurata può implicare la necessità (per alcune sequenze) di letture a diverse temperature, nel caso di presenza di diversi domini di melting.

Proprio per le caratteristiche del DHPLC in presenza di sequenze con ripetizioni mononucleotidiche, o nel caso di presenza di domini di melting che richiedano temperature troppo diverse, l'analisi diventa passibile di errore, ed è necessario procedere tramite sequenziamento diretto.

Altro limite del DHPLC è l'incapacità di individuare le variazioni presenti in omozigosi. Per individuare tuttavia eventuali mutazioni in omozigosi sarà necessario aggiungere al prodotto di PCR in analisi una quantità analoga di DNA wild-type, consentendo in questo modo la formazione di eteroduplex.

- *Tools bioinformatici e database*

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) - è il più diffuso programma di allineamento locale delle sequenze: esso si basa sull'algoritmo sviluppato da Altschul e collaboratori e sull'assunto che in sequenze omologhe - anche notevolmente divergenti - possono essere individuate regioni che mostrano una similarità statisticamente significativa. Nel confronto tra sequenze nucleotidiche sono attribuiti un punteggio positivo alle identità ed uno negativo alle non identità. Invece, per confrontare sequenze proteiche, sono adottate le matrici di punteggi PAM o BLOSUM.

Chromas - è un programma che permette la visualizzazione degli elettroferogrammi derivati dai sequenziatori automatici Applied Biosystems.

dbSNP - è una banca dati di SNPs, in cui si possono effettuare ricerche per SNPs noti, ottenendo per questi informazioni sulle loro eterozigosità e frequenza allelica.

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

Primer3 - è un programma che permette, inserendo la sequenza di interesse, di disegnare coppie di primers specifici con le caratteristiche scelte di volta in volta dall'operatore. Inoltre il programma crea la coppia di primers in modo che abbiano

caratteristiche ottimali per l'amplificazione tramite PCR. Inoltre l'operatore può selezionare svariate opzioni quali: la lunghezza della sequenza da amplificare, eventuali regioni da escludere, l'area da amplificare ed altre.

<http://frodo.wi.mit.edu>

Pubmed - è un database contenente articoli pubblicati su giornali di divulgazione ad interesse medico, veterinario o biologico. Offre gratuitamente l'abstract, oltre ai link per avere accesso agli articoli interi (gratuiti o a pagamento).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

Seqman II - è un'applicazione che permette l'analisi degli elettroferogrammi derivanti dal sequenziamento. Permette la creazione di un contiguo tra le sequenze ottenute, le sequenze consenso dell'amplificato e dell'esone.

UCSC Human Genome Browser - è un database sviluppato dalla UCSC Genome Bioinformatics, che consente di ottenere informazione su intere regioni genomiche, su geni noti e predetti, con suddivisione introni/esoni, UTR, isole CpG, siti di restrizione, ORF, isoforme e su mRNA.

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

RISULTATI

In questo tirocinio si è proceduto con l'analisi per la ricerca di mutazioni, in 53 pazienti affetti da CHD, nel gene NKX2.5. Si è proceduto tramite sequenziamento diretto e mediante DHPLC.

- Progettazione dei primers per amplificazione mediante PCR

Per effettuare lo screening dei pazienti, per la ricerca di mutazioni mediante DHPLC, il gene NKX2.5 è stato suddiviso in vari frammenti: il primo che comprende sia la parte codificante che non codificante dell'esone 1. Il secondo esone è stato, invece suddiviso in tre amplificati: il frammento 2A, il frammento 2B ed il frammento 2CD.

Per l'amplificazione dei frammenti tramite PCR sono stati progettati appositamente i corrispettivi primers usando Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Le sequenze dei primers scelti sono riportate in tabella 3.

<i>Frammento</i>	<i>Sequenza del primer F e R</i>	<i>Lunghezza amplificato (bp)</i>
1	F: actgctcatcgctcctgtca R: cggcatttcctctgaacctc	768
2A	F: tccacgaggatcccttacca R: ATAGGCGGGGTAGGCGTTAT	527
2B	F: CAGAACCGGCGCTACAAGT R: GGACACTCCCGAGTTGCTCT	390
2CD	F: CCGCCAACAACA ACTTCGT R: ggaatgcctgtgcctgagat	671

Tabella 3: Primers e lunghezza dei rispettivi amplificati.

- Progettazione delle condizioni di amplificazione mediante PCR

Una volta progettati i primers si è ricercata la temperatura ottimale di annealing per l'amplificazione di ciascun frammento.

Questo avviene operando varie PCR di prova, variando di volta in volta la temperatura di annealing, da 58°C a 70°C ed utilizzando come stampo DNA genomico di soggetti appartenenti alla popolazione di controllo.

Per tutte le amplificazioni è stata usata la GoTaq[®] Polymerase (Promega).

La miscela per la reazione per ogni singolo campione è riportata in tabella 4.

<i>Reagenti</i>	<i>Quantità per 12.5 µl</i>	<i>Quantità per 25 µl</i>
DNA [2,5 µg/µl]	2 µl	2 µl
H2O	4.44 µl	10,875 µl
Buffer 5X	2.5 µl	5 µl
dNTPs [1mM]	2.5 µl	5 µl
GoTaq [5 u/µl]	0.06 µl	0,125 µl
Primer F [10pmoli]	0.5 µl	1 µl
Prime R [10pmoli]	0.5 µl	1 µl

Tabella 4: miscela per la reazione per singolo campione in 12.5 e 25 µl totali.

Nel caso i campioni fossero da analizzare al DHPLC la miscela era fatta in un totale di 25 µl, per avere abbastanza amplificato per analisi a più temperature; invece i campioni da sequenziare sono stati amplificati in una miscela di 12.5 µl. Il programma di amplificazione, con le temperature di annealing ottimizzate è riportato nella tabella 5.

<i>Ciclo</i>	<i>T [°C]</i>	<i>Tempo</i>
Hot start	95	2'00"
Denaturazione	95	30"
Annealing	65	30"
Estensione	72	t*
Estensione finale	72	10'00"
Blocco della reazione	4	10'00"

} 37 cicli

Tabella 5: programma di amplificazione per i frammenti; t* = 45" pr i frammenti 2A e 2B; t* = 1'30" per i frammenti 1 e 2CD.

E' stata poi testata l'avvenuta amplificazione con PCR, tramite elettroforesi in gel d'agarosio all'1,5% con aggiunta di etidio bromuro per rendere visibile il DNA agli UV, effettuando inoltre la corsa insieme ad un marker di peso molecolare con risoluzione di 100bp DNA Ladder, Invitrogen.

– **Condizioni per l'analisi mediante DHPLC**

Messe a punto le condizioni di amplificazione si è proceduto con l'individuazione della temperatura di “quasi denaturazione” per l'analisi in DHPLC dei frammenti analizzabili.

Per trovare tale temperatura basta selezionare l'opzione DNA, del NAVIGATOR™SOFTWARE, che gestisce lo strumento, il quale individuerà la temperatura ottimale, sulla base della sequenza dell'amplificato. Inoltre il software fornisce un grafico nel quale sono identificabili i domini di denaturazione ed un altro grafico che visualizza la percentuale di doppia elica in ogni porzione dell'amplificato, alla temperatura prescelta.

In quest'ultima finestra si possono inoltre inserire valori di temperatura diversi da quella consigliata, verificando così i relativi cambiamenti nei grafici.

Esempi di tali grafici sono riportati in Figura 3.

Esaminando le curve di denaturazione dei frammenti da analizzare si è visto che presentavano più di un dominio di denaturazione. Come consigliato in letteratura (Xiao et al., 2001) e come già sperimentato nel laboratorio dove è stato condotto il tirocinio, si è deciso di scegliere diverse temperature di analisi, adeguate alle caratteristiche dei domini di denaturazione.

In alcuni casi si è anche dovuto utilizzare l'opzione “*time shift*” per aumentare il tempo di ritenzione in colonna del frammento in analisi ed ottenere così un picco di eluizione ben distinto.

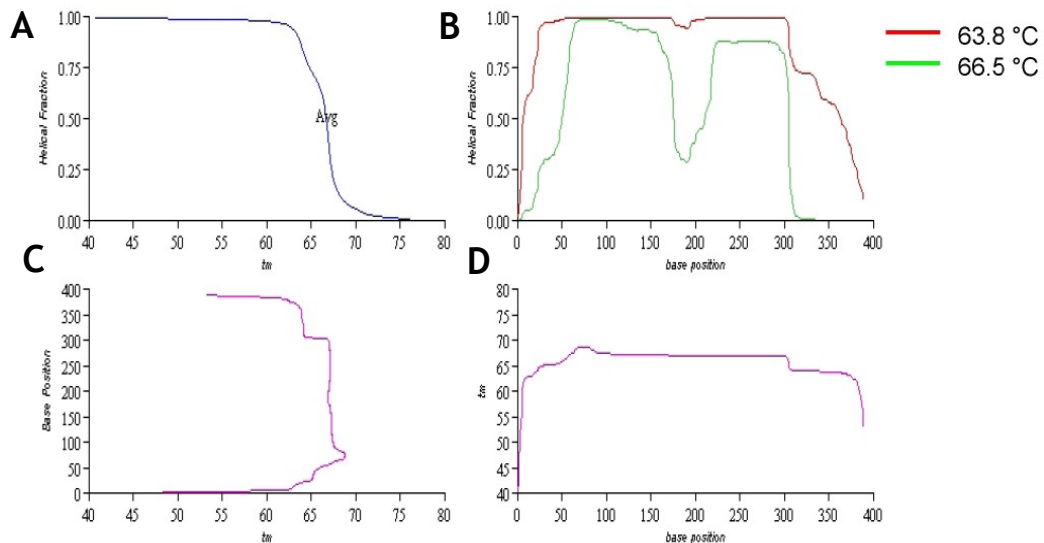


Figura 3: Grafici ottenuti da NAVIGATOR SOFTWARE per il frammento 2B del gene NKX2.5: (A) percentuale di doppia elica al variare della temperatura; (B) percentuale di doppia elica rispetto alla posizione delle basi, alle temperature di 63.8°C e 66.5°C; (C) e (D) rapporto tra temperatura di melting e posizioni delle basi nella sequenza.

Tutto questo è stato però possibile, come già detto, solo per i frammenti 2A e 2B; in quanto i frammento 1 e 2CD non sono analizzabili al DHPLC, in quanto le sequenze non sono risultate adatte per tale analisi.

Inizialmente però erano state disegnate coppie separate di primers per i frammenti 2C e 2D (di rispettivamente 409bp e 367bp). L'analisi al DHPLC non si è però rivelata ideale per questi due frammenti. Si è quindi deciso di unirli in un unico frammento, 2CD da sottoporre a sequenziamento diretto.

In tabella 6 sono riportate le condizioni di analisi ottimali al DHPLC.

<i>Frammento</i>	<i>T d'analisi</i>	<i>Time shift</i>
2A	64.3	0
	65.9	+ 1
2B	63.8	0
	66.5	+ 1

Tabella 6: Temperatura di analisi al DHPLC dei frammenti e rispettivi time shift.

– ***Risultati ottenuti mediante sequenziamento diretto***

I frammenti 1 e 2CD sono stati sottoposti a sequenziamento diretto. I risultati sono riportati in tabella 7.

<i>Frammento</i>	<i>Paziente</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>	<i>Sostituzione aminoacidica</i>	<i>ID</i>
1	8; 13; 14; 15; 17; 22; 24; 25; 30; 37; 43; 47; 51;	c.63A>G (in eterozigosi)	E21E	Rs 2277923
	20; 23;	c.63A>G (in omozigosi)	E21E	Rs 2277923
	1; 25;	c.334+59C>T		Non noto
	11;	c.200C>T	P67L	Non noto
2CD	3; 4; 6; 9; 10; 17; 18; 19; 21; 22; 26; 29; 32; 49; 51;	c.975+61G>T (in eterozigosi)		Rs 703752
	36; 38; 42; 44; 45; 50;	c.975+61G>T (in omozigosi)		Rs 703752

Tabella 7: Risultati del sequenziamento diretto

– ***Analisi al DHPLC dei frammenti di DNA ottenuti da amplificazione mediante PCR***

Il DHPLC rileva ogni eventuale cambiamento nucleotidico, in eterozigosi, dando quindi come output grafico profili di eluizione alterati (doppi, tripli picchi o altro) rispetto ai controlli sani. Un esempio di profilo di eluizione dell'amplificato di un soggetto di controllo e di un paziente è mostrato in Figura 4.

Il risultato dell'analisi degli amplificati dei 53 pazienti, per i frammenti analizzabili, è riportato in tabella 8.

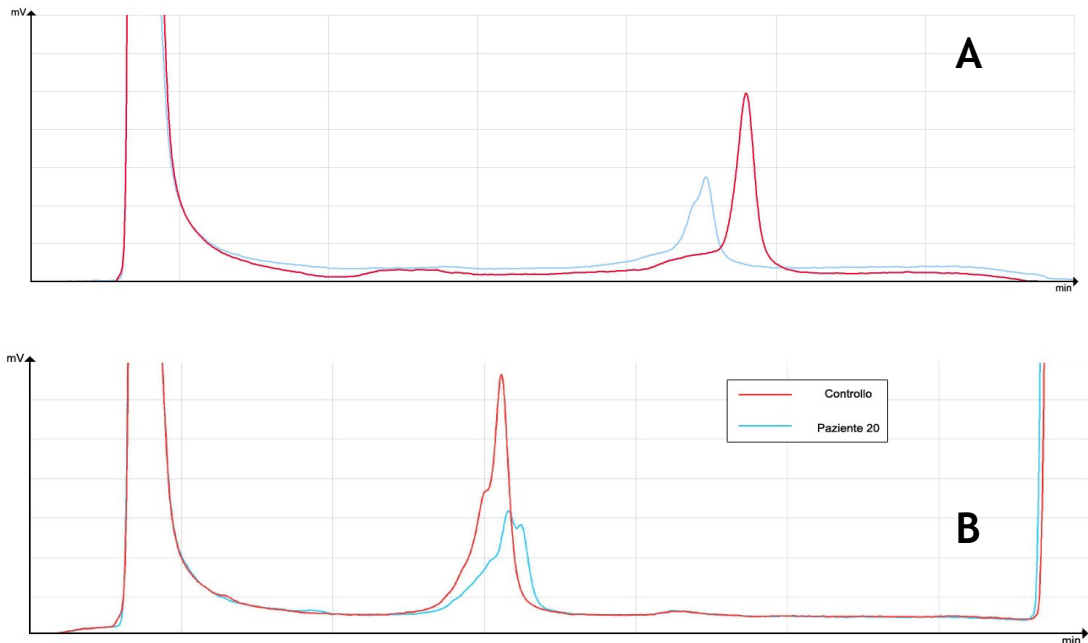


Figura 4: Profilo di eluizione del frammento 2A del gene NKX2.5 nel paziente 20 rispetto al controllo. (A) analisi alla temperatura di 64.3 °C; (B) analisi alla temperatura di 65.9°C +1.

<i>Frammento</i>	<i>T°C DHPLC</i>	<i>Paziente</i>	<i>Cromatogramma</i>
2A	64.3	20; 31;	Pattern anomalo
	65.9+1	20;31;	Pattern anomalo
2B	66.5+1	22;	Pattern anomalo

Tabella 8: Risultati al DHPLC relativi ai casi con cromatogramma diverso dal controllo.

– *Risultati del sequenziamento*

Gli amplificati dei pazienti che hanno dato profili di eluizione anomali rispetto al controllo sano, sono stati sottoposti a sequenziamento diretto al fine di identificare l'eventuale mutazione nucleotidica responsabile del particolare profilo di eluizione. In tabella 9 sono riportati i risultati del sequenziamento.

<i>Frammento</i>	<i>Paziente</i>	<i>Sostituzione nucleotidica</i>	<i>Sostituzione aminoacidica</i>	<i>ID</i>
2A	20; 31;	c.543G>A (in eterzigos)	Q181Q	Non noto
2B	22;	Nessuna		

Tabella 9: Risultato del sequenziamento nel caso i cromatogrammi fossero diversi dal controllo.

Il sequenziamento del frammento 2B nel paziente 22 non ha rivelato alcuna alterazione della sequenza nucleotidica, nonostante l'analisi al DHPLC avesse mostrato picchi anomali, rispetto al controllo. Si può ipotizzare che il cromatogramma alterato fosse dovuto ad un'effettiva sostituzione nucleotidica ma introdotta dalla Taq polimerasi.

- Q181Q

Il sequenziamento del frammento 2A nei pazienti 20 e 31 ha rivelato una sostituzione in eterozigosi c.543G>A, di tipo sinonimo, all'interno della porzione codificante del gene. Tale sostituzione non altera la sequenza aminoacidica e non è nota né in letteratura né nella banca dati dbSNP. Allo scopo di verificare se si tratta di un polimorfismo, sarà necessario effettuare lo screening in almeno 100 soggetti della popolazione di controllo.

- P67L

Nel sequenziamento del frammento 1 nel paziente 11 è stata trovata una variazione in eterozigosi, c.200C>T all'interno della porzione codificante del frammento. Tale variazione missenso porta alla sostituzione della Prolina in posizione 67 in Leucina e non è nota in letteratura. La stima della frequenza di questa sostituzione nella popolazione di controllo permetterà di valutare se si tratta di una mutazione patogena.

- c.334+59C>T

Il sequenziamento nei pazienti 1 e 25 del frammento 1 ha rilevato la presenza di una sostituzione in eterozigosi nella porzione intronica del frammento. Anche tale variazione non è nota in letteratura e non è stata ancora analizzata la popolazione di controllo per valutarne la frequenza.

CONCLUSIONI

L'analisi dei 53 pazienti affetti da CHD ha rilevato la presenza di variazioni nella sequenza nucleotidica, alcune note come polimorfismi, altre non riportate in letteratura e quindi possibili mutazioni. Di queste, due variazioni (Q181Q e c.334+59C>T) non causano apparentemente alcuna alterazione della sequenza aminoacidica. Tuttavia bisogna tener presente che possono attivare siti criptici di splicing, portando alla ritenzione o skipping di frammenti rispettivamente esonici o intronici. Per prima cosa sarà necessario valutare la loro frequenza nella popolazione di controllo per escludere che si tratti di polimorfismi frequenti.

Risulta interessante la variazione missenso P67L, in quanto porta ad un cambiamento aminoacidico significativo; infatti la Prolina per la sua particolare struttura ha spesso un ruolo fondamentale per il corretto folding della proteina e quindi anche per la sua funzione. Anche in questo caso sarà necessario analizzare almeno 100 soggetti della popolazione di controllo per valutare se si tratta di un polimorfismo.

Nel caso in cui tutte tre le variazioni identificate fossero mutazioni patogene, la frequenza massima di mutazioni identificate nei casi analizzati sarebbe del 5.6%. Tale variazione non si discosta molto da quella riportata in letteratura (3%) (McElhinney et al., 2003).

In prospettiva, sarà necessario estendere l'analisi ad un numero maggiore di pazienti CHD, allo scopo di identificare la mutazione patogena in tali soggetti e di valutare la frequenza di mutazioni nel gene NKX2.5 in un numero significativo di pazienti.

BIBLIOGRAFIA

Albertson R. C. and Yelick P. C. ;
Roles for fgf8 signaling in left-right patterning of the visceral organs and craniofacial skeleton.
Dev. Biol. 2005; **283**: 310-321.

Akazawa H., Komuro I.;
Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases.
Pharmacology & Therapeutics 2005; **107**: 252-268.

Akcaoy M. I., Cengiz F. B., Inceoglu B., Ucar T., Atalay S., Tutar E., Tekin M.;
The Effect of p.Arg25Cys Alteration in NKX2-5 on Conotruncal Heart Anomalies: Mutation or Polymorphism?
Pediatr. Cardiol. 2008; **29**: 126-129.

Bamforth S.D., Braganca J., Eloranta J.J., Murdoch J.N., Marques F.I., Kranc K.R., Farza H., Henderson D.J., Hurst H.C., Bhattacharya S.;
Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator.
Nat. Genet. 2001; **29**: 469-474.

Basson C. T., Huang T., Lin R.C., Bachinsky D.R., Weremowicz S., Vaglio A., Bruzzone R., Quadrelli R., Lerone M., Romeo G., Silengo M., Pereira A., Krieger J., Mesquita S.F., Kamisago M., Morton C.C., Pierpont M.E.M., Christoph W. Muller, Seidman J. G., and Seidman C.E.;
Different *TBX5* interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; **96**: 2919-2924.

Bhattacharya S.
Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1.
Genes. Dev. 1999; **13**: 64-75.

Biben, C., Weber, R., Kesteven, S., Stanley, E., McDonald, L., & Elliott, D. A., et al.
Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5.
Circ. Res. 2000; **87**: 888-895.

Engelfriet P, Boersma E, Oechslin E, Tijssen J, Gatzoulis MA, Thilen U, Moons P, Laforest V, Hirsch R, Daliento L, Mulger B.
The spectrum of adult congenital heart disease in Europe: morbidity and mortality in a 5 year follow-up period.
European Heart Journal 2005; **10**.

Garg V., Kathiriya I.S., Barnes R., Schluterman M.K., King I.N., Butler C.A., Rothrock C.R., Eapen R.S., Hirayama-Yamada K., Joo K., Matsuoka R., Cohen J.C., Srivastava D.

GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5.

Nature 2003; **424**: 443–447.

Harvey, R. P.

NK-2 homeobox genes and heart development.

Dev Biol 1996; **178**: 203– 216.

Hoffman J.I. ;

Incidence of congenital heart disease, I: postnatal incidence.

Pediatr. Cardiol. 1995; **16**: 103–113.

Hoffman J.I., Kaplan S. ;

The incidence of congenital heart disease.

J. Am. Coll. Cardiol. 2002; **39**: 1890-1900.

R. Ilagan, Radwan Abu-Issa, Doris Brown, Yu-Ping Yang, Kai Jiao, Robert J. Schwartz, John Klingensmith and Erik N. Meyers;

Fgf8 is required for anterior heart field development.

Development 2006; **133**: 2435-2445.

Kirby M.L.;

Embryogenesis of transposition of the great arteries: a lesson from the heart.

Circ Res. 2002; **91**: 87–89.

Lints T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I., & Harvey, R. P.;

Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants.

Development 1993; **119**: 419-431.

Lyons I., Parsons L. M. Hartley L., Li R., Andrews J. E., Robb, L.;

Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5.

Genes. Dev. 1995; **9**: 1654-1666.

D. B. McElhinney, Elizabeth Geiger, Joshua Blinder, D. Woodrow Benson, Elizabeth Goldmuntz;

NKX2.5 Mutations in Patients With Congenital Heart Disease.

Journal of the American College of Cardiology 2003; **42**: 1650-1655.

Meyers E. N. and Martin G. R.;

Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH.

Science 1999; **285**: 403-406.

Gruber P.J. and Epstein J.A.;
Development Gone Awry: Congenital Heart Disease.
Circ. Res. 2004; **94**: 273-283.

Pierpont M.E., Basson C.T., Benson D.W., Bruce D. Gelb B.D., Giglia T.M., Goldmuntz E., McGee G., Sable C.A., Srivastava D., Webb C.L. ;
Genetic Basis for Congenital Heart Defects: Current Knowledge A Scientific Statement From the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young.
Circulation 2007; **115**: 3015-3038.

Abu-Issa R., Smyth G., Smoak I., Yamamura K. and Meyers E.N. ;
Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse.
Development 2002; **129**, 4613-4625.

Reamon-Buettner S.M., Cho S.H. and Borlak J. ;
Mutations in the 3'-untranslated region of *GATA4* as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD).
BMC Medical Genetics 2007; **8**: 38.

S. M. Reamon-Buettner, Hartmut Hecker, Katharina Spanel-Borowski, Steffen Craatz, Eberhard Kuenzel, and Juergen Borlak ;
Novel *NKX2-5* Mutations in Diseased Heart Tissues of Patients with Cardiac Malformations.
American Journal of Patology 2004; **164**: 2117-2125.

Schoen F.J. ;
Cardiopatie congenite. In: Le basi patologiche delle malattie.
Robbins eds Cotran, Kumar, Collins. Piccin 2000; 693-701.

Tanaka M., Chen Z., Bartunkova S., Yamasaki N., Izumo S. ;
The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development.
Development 1999; **126**: 1269-1280.

Tikkanen J, Heinonen O.P. ;
Risk factors for cardiovascular malformations in Finland.
Eur J Epidemiol 1990; **6**: 348-56.

Zhu W., Shiojima I., Hiroi Y., Zou Y., Akazawa H., Mizukami M., Toko H., Yazaki Y., Nagai R., Komuro I. ;
Functional Analyses of Three *Csx/Nkx-2.5* Mutations That Cause Human Congenital Heart Disease.
The Journal of Biological Chemistry 2000; **275**: 35291-35296.

Wernovsky G., Gruber P.J. ;
Common congenital heart disease: presentation, management, and outcomes.

Avery's Disaeses of the Newborn 8th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 2004.

Xiao W. and Oefner P.J.;
Denaturing High-Performance Liquid Cheomatography: a review.
Him. Mut. 2001; **17**: 439-74.