ALLEGATO (2)

Università di Sassari
DIPARTIMENTO STRUTTURA CLINICA MEDICA – PATOLOGIA SPECIALE MEDICA

Viale San Pietro, 8 – 07100 SASSARI Tel. 079/228241/228316 – FAX 079/228207

Sassari, 18 ottobre 2010

AOUS
Prot. 2010/ 0019082 del 20/10/2010
Mitt.: AZIENDA OSPEDALIERO UNIVERSITARIA DI S
- UO DI PATOLOGIA SPECIALE MEDICA
AFF. GEN.
Fascicolo:

Alla Direzione Generale della
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari
Via Coppino - 07100 SASSARI
Tel. 079/2830626
Fax 079/2830618
S E D E

Oggetto: *trasmissione relazione scientifica intermedia progetto di ricerca*

In allegato si trasmette la relazione scientifica intermedia relativa alla 1° tranche del progetto di Ricerca Sanitaria Finalizzata (RAS), anno 2007 dal titolo: « *Ipercolesterolemia familiare autosomica recessiva in Sardegna. Studio epidemiologico, clinico, genetico e delle complicanze cardiovascolari*» ammesso al finanziamento come da deliberazione della Giunta Regionale n. 18/23 del 26 marzo 2008.

Responsabile scientifico: prof. Mario Maioli.

Distinti saluti

Il Responsabile scientifico
Prof. Mario Maioli

Università di Sassari
DIPARTIMENTO STRUTTURA CLINICA MEDICA – PATOLOGIA SPECIALE MEDICA

Viale San Pietro, 8 – 07100 SASSARI Tel. 079/228241/228316 – FAX 079/228207

Relazione scientifica intermedia.

In accordo con il programma previsto dal progetto per il periodo relativo al primo anno di attività è stato effettuato lo screening delle mutazioni del gene ARH, responsabile di ipercolesterolemia familiare recessiva, per la stima della frequenza degli eterozigoti nella popolazione sarda. Finora sono stati sottoposti ad analisi molecolare 2448 campioni di DNA rappresentativi della popolazione del Nord e Sud Sardegna (1008 facenti parte del materiale biologico proveniente da soggetti residenti in varie provincie sarde e stoccato presso il laboratorio del Servizio di Diabetologia e Malattie Metaboliche della AOU di Sassari, 1440 provenienti dal centro trasfusionale della ASL di Sassari e da quello dell'Ospedale "*Brotzu*" di Cagliari e conservati nella banca di DNA situata presso il centro Ricerche Polaris di Pula diretto dal Prof. F. Cucca). Sono state tipizzate le due mutazioni G65A (W22→stop) situata nell'esone 1 del gene ARH e 432insA (E170→stop) situata nell'esone 4 dello stesso gene. L'analisi è stata effettuata con metodica di restrizione (rispettivamente *Bst*NI e *Mva*I per le mutazioni nell'esone 1 e 4 implementata su sistema robotizzato. La metodica utilizzata prevedeva l'amplificazione mediante PCR del primo e il quarto esone del gene ARH con primers mutagenizzati disegnati utilizzando la sequenza del mRNA del gene ARH depositata in GenBank (sito internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) con l'ausilio del software Gene Tool Lite 1.0 (http://www.lifescience-software.com/products/body/genetool/). Per la mutazione G65A il primer reverse è stato modificato nella penultima base all'estremità 3' per creare un nuovo sito di restrizione *Bst*NI, mentre per la mutazione 432insA il primer generava un nuovo sito di restrizione *Mva*I. Per ciascuna amplificazione è stata utilizzata 1 unità di *Taq* polimerasi (RedTaq Gold - Sigma) in 1/10 di volume di buffer 10X fornito dalla ditta e 5 unità di enzima di restrizione. La messa a punto delle condizioni di amplificazione è stata fatta modificando i tempi, le temperature di annealing, il numero e la durata dei singoli cicli ed eventualmente con l'aggiunta di DMSO, in modo da ottenere un prodotto pulito. Nel caso della mutazione 432insA il digerito con *Mva*I è stato controllato in transilluminatore UV dopo elettroforesi in gel di agarosio al 1% colorato con etidio bromuro. L'allele normale viene tagliato dall'enzima *Mva*I e genera un frammento di 119 bp. In presenza dell'allele mutato viene eliminato il sito di restrizione e si osserva la banda dell'amplificato di 144 bp. Nel caso della mutazione G65A il prodotto, digerito con *Bst*NI, è stato sottoposto ad elettroforesi in agaroso. In presenza dell'allele mutato viene eliminato il sito di restrizione e si osserva la banda dell'amplificato di 157 bp.
Sono stati riscontrati 3 eterozigoti per la mutazione G65A e 16 eterozigoti per la mutazione 432insA secondo quanto riportato nella tabella seguente:

Mutazioni	Eterozigoti	Omozigoti
G65A	3/2448 (0,122%)	0/2448 (0%)
432insA	16/2448 (0,653%)	1/2448 (0,040%)

Inoltre è stata riscontrata la presenza di un omozigote per la mutazione 432insA. Dai dati suddetti la stima della frequenza degli eterozigoti nella popolazione sarda risulterebbe essere di 1:820 per la mutazione G65A e 1:153 per la mutazione 432insA. La prevalenza osservata per la mutazione 432insA non si discosta quindi significativamente da quella attesa, stimata sulla base della frequenza degli omozigoti nella popolazione generale. Al contrario la frequenza osservata per la

Università di Sassari
DIPARTIMENTO STRUTTURA CLINICA MEDICA – PATOLOGIA SPECIALE MEDICA

Viale San Pietro, 8 – 07100 SASSARI Tel. 079/228241/228316 – FAX 079/228207

mutazione G65A è notevolmente più bassa di quella teorica per cui si può ipotizzare l'esistenza di un "hot-spot" per tale mutazione in aree specifiche dell'isola.

Mutazioni	Prevalenza attesa	Prevalenza osservata
G65A	1:141	1:820
432insA	1:135	1:153

Per tale motivo nel prosieguo del'attività si approfondirà tale aspetto sottoponendo a screening per la mutazione G65A un campione più numeroso di soggetti provenienti da zone in cui la frequenza delle famiglie con omozigoti G65A appare più elevata.
Accanto allo screening degli eterozigoti sono stati reclutati anche 152 soggetti sardi affetti da ipercolesterolemia grave afferenti al Servizio di Diabetologia e Malattie Metaboliche dell'Università di Sassari e da altri centri dell'isola partecipanti allo studio. I soggetti avevano un'età compresa tra 6 e 93 anni (media 47,2 anni), provenivano da un totale di 63 famiglie non relate (media: 1,9 soggetti/famiglia) e, ad eccezione di 3 soggetti in età infantile, avevano praticato terapia ipocolesterolemizzante con statine e/o ezetimibe iniziata a partire dal momento della diagnosi.
La diagnosi di ipercolesterolemia familiare è stata formulata sulla base dei valori di colesterolemia totale superiore a 290 mg/dL (oppure superiore a 260 mg/dL nei bambini o negli adulti portatori di trait talassemico) ovvero in presenza di anamnesi familiare positiva per ipercolesterolemia o di presenza di xantomatosi tendinea (tendini estensori delle mani, tendini achillei) nel paziente o nei familiari di 1° grado.
In tutti i partecipanti allo studio sono stati raccolti i dati anamnestici includenti la presenza di eventuali altri fattori di rischio cardiovascolare (diabete, fumo, sovrappeso/obesità, sedentarietà), le abitudini alimentari al momento del reclutamento. I partecipanti sono stati quindi sottoposti ad un prelievo di sangue venoso (5 ml di siero e 10 ml di sangue in EDTA) per la determinazione del profilo lipidico e di altri parametri biochimici. E' stata determinata la concentrazione di colesterolo totale ed HDL (metodo CHOD-PAP mediante autoanalizzatore Abbott C8000) i livelli di trigliceridi (metodo TRINDER) mentre i livelli delle lipoproteine Apo-B, Apo-AI e Apo-E saranno determinati successivamente sui campioni di siero congelati a -80°C. Sono stati inoltre determinati i livelli di glucosio, creatininemia, ed altri analiti di routine (profilo epatico e renale), oltre all'esame emocromocitometrico e all'esame urine. L'eventuale presenza di ipercolesterolemia secondaria da ridotta funzionalità tiroidea, stasi biliare, sindrome nefrosica, ipercortisolismo ecc. è stata esclusa con test appropriati. Tutti i pazienti risultavano esenti da gravi patologie epatiche e renali in atto. I 10 ml di sangue in EDTA sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA genomico e la successiva genotipizzazione molecolare. I dati anagrafici, clinici e di laboratorio dei partecipanti allo studio sono stati inseriti in una base di dati informatizzata appositamente creata, che viene costantemente aggiornata man mano che procede il reclutamento.
Attualmente l'attività di reclutamento dei soggetti ipercolesterolemici prosegue con l'obiettivo di raggiungere un numero totale di soggetti pari a 150-200 cui si dovranno aggiungere i circa 200 già reclutati in passato dal gruppo di ricerca e in parte sottoposti ad analisi genetico-molecolare. Per quanto riguarda la caratterizzazione genotipica dell'ipercolesterolemia i dati finora disponibili ricavati dall'analisi degli alberi genealogici e da un preliminare screening molecolare indicano che almeno 3 casi su 152 di ipercolesterolemia familiare di recente arruolamento sono ascrivibili a mutazioni del gene ARH e pertanto riconducibili all'ipercolesterolemia autosomica recessiva. I casi restanti, sulla base delle caratteristiche fenotipiche rilevate, sono verosimilmente rappresentati da forme di FH eterozigote la cui conferma diagnostica dovrà attendere i risultati delle analisi

Università di Sassari
DIPARTIMENTO STRUTTURA CLINICA MEDICA – PATOLOGIA SPECIALE MEDICA

Viale San Pietro, 8 – 07100 SASSARI Tel. 079/228241/228316 – FAX 079/228207

molecolari tuttora in corso. Per facilitare l'esecuzione dello screening molecolare sono state messe a punto metodiche PCR semplificate con l'uso di primers mutagenizzati o allele-specifici. Per validare tali metodiche esse sono state poste a confronto con il sequenziamento diretto degli alleli mutati riscontrando costantemente una percentuale di concordanza del 100%. Finora sono state identificate le seguenti mutazioni del gene del recettore LDL: FH *Elverum* (nt 313+1 g→a), FH *Alghero* (C95R), FH *Sassari*-1 (Fs572), FH *Sassari*-2 (D118N), FH *Sassari*-3 (C255W), FH *Sassari*-4 (T413R), FH *Sassari*-5 (E579X), FH *Nuoro*-1 (A378T), FH *Nuoro*-2 (nt 1706-10 g→a), FH *Campobasso* (E119X) in 74 soggetti tra i 152 esaminati. Lo studio cardiologico dei pazienti finora reclutati, che comprende un esame elettrocardiografico, una prova da sforzo e l'esecuzione dell'ultrasonografia dei tronchi sovra-aortici è in fase di attuazione in collaborazione con il servizio di Cardiologia dell'Università di Sassari.