SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE
XXVII CICLO

Dott.ssa Erika Pagannone

La Dott.ssa Erika Pagannone, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma ed Azienda Ospedaliera S. Andrea, sotto la direzione della Prof.ssa Speranza Rubattu.

Nel corso del Dottorato, la Dott.ssa Pagannone si è occupata della messa a punto di un protocollo diagnostico per l'analisi molecolare dei pazienti affetti da cardiomiopatie che afferiscono all'ambulatorio per le cardiomiopatie e per la prevenzione della morte improvvisa dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea.
Nelle cardiomiopatie, il muscolo cardiaco è caratterizzato da alterazioni anatomiche e funzionali, in assenza di condizioni quali coronaropatie, ipertensione arteriosa, valvulopatie e malattie congenite, che possano determinarle. Le cardiomiopatie sono raggruppate in specifici fenotipi anatomo-funzionali, ciascuno dei quali può essere a sua volta classificato in forme familiari e non familiari. Le forme familiari sono generalmente malattie monogeniche, ossia il difetto genico è sufficiente da solo a determinare il fenotipo; le cardiomiopatie monogeniche possono essere in realtà anche sporadiche, ossia causate da mutazioni de novo, che compaiono per la prima volta in un determinato membro di una famiglia, il quale potrà trasmettere il tratto genetico ai discendenti. Nella maggior parte dei casi, la modalità di trasmissione è autosomica dominante.
Una delle principali difficoltà nella diagnosi genetica delle cardiomiopatie è la considerevole eterogeneità genetica della maggior parte di esse, per cui lo stesso fenotipo può essere determinato da differenti mutazioni in diversi geni. Nell'ambito delle cardiomiopatie, le metodiche di Next Generation Sequencing (NGS), introdotte a partire dal 2005, hanno permesso di migliorare in modo significativo l'efficienza e la velocità di sequenziamento genico, riducendo in modo drammatico i costi, con un impatto decisivo sia nella diagnosi clinica delle cardiomiopatie, sia nella ricerca, finalizzata alla scoperta di nuove varianti geniche responsabili delle malattie.
Per l'esecuzione delle indagini molecolari è stato utilizzato un sequenziatore di nuova generazione, l'Ion Personal Genome Machine (PGM), che, sfruttando le nuove tecnologie di NGS, consente una produzione di dati molto maggiore rispetto ai metodi classici di sequenziamento. Il resequencing di regioni target, quali le regioni codificanti dei numerosi geni coinvolti nella patogenesi delle cardiomiopatie, permette una rapida identificazione di varianti nucleotidiche, piccole inserzioni e delezioni, che in epoca antecedente al NGS rappresentavano un gold standard troppo costoso e

laborioso da raggiungere. L'Ion Personal Genome Machine dell'Ion Torrent è uno strumento di recente produzione che utilizza una nuova tecnologia di sequenziamento non ottica, basata sull'utilizzo di un circuito integrato che sfrutta la tecnologia dei semiconduttori. I dati sulla sequenza sono ottenuti mediante la misurazione diretta degli ioni, che naturalmente vengono liberati in seguito all'incorporazione di nucleotidi non modificati da parte della DNA polimerasi durante la sintesi del filamento complementare alla sequenza di riferimento. L'Ion Chip è un chip semiconduttore in grado di rilevare la variazione del pH determinata dal rilascio di protoni in seguito all'incorporazione di ciascun nucleotide e trasformarlo da segnale chimico a segnale digitale. Il chip è dotato di sensori ione-sensibili, a effetto di campo, basati su transistor, in grado di registrare separatamente il segnale proveniente da 1.2 milioni di pozzetti, consentendo così una detenzione parallela e simultanea di reazione di sequenza indipendenti.
Nell'ambito delle cardiomiopatie, la Dott.ssa Pagannone ha inizialmente incentrato il progetto sulla cardiomiopatia ipertrofica (HCM), non solo perchè è la più comune cardiopatia ereditaria, con una prevalenza di 1:500 nella popolazione generale (verosimilmente sottostimata), ma anche per l'estrema complessità di questa malattia, caratterizzata da ampia eterogeneità genetica, allelica, fenotipica e clinica. La malattia può essere familiare o sporadica, quindi causata da mutazioni "de novo", ereditata secondo un meccanismo autosomico dominante, con penetranza incompleta, età-correlata (diagnosticata meno frequentemente al di sotto dei 25 anni) ed espressività variabile. L'HCM è causata da mutazioni dominanti su oltre 11 geni che codificano per proteine del sarcomero o dei dischi Z con un ruolo importante per la struttura e per il funzionamento del sarcomero stesso. Attualmente, sono state identificate oltre 1500 mutazioni diverse, molte delle quali sono mutazioni "private", cioè presenti solo alcune nell'ambito di una determinata famiglia. Nel 90% dei casi si tratta di mutazioni missenso, che risultano nella sostituzione di un singolo aminoacido nella proteina. In alternativa, le mutazioni portano a variazioni strutturali più radicali o a troncamento della proteina (aploinsufficienza): mutazioni frameshift (inserzioni o delezioni), mutazioni non senso (che portano a un'interruzione prematura della traduzione) o mutazioni che alterano il normale splicing dell'mRNA (mutazioni nei siti di splicing o introniche). Oltre all'ampia eterogenità genetica (diversi geni implicati, oltre 1000 mutazioni diverse responsabili dello stesso fenotipo), l'HCM presenta un'ampia variabilità fenotipica (età d'insorgenza variabile, differenti gradi e pattern di ipertrofia, differenti alterazioni emodinamiche, diverso grado di ostruzione) e clinica (presentazione clinica, prognosi, rischio di morte improvvisa, progressione verso l'insufficienza cardiaca). Attualmente, l'analisi genetica risulta positiva in circa il 50-60% dei casi di HCM familiare e nel 30-40% dei casi apparentemente sporadici, senza storia familiare. Nel restante 40% dei casi non è possibile identificare una mutazione, o perchè si tratta di mutazioni ancora sconosciute o, spesso, perchè si tratta di "fenocopie", ovvero condizioni responsabili di un fenotipo cardiaco simile alla HCM, ma con patogenesi, decorso clinico, trattamento e prognosi molto diversi, come ad esempio la sindrome di Danon, causata da una mutazione di LAMP2 (proteina 2 di membrana lisosomiale), la malattia di Anderson-Fabry, causata da mutazioni del gene GLA (alfa-galattosidasi) situato sul cromosoma X, la sindrome di Noonan, la sindrome di Leopard e le mutazioni del gene che codifica per PRKAG2 (proteinchinasi AMP-attivata).
Quindi, nonostante l'ampia mole di dati provenienti dall'analisi genetica, grazie all'introduzione delle metodiche di NGS, attualmente solo nel 35-60% (a seconda delle casistiche) dei casi di HCM viene identificata una mutazione sarcomerica, e la correlazione genotipo-fenotipo resta molto complessa. Non è possibile, allo stato attuale, definire con certezza mutazioni "benigne" e "maligne", nè stratificare il rischio solo sulla base della mutazione identificata. Una possibile eccezione è rappresentata dalle mutazioni multiple, che per effetto dose determinano generalmente un fenotipo più aggressivo. Anche in questo caso tuttavia l'osservazione è preliminare e sono necessari studi prospettici a lungo termine su popolazioni numerose per far sì che il genotipo complesso possa essere considerato un marker prognostico.

Generalmente, la HCM è diagnosticata nei giovani adulti, nei quali è associata a rischio di morte improvvisa, ma talvolta può avere un decorso asintomatico e benigno e rendersi clinicamente evidente solo in età avanzata, con un'aspettativa di vita pressochè normale.
Nell'ambito dell'eterogeneità clinica, una categoria particolare è rappresentata dalla HCM diagnosticata negli anziani, che, oltre all'età di esordio (o di diagnosi), presenta caratteri morfologici distintivi e prognosi migliore. La HCM ad esordio tardivo può essere conseguenza di un ritardo diagnostico ("late diagnosis"), e quindi una malattia che, sviluppatasi nel giovane adulto, non aveva dato sintomi fino all'età avanzata, oppure a un ritardo nell'insorgenza della malattia ("late onset"), e quindi una malattia con uno sviluppo ed un'espressione fenotipica tardiva. In ogni caso, questa particolare variante clinica della malattia presenta caratteristiche peculiari rispetto alla HCM ad esordio giovanile, essendo caratterizzata, oltre all'esordio tardivo, a una prognosi migliore, con minor rischio di morte improvvisa rispetto ai giovani, a un minor grado di ipertrofia, a una diversa geometria ventricolare prevalente (forma ovale, con bulge prossimale del setto). Nella HCM del paziente anziano, la prevalenza di mutazioni geniche è relativamente bassa. Questo solleva alcune perplessità relative all'inquadramento nosografico di questa patologia: la HCM dell'anziano potrebbe essere una semplice variante clinica della malattia ad esordio precoce, ma potrebbe anche essere una condizione distinta, con fenotipo simile, come risultato di diversi processi patogenetici. Dati preliminari risultanti dalla casistica di pazienti anziani con HCM confermano questi aspetti: un gruppo di pazienti con esordio (o diagnosi) della malattia dopo i 65 anni è stato confrontato con quelli ad esordio più precoce, analizzando gli aspetti clinici, morfologici e il decorso clinico, e rilevando importanti differenze tra i due gruppi per quanto riguarda tutte queste variabili. La malattia ad esordio tardivo sembra, quindi, non essere semplicemente l'evoluzione della malattia ad esordio giovanile, ma mostra caratteristiche peculiari, che suggeriscono una base genetica differente.
Partendo da queste osservazioni, la Dott.ssa Pagannone ha iniziato il suo studio confrontando due fenotipi "estremi" della HCM: l'esordio tardivo o late onset (LO, ≥ 65 anni) e l'esordio in età giovanile o early onset (EO, ≤ 25 anni). Lo scopo principale del lavoro è stato quello di identificare le mutazioni responsabili della malattia con esordio precoce e con esordio tardivo, utilizzando la tecnologia della NGS. Basandosi sui dati della più recente letteratura, è stato messo a punto un pannello diagnostico di 17 geni, nei quali sono state identificate mutazioni responsabili di forme sarcomeriche e non di cardiomiopatia ipertrofica. Il pannello permette di sequenziare in contemporanea, su un unico chip, 16 pazienti, con tempi e costi di gran lunga inferiori rispetto alle vecchie metodiche. Da questa casistica di pazienti affetti da HCM, sono stati selezionati 70 pazienti (34 donne e 36 uomini), 35 con diagnosi precoce (prima dei 25 anni, età media 18,6±8,5 anni) e 35 con esordio tardivo (dopo i 65 anni, età media 70,4±4,8). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione cardiologica clinico-strumentale e a consulenza genetica. I dati clinici di ciascun paziente comprendevano una dettagliata anamnesi personale (finalizzata a valutare l'età esatta di insorgenza, i sintomi, il decorso clinico, le eventuali complicanze, ecc.). Gli esami strumentali comprendevano l'elettrocardiogramma, l'ecocardiogramma, la risonanza magnetica cardiaca, l'ECG dinamico secondo Holter. La diagnosi clinica di HCM è stata basata sulla dimostrazione ecocardiografica di un ventricolo sinistro ipertrofico (>15 mm negli adulti, o lo spessore equivalente relativo alla superficie corporea nei bambini) e non dilatato, in assenza di patologie cardiache o sistemiche in grado di determinare ipertrofia. I due gruppi differivano in maniera statisticamente significativa per la percentuale di pazienti con storia familiare di HCM (maggiore nel gruppo dei giovani, 60% vs 11.5%), per il sesso (prevalenza del sesso maschile tra i giovani) e per le dimensioni dell'atrio sinistro (maggiori nel gruppo degli anziani); l'evoluzione verso l'*end stage* è stata osservata solo nel gruppo dei giovani; la forma ostruttiva era prevalente nel gruppo degli anziani ma questa, come tutte le altre caratteristiche cliniche e strumentali, non differivano in modo statisticamente significativo. Previa consulenza genetica, i pazienti sono stati sottoposti a prelievo ematico per l'analisi del DNA. Il DNA è stato estratto, quantificato e frammentato in sequenze di poche centinaia di paia di basi. E' stata quindi creata la libreria genomica, legando

ciascun frammento a uno dei 16 *adapters,* ossia delle sequenze predefinite che fungono successivamente da stampo per la sintesi dei frammenti complementari (o *reads*). Quantità equimolari di ciascuna libreria sono state utilizzate per preparare i *template* per l'amplificazione clonale mediante PCR. Su ogni pannello sono state sequenziate parallelamente da 12 a 16 librerie, attraverso la Ion Torrent Personal Genome Machine, generando le *reads* (una media di 240000 per paziente). Le *reads* sono state allineate nella corretta posizione rispetto alle sequenze di riferimento del genoma umano (UCSC Genome Browser), a ricostituire le sequenze geniche dei pazienti. E' stata quindi effettuata l'analisi di *coverage* (ovvero il calcolo del numero di *reads* per ogni frammento) ed è stata calcolata la "average read depth", ovvero la percentuale di *reads* che mappano nelle ROI (regions of interest). In totale, sono state identificate 282 varianti all'interno dei 17 geni analizzati: 2 mutazioni di tipo inserzione/delezione, 175 introniche, 37 missenso, 59 sinonime, 5 di splicing e 4 mutazioni di stop. Le varianti identificate sono state sottoposte a filtraggio, ovvero, alla selezione di quelle che potrebbero avere un significato fenotipico, e ad annotazione, comunicando tutti i dati ottenuti nei database o in letteratura. Dall'analisi sono state escluse le varianti comuni (ossia con minor frequenza allelica maggiore del 5%), le varianti esoniche sinonime e quelle introniche. Le varianti non sinonime, quelle dei siti di splicing e di "loss of funcion" sono state analizzate attraverso 3 programmi di predizione della patogenicità (Polyphen2, Provean e SIFT) e programmi di predizione dello splicing. Quindi, le varianti sono state classificate come "tollerate" o "non tollerate" sulla base della concordanza di almeno 2 su 3 software. Infine, le varianti identificate sono state validate mediante il sequenziamento secondo Sanger. Dopo filtrazione, sono risultate 41 varianti con possibile effetto clinico, localizzate in 9 dei 17 geni analizzati (90% su geni sarcomerici): MYBPC3 (17/41=41%); MYH7 (10/41=24%); TNNT2, CAV3 and MYH6 (3/41=7.5% ciascuno); TNNI3 (2/41=4.8%); GLA, MYL2 e MYL3 (1/41=2.5% ciascuno). Di queste, 34 sono varianti note mentre 7 sono nuove. Delle 34 varianti note, 15 sono conosciute per avere effetto patogenetico, 6 sono probabilmente patogenetiche, una è benigna, mentre 12 sono registrate come varianti di incerto significato. Considerando le 7 nuove mutazioni, tutte missenso, 4 sono risultate probabilmente patogenetiche, una probabilmente benigna e 4 di significato incerto.

La percentuale di identificazione delle mutazioni è stata del 54,3%, ma con una netta differenza tra i due gruppi: 85,7% (30/35) nel gruppo EO e 22.9% (8/35) nel gruppo LO. Considerando solo i pazienti con storia familiare positiva, la percentuale di identificazione delle mutazioni è stata dell'88% (22/25), 75% (3/4) nel gruppo LO e 90.5% nel gruppo EO. Per i soli casi sporadici, la percentuale di identificazione è stata del 35,5%, 78,6% (11/14) negli EO e 16%(5/31) negli LO. Sono stati identificati anche pazienti con mutazioni multiple: due pazienti del gruppo EO con 3 mutazioni diverse sul gene MYBPC3, e 6 pazienti con doppia mutazione, 4 negli EO e 2 nei LO. La distribuzione delle mutazioni è simile nei due gruppi, ad eccezione di quelle di MYH6, identificata solo nei LO, e TNNT2, identificata solo negli EO. A causa della ridotta numerosità del campione, non è stato possibile ipotizzare correlazioni genotipo-fenotipo in questa casistica.

Il potere diagnostico dell'analisi genetica effettuata tramite NGS in questa casistica di pazienti affetti da HCM è risultato sostanzialmente sovrapponibile a quanto riportato in letteratura, sia nell'intera popolazione dello studio, sia nei singoli gruppi. In particolare, questi risultati confermano che l'età alla diagnosi e la storia familiare positiva per HCM costituiscono importanti predittori di positività del test genetico, e sottolineano quindi l'importanza di un'appropriata selezione dei pazienti da sottoporre ad analisi genetica, al fine di ottimizzare il rapporto costo/beneficio.

In questo studio è stato utilizzato un pannello di 17 geni nel tentativo di migliorare la percentuale di identificazione delle mutazioni; tuttavia, con questo approccio è stato confermato il tipo e la distribuzione di mutazioni già descritte in letteratura, e anche le nuove mutazioni identificate sono localizzate per la maggior parte nei principali geni sarcomerici (3 inMYH7, 1 in MYH6, 1 in MYBPC3 e 1 in TNNI3).

Un pannello limitato e ben selezionato di geni appare quindi la scelta migliore per l'applicazione della NGS a fini diagnostici

PUBBLICAZIONI 2012-2015

Musumeci B, Saponaro A, **Pagannone E**, Proietti G, Mastromarino V, Conti E, Tubaro M, Volpe M, Autore C. Simultaneous Takotsubo syndrome in two sisters. Int J Cardiol. 2013 May 25;165(3):e49-50.

Magrì D, Agostoni P, Cauti FM, Musumeci B, Egidy Assenza G, De Cecco CN, Muscogiuri G, Maruotti A, Ricotta A, **Pagannone E**, Marino L, Santini D, Proietti G, Serdoz A, Paneni F, Volpe M, Autore C.Determinants of peak oxygen uptake in patients with hypertrophic cardiomyopathy: a single-center study. Intern Emerg Med. 2014 Apr;9(3):293-302.

Magrì D, De Cecco CN, Piccirillo G, Mastromarino V, Serdoz A, Muscogiuri G, Ricotta A, Gregori M, Marino L, Cauti FM, **Pagannone E**, Musumeci MB, Maruotti A, Autore C. Myocardial repolarization dispersion and late gadolinium enhancement in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Circ J. 2014;78(5):1216-23.

Francia P, Santini D, Musumeci B, Semprini L, Adduci C, **Pagannone E**, Proietti G, Volpe M, Autore C. Clinical impact of nonsustained ventricular tachycardia recorded by the implantable cardioverter-defibrillator in patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Cardiovasc Electrophysiol. 2014 Nov;25(11):1180-7.

Pagliaro B, Tocci G, **Pagannone E**, Musumeci MB, Testa M, Sensini I, Autore C, Ferrucci A, Volpe M. An atypical clinical presentation of renovascular hypertension. Int J Cardiol. 2014 Dec 20;177(3):e107-10.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Erika Pagannone** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI GENICHE IN PAZIENTI AFFETTI DA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING: CONFRONTO TRA PAZIENTI CON ESORDIO PRECOCE E CON ESORDIO TARDIVO

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi