



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in:
MEDICINA E CHIRURGIA

Tesi di Laurea:

Possibile effetto fondatore di una mutazione del gene TNNI3 in una coorte di pazienti con cardiomiopatia ipertrofica nella regione Marche

Possible founder effect of a variant in the TNNI3 gene in a cohort of patients with hypertrophic cardiomyopathy in the Marche region

Candidata:
Angela Pelliccioni

Relatore:
Prof. Mauro Pesaresi

Anno Accademico 2025-2026

INDICE

INTRODUZIONE	1
GENE TNNI3	3
1.1 STRUTTURA, ESPRESSIONE E FUNZIONE DEL GENE	3
1.2 STRUTTURA DELLA PROTEINA	4
LE CARDIOMIOPATIE	7
2.1 DEFINIZIONE - LINEE GUIDA ESC 2023	7
2.2 CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA (HCM)	8
2.3 CARDIOMIOPATIA RESTRITTIVA (RCM)	9
2.4 CARDIOMIOPATIA DILATATIVA (DCM)	9
2.5 MUTAZIONI DI TNNI3 E CARDIOMIOPATIE: ASSOCIAZIONE E MECCANISMI	10
2.5.1 <i>TNNI3 e cardiomiopatia ipertrofica</i>	10
2.5.2 <i>TNNI3 e cardiomiopatia restrittiva</i>	11
2.5.3 <i>TNNI3 e cardiomiopatia dilatativa</i>	11
2.5.4 <i>Variabilità fenotipica e correlazioni genotipo-fenotipo</i>	12
2.5.5 <i>Meccanismo unificante: l'ipersensibilità al Calcio</i>	12
GENETICA E MUTAZIONI DEL GENE TNNI3	13
3.1 DIFFERENZE TRA MUTAZIONI E POLIMORFISMI	13
3.2 CLASSIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI	14
3.3 CAUSE DELLE MUTAZIONI	16
PORZIONE C-TERMINALE DEL TNNI3 E MUTAZIONI	17
4.1 RUOLO DEL DOMINIO C-TERMINALE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CONTRATTILE	18
4.2 MUTAZIONI PATOGENETICHE DELLA PORZIONE C-TERMINALE DI TNNI3	19
4.3 CORRELAZIONI GENOTIPO-FENOTIPO NELLE MUTAZIONI C-TERMINALI DI TNNI3	23
4.3.1 <i>Mutazioni C-terminali e cardiomiopatia ipertrofica</i>	23
4.3.2 <i>Mutazioni C-Terminali e cardiomiopatia restrittiva</i>	23
4.3.3 <i>Mutazioni con doppia associazione fenotipica HCM-RCM</i>	24

4.4 BASI MOLECOLARI DELL' AUMENTO DELLA SENSIBILITÀ Ca^{2+} NELLE MUTAZIONI C-TERMINALI	25
4.5 CONSEGUENZE A LIVELLO CARDIOMIOCITARIO E TISSUTALE	25
4.6 RUOLO DELLE MUTAZIONI DOPPIE	26
4.7 IMPLICAZIONI PER IL COUNSELING GENETICO	27
MUTAZIONE LEU198VAL	28
5.1 INTRODUZIONE E IDENTIFICAZIONE DELLA VARIANTE	28
5.2 STORIA DELLA MUTAZIONE	28
5.3 PRESENZA NEI DATABASE GENETICI	29
5.4 POSIZIONE DELLA VARIANTE	30
5.5 IMPLICAZIONI FUNZIONALI SPECIFICHE	30
5.6 DATI CLINICI E FENOTIPO ASSOCIATO	31
5.7 PRESENZA IN STUDI DI DOPPIE MUTAZIONI	32
5.8 CLASSIFICAZIONE DELLA VARIANTE	32
5.8.1 <i>Criteri ACMG/AMP</i>	32
5.8.3 <i>Classificazione ACMG/AMP</i>	33
5.8.4 <i>Classificazione ACGV</i>	33
5.9.5 <i>Classificazione HGMD Professional</i>	34
SCOPO DELLA TESI	35
MATERIALI E METODI	37
RISULTATI	39
DISCUSSIONE	56
CONCLUSIONI	60
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	62

Introduzione

Le cardiomiopatie sono un gruppo eterogeneo di alterazioni miocardiche primitive, caratterizzate da anomalie strutturali e funzionali del muscolo cardiaco in assenza di coronaropatia, ipertensione arteriosa, valvulopatie o cardiopatie congenite che giustifichino l'entità della disfunzione fenotipica. La compromissione intrinseca del miocito conduce a un progressivo deterioramento della funzione della pompa cardiaca, che si riflette negativamente sia sulla capacità contrattile sistolica sia sulle proprietà di riempimento diastolico del ventricolo.

L' eziologia delle cardiomiopatie presenta una forte componente genetica, prevalentemente a trasmissione autosomica dominante e per questo motivo lo screening e il test genetico clinico sono strumenti cardine per la diagnosi precoce, la stratificazione prognostica e la consulenza familiare. Tuttavia, l'avvento delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) ha portato ad una rilevante complessità interpretativa: il frequente riscontro di varianti di incerto significato (VUS, Variants of Uncertain Significance). Le VUS sono alterazioni nucleotidiche mai descritte in precedenza o prive di una solida evidenza epidemiologica e funzionale; la loro identificazione non permette di confermare né di escludere la patogenicità, rappresentando un limite nella formulazione di una diagnosi di certezza e nella gestione clinica dei portatori.

Il gene *TNNI3* codifica per la troponina I cardiaca (cTnI), la subunità inibitoria del complesso della troponina, essenziale per la regolazione calcio-dipendente della contrazione miocardica. Mutazioni a carico di *TNNI3* alterano l'affinità del complesso per il Ca^{2+} o l'interazione tra filamenti spessi e sottili (actina-miosina), determinando un difetto del rilassamento diastolico o dell'efficienza sistolica.

Evidenze consolidate in letteratura dimostrano come le varianti patogene di questo gene siano alla base della genesi di fenotipi restrittivi (RCM) e ipertrofici (HCM), caratterizzati da disfunzione diastolica severa e disarray dei miociti.

In particolare, questo lavoro focalizza l'attenzione su una specifica variante missenso riscontrata a carico del gene *TNNI3*: la mutazione p.Leu198Val (c.592C>G). Tale

alterazione nucleotidica determina la sostituzione dell'aminoacido Leucina con una Valina in posizione 198, all'interno del dominio C-terminale mobile della troponina I cardiaca (cTnI): essendo una regione altamente conservata dal punto di vista filogenetico e funzionalmente deputata alla regolazione calcio-dipendente del ciclo cardiaco, l'impatto di questo switch amminoacidico è oggetto di interesse clinico.

Attualmente inserita nei principali database internazionali (ClinVar ed Ensembl) con una classificazione di Probabilmente Patogenetica (Likely Pathogenic), la p.Leu198Val è stata prevalentemente associata in letteratura al fenotipo della Cardiomiopatia Ipertrofica (HCM), pur mostrando una penetranza e un'espressività clinica fortemente variabili all'interno delle coorti familiari descritte.

L'interesse scientifico nei confronti della variante p.Leu198Val non risiede unicamente nel suo potenziale impatto molecolare, ma trova una solida giustificazione sul piano epidemiologico e clinico all'interno della nostra casistica. Tale mutazione è stata identificata in un numero significativamente elevato di pazienti giunti alla nostra attenzione per disturbi di interesse cardiologico e successivamente anche in loro familiari sottoposti a test genetico.

L'aspetto di eccezionale rilevanza clinica è rappresentato dal riscontro di un'incidenza nel nostro territorio spiccatamente superiore rispetto a quella documentata a livello globale, che suggerisce la possibile presenza di un cluster geografico.

È quindi importante studiare approfonditamente questa variante per mappare in modo preciso la sua reale espressione fenotipica nella popolazione locale, ottimizzare i protocolli di screening familiare a livello territoriale e contribuire alla sua classificazione di patogenicità.

La discussione e l'analisi di questa variante all'interno della nostra casistica rappresentano pertanto un modello ideale per comprendere come un'integrazione tra l'imaging clinico, lo screening familiare e la bioinformatica possa guidare il clinico oltre l'incertezza della classificazione genetica, verso una diagnosi di certezza e una gestione terapeutica personalizzata.

Gene TNNI3

1.1 Struttura, espressione e funzione del gene

Il gene TNNI3 codifica per la troponina I cardiaca ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19, in posizione 19q13.4 nel genoma umano.(1)

Il gene è composto da otto esoni, per una lunghezza complessiva di circa 6,2 kb di DNA genomico localizzato alle coordinate 55.151.767-55.157.732 in GRCh38.p14. L'isoforma principale è TNNI3-201, contiene tutti e 8 gli esoni e codifica per una proteina di 210 residui aminoacidici.

È significativa la presenza di 10 varianti di splicing, ma non tutte le varianti sono codificanti per una proteina, mentre altre possono portare alla produzione di proteine tronche o non funzionanti. Circa l'80% delle varianti patogenetiche finora descritte per TNNI3 è concentrato negli esoni 7 e 8, che codificano per i domini di interazione con l'actina e la troponina C miocardiche.

La famiglia della troponina I si compone di tre geni: TnI del muscolo scheletrico a contrazione rapida, TnI del muscolo scheletrico a contrazione lenta e TnI cardiaco; il gene TNNI3 codifica per l'isoforma cardiaca ed è espresso esclusivamente nel tessuto miocardico adulto.

La troponina ha un ruolo centrale nella regolazione della contrazione e del rilassamento dei muscoli striati vertebrati. L'unità contrattile primaria dei muscoli striati, cardiaco e scheletrico, è il sarcomero, composto da filamenti spessi di miosina sovrapposti a filamenti sottili di actina; l'interazione acto-miosinica attiva la miosina ATPasi e alimenta lo scorrimento dei miofilamenti e la contrazione muscolare.

Il processo è regolato dalla concentrazione di Ca^{2+} citosolica attraverso il sistema troponina-tropomiosina associato ai filamenti sottili.

Il complesso troponinico è quindi un modulatore calcio-sensibile della contrazione ed è formato da 3 proteine, ciascuna codificata da geni separati:

- Troponina C (TnC): lega il Ca^{2+} ;
- Troponina I (TnI): subunità inibitoria;
- Troponina T (TnT): ancora il complesso alla tropomiosina.

La troponina I rappresenta dunque la subunità inibitoria del complesso troponinico: in assenza di Ca^{2+} si lega all'actina, bloccando l'interazione acto-miosinica e inibendo l'ATPasi.

Se il Ca^{2+} è presente, questo si lega al sito regolatorio della TnC e ciò porta alla rimozione della porzione carbossi-terminale della TnI dall'actina, alterando la mobilità e la flessibilità della troponina e della tropomiosina sul filamento di actina, consentendo la contrazione.

1.2 Struttura della proteina

La cTnI è una proteina di 24kDa composta da 210 aminoacidi ed è espressa esclusivamente nel muscolo cardiaco adulto. È una proteina modulare, la cui architettura riflette la complessità della sua funzione regolatoria. Sulla base di studi di cristallografia a raggi X, spettroscopia NMR e analisi biochimiche sistematiche, la cTnI può essere divisa in cinque regioni funzionali: (2)

1. Residui 1-30: estensione N-terminale cardio-specifica, assente nelle isoforme TnI veloci e lente; contiene i siti di fosforilazione della proteina chinasi A (PKA) in posizione Ser-23 e Ser-24. La fosforilazione beta-adrenergica determina una riduzione di sensibilità al Ca^{2+} del miofilamento, accelerando il rilassamento cardiaco. Questa regione è considerata il mediatore principale della risposta inotropa e lusitropa alla stimolazione adrenergica.
2. Residui 42-136: questa regione forma con cTnC (residui 93-161) e cTnT (residui 203-271) un'ampia struttura elicoidale rigida altamente conservata, denominata "braccio IT", responsabile della stabilizzazione strutturale del complesso della troponina.
3. Residui 128-147: regione inibitoria (IR) che, in assenza di Ca^{2+} , si lega alla superficie dell'actina, mantenendo il miofilamento nello stato inattivo. L'interazione IR-actina è il meccanismo fondamentale di inibizione dell'ATPasi acto-miosinica: questa regione adotta una conformazione estesa che avvolge il filamento sottile, ostruendo il sito di legame della miosina sull'actina.

4. Residui 148-167: regione switch (SR). Quando il Ca^{2+} si lega al dominio N-terminale di cTnC, determina in quest'ultima l'apertura di una tasca idrofobica che accoglie la SR sottraendola all'actina e attivando la contrazione. La SR è pertanto il mediatore chiave della transizione dallo stato inattivo a quello attivo del miofilamento.
5. Residui 168-210: dominio mobile C-terminale (CMD), che costituisce un sito di legame secondario per l'actina in assenza di Ca^{2+} e interagisce con la tropomiosina, contribuendo alla stabilizzazione del segmento sottile nello stato inattivo. Alcuni studi hanno mostrato che gli ultimi 20 aminoacidi del segmento C-terminale (191-210), codificati dall'esone 8, fungono da struttura allosterica modulata dal Ca^{2+} , stabilizzando il filamento sottile sia nello stato attivo che in quello inattivo. (3)

La prima struttura ad alta risoluzione del core del complesso della troponina cardiaca umana fu determinata da Takeda et al. nel 2003 mediante cristallografia a raggi X a 2.6 Å di risoluzione. (4)

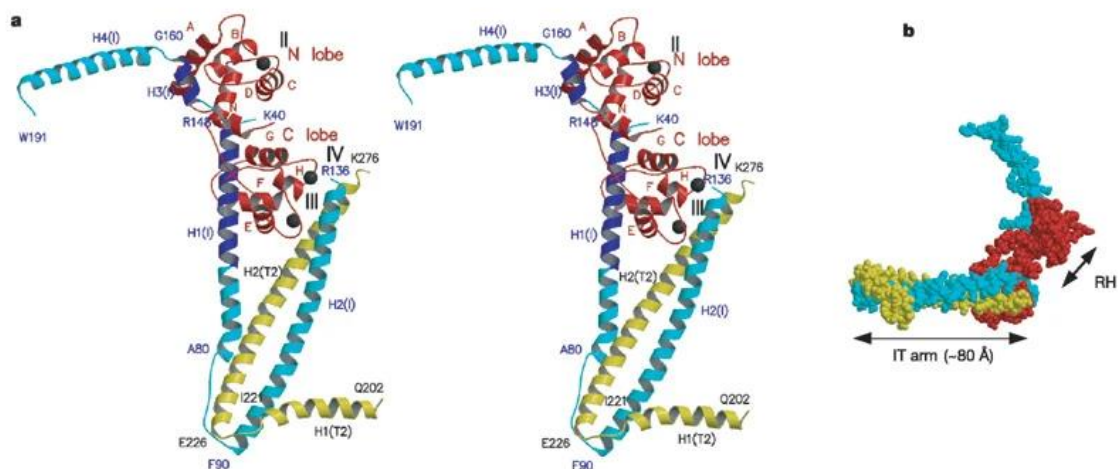


Immagine 1: struttura ad alta risoluzione del core del complesso della troponina cardiaca umana. TnI è colorata in ciano, TnC e TnT rispettivamente in rosso e giallo.

Mediante questo studio si è scoperto che il complesso è dominato da alfa-eliche disposte in configurazioni specifiche: il braccio IT forma una struttura coiled-coil che funge da impalcatura rigida, mentre la regione inibitoria e di switch di cTnI emergono da questa struttura in forme diverse a seconda della presenza o assenza di Ca^{2+} . Tuttavia, questo studio non descrisse in modo completo la porzione N-terminale e il

dominio C-terminale a causa della loro elevata flessibilità, che ne impedì la cristallizzazione in forma ordinata.

Successivi studi condotti da Li et al. e Bhattacharya et al. fornirono informazioni strutturali sui segmenti flessibili di cTnI, dimostrando che il CMD adotta molteplici conformazioni in equilibrio dinamico: presenta proprietà caratteristiche delle “proteine intrinsecamente disordinate” (intrinsically disordered proteins, IDP). (5)

Il disordine conformazionale è una proprietà essenziale: la flessibilità del CMD consente interazioni con molteplici partner molecolari (actina, tropomiosina, cTnC), permettendo al sistema di rispondere dinamicamente alle variazioni di Ca intracellulare.

Le cardiomiopatie

2.1 Definizione - Linee Guida ESC 2023

Le linee guida ESC 2023 per il management delle cardiomiopatie le definiscono come disturbi del miocardio in cui quest'ultimo è strutturalmente e funzionalmente anomalo, in assenza di coronaropatia, ipertensione, valvulopatia e cardiopatia congenita sufficienti a giustificare l'anomalia miocardica osservata.

La definizione per esclusione è fondamentale dal punto di vista clinico: possiamo distinguere infatti le cardiomiopatie primitive dalle forme secondarie e orientare il percorso diagnostico verso l'identificazione di una causa idiopatica, genetica o infiltrativa.

L'approccio delle linee guida ESC è detto "phenotype-first", il quale conduce a una categorizzazione morfofunzionale che identifica cinque fenotipi principali: cardiomiopatia ipertrofica (HCM), dilatativa (DCM), non dilatativa del ventricolo sinistro (NDLVC), aritmogena del ventricolo destro (ARVC) e restrittiva (RCM). (6)

Da uno studio svedese condotto tra il 2004 e il 2023 risulta che la prevalenza complessiva delle cardiomiopatie si è più che raddoppiata nel corso di due decenni, con una prevalenza di 5 su 1.000 negli uomini e 3 su 1.000 nelle donne nel 2023. È emerso che il sottotipo più comune è il dilatativo (3 su 1.000 negli uomini, 1 su 1.000 nelle donne), seguito dall'ipertrofico (1 su 1.000 negli uomini, 0,5 su 1.000 nelle donne). Le cardiomiopatie sono state associate a un sostanziale eccesso di mortalità rispetto alla popolazione generale, che va da un aumento di 32 volte negli uomini più giovani a un aumento di 2 volte nei pazienti più anziani. (7)

Le mutazioni del gene TNNI3 sono correlate principalmente a 3 fenotipi: ipertrofico, restrittivo e dilatativo.

2.2 Cardiomiopatia ipertrofica (HCM)

La cardiomiopatia ipertrofica è definita come un aumento dello spessore della parete del ventricolo o della massa ventricolare sinistra, non spiegabile esclusivamente da condizioni di sovraccarico ventricolare; può essere associata o meno a ipertrofia del ventricolo destro. (6)

È una patologia miocardica ereditaria abbastanza comune, con una prevalenza di circa 1:500 nella popolazione generale: essa rappresenta la causa principale di morbidità e morte cardiaca improvvisa, in particolare nei giovani adulti e negli atleti. (8)

Tra i geni implicati nell'HCM, i due più prevalenti sono MYBPC3 e MYH7, responsabili insieme di circa il 70-80% dei casi geneticamente confermati e di circa il 35% di tutti i casi clinicamente diagnosticati di HCM.

MYBPC3 codifica per la proteina C di legame della miosina cardiaca, mentre MYH7 codifica per la catena pesante della β -miosina; entrambe sono componenti critiche del filamento spesso del sarcomero. Le varianti patogene rimanenti riguardano principalmente altri geni del filamento spesso (MYL2, MYL3) e proteine del filamento sottile (TNNT2, TNNI3, TNNC1, ACTC1) o componenti del disco Z.

Nonostante il pattern autosomico dominante, fino al 40% dei pazienti rimane genotipo-negativo. (9)

Il meccanismo centrale alla base dell'HCM è un'aumentata sensibilità dei miofilamenti al Ca^{2+} . Questa genera:

- Aumento della contrazione sistolica con possibile ostruzione del tratto di efflusso del ventricolo sinistro (LVOTO);
- Rilassamento diastolico alterato (insufficienza diastolica);
- Aumento del consumo energetico, con conseguente ischemia miocardica;
- Fibrosi interstiziale progressiva, inizialmente come risposta adattativa, che evolve in maladattativa.

La diagnosi si basa su ECG, ecocardiogramma (gradiente LVOT > 30 mmHg a riposo o sotto sforzo), RMC e test genetico.

2.3 Cardiomiopatia restrittiva (RCM)

La cardiomiopatia restrittiva è caratterizzata da un aumento della rigidità miocardica, con conseguente aumento rapido della pressione ventricolare, associato a piccoli incrementi del volume di riempimento. In particolare, nella cardiomiopatia restrittiva coesistono una fisiopatologia restrittiva persistente, la disfunzione diastolica, ventricoli non dilatati e dilatazione atriale, indipendentemente dallo spessore della parete ventricolare e dalla funzione sistolica.

Quella restrittiva è la meno comune tra le cardiomiopatie e può essere idiopatica, familiare o secondaria a patologie sistemiche. L'RCM può essere ereditaria o acquisita ed è classificata in:

- Infiltrativa: da amiloidosi (causa più comune nei Paesi sviluppati), sarcoidosi.
- Da malattie da accumulo: emocromatosi, malattia di Gaucher, malattia di Fabry
- Non infiltrativa: fibrosi idiopatica, sclerodermia, forme sarconerliche genetiche
- Endomiocardica: fibrosi endomiocardica, sindrome di Löffler.

Il comune denominatore fisiopatologico è l'eccessiva rigidità miocardica che impedisce il normale riempimento ventricolare: ne consegue un aumento delle pressioni di riempimento, trasmesso in maniera retrograda agli atri e alla circolazione venosa polmonare e sistemica, portando a scompenso cardiaco congestizio.

Il classico reperto emodinamico in RCM è il segno "dip and plateau" o "square root sign", dato da pressioni sistoliche elevate e una rapida equalizzazione delle pressioni di riempimento di tutte le camere cardiache durante la diastole. La prognosi è generalmente sfavorevole nonostante un trattamento medico ottimale. (10)

2.4 Cardiomiopatia dilatativa (DCM)

La cardiomiopatia dilatativa è definita dalla presenza di dilatazione ventricolare sinistra e da disfunzione sistolica totale o localizzata, non spiegabili esclusivamente da coronaropatia o condizioni di sovraccarico.

La DCM è la forma di cardiomiopatia più comune negli adulti, con un'incidenza di circa 3 su 1.000 negli uomini e 1 su 1.000 nelle donne. Negli ultimi due decenni si è registrato un aumento delle diagnosi. (7)

Le cause di DCM sono molteplici:

- Genetiche: mutazioni di LMNA, TTN, SCN5A e di altri geni sarcomerici e del citoscheletro;
- Infettive: miocarditi virali, in particolare da enterovirus;
- Tossiche: da alcol, cocaina, chemioterapici (antracicline);
- Altre: autoimmuni, peri-partum e idiopatiche;

Il meccanismo alla base della DCM è la riduzione della forza contrattile, che porta a una progressiva dilatazione del ventricolo sinistro come meccanismo compensatorio, seguita da disfunzione diastolica; ciò determina l'attivazione dei sistemi neuro-ormonali (RAAS, sistema adrenergico), che inizialmente portano ad un compenso ma a lungo termine contribuiscono a un rimodellamento cardiaco sfavorevole.

La diagnosi si basa su Ecocardiogramma (FE<40%, dilatazione VS), RCM (fibrosi interstiziale diffusa al LGE), ECG e test genetico. La sopravvivenza a 5 anni è stimata intorno al 50%. (7)

2.5 Mutazioni di TNNI3 e cardiomiopatie: associazione e meccanismi

La prevalenza delle mutazioni di TNNI3 è inferiore al 5% di quelle riscontrate nei diversi fenotipi di cardiomiopatie. La maggior parte di queste mutazioni è stata riscontrata in pazienti con HCM (85%) e RCM (8%), raramente in DCM. Le manifestazioni fenotipiche sono eterogenee, spaziano da forme clinicamente lievi a forme severe con prognosi infausta, spesso esitanti in MCI. (11)

2.5.1 TNNI3 e cardiomiopatia ipertrofica

Le prime mutazioni di TNNI3 associate a HCM furono descritte nel 1997 da Kimura et al. in una grande famiglia coreana: una sostituzione R145G, una sostituzione R145Q, una

sostituzione R162W, una delezione Δ K183, una sostituzione G203S e una sostituzione K206Q. (12)

Il meccanismo molecolare comune è stato individuato in studi funzionali in vitro:

- Le mutazioni missenso R145G e R145Q nella regione inibitoria della cTnI riducono l'attività inibitoria intrinseca della cTnI senza modificarne l'affinità per l'actina.
- La mutazione R162W nella seconda regione di legame alla TnC e la delezione Δ K183 nella regione di legame all'actina-tropomiosina riducono l'affinità della cTnI per l'actina senza modificare l'attività inibitoria intrinseca.
- Altre cinque mutazioni (R145G, R145Q, R162W, Δ K183, K206Q) aumentano la sensibilità al Ca^{2+} , con incremento dell'attività ATPasica delle miofibrille e dello sviluppo di forza nelle fibre muscolari cardiache.

2.5.2 TNNI3 e cardiomiopatia restrittiva

Sei varianti missenso di TNNI3 sono state associate a mutazioni genetiche specifiche per RCM: p.D190H, p.R192H, p.K178E, p.R145W, p.A171T e p.L144Q. Queste mutazioni determinano un aumento della sensibilità delle miofibrille al Ca^{2+} e influenzano l'attività ATPasica basale e massima dell'actomiosina. (13)

Una delle prime famiglie descritte con RCM da mutazione di TNNI3 presentava la mutazione D190G nell'esone 8: nella famiglia si registravano numerose morti improvvise precoci, suggerendo che tale sostituzione sia associata a un fenotipo avverso. L'Asp190 si trova nella regione C-terminale conservata, necessaria per la normale funzione inibitoria della troponina I. (14)

2.5.3 TNNI3 e cardiomiopatia dilatativa

Mentre le mutazioni di missenso in eterozigoti di TNNI3 sono state a lungo associate a cardiomiopatie ipertrofiche e restrittive autosomiche dominanti, il ruolo delle mutazioni nulle TNNI3 è stato più dibattuto a causa della scarsità e della debole caratterizzazione dei casi segnalati e della bassa penetranza dei genotipi eterozigoti. Negli ultimi anni,

tuttavia, è stata avvalorata l'ipotesi che le mutazioni nulle TNNT3 bialleliche causino una grave forma di cardiomiopatia dilatativa neonatale. (14)

2.5.4 Variabilità fenotipica e correlazioni genotipo-fenotipo

Un aspetto clinicamente significativo è che la stessa mutazione di TNNT3 può associarsi a fenotipi diversi anche all'interno della stessa famiglia. Questo è stato documentato con la mutazione R145W: è stata descritta una famiglia in cui la mutazione TNNT3 p.Arg145Trp si associava a espressione fenotipica diversa tra i membri, incluse forme ipertrofiche e restrittive. È stato evidenziato che anche il numero di mutazioni, non solo il tipo, modifica l'entità dell'ipertrofia ventricolare sinistra nei pazienti con HCM. (15)

2.5.5 Meccanismo unificante: l'ipersensibilità al Ca^{2+}

Il meccanismo molecolare che accomuna la grande maggioranza delle mutazioni patogene di TNNT3 è l'alterazione della sensibilità al Calcio del sarcomero:

- Nelle forme HCM, l'aumento della sensibilità al Ca^{2+} porta a un aumento della contrazione e a disfunzione diastolica, con ipertrofia compensatoria.
- Nelle forme RCM, l'aumento della sensibilità al Ca^{2+} causa un rilassamento miocardico incompleto, con irrigidimento ventricolare.
- Nelle forme DCM la riduzione della quantità di cTnI funzionante determina una diminuzione della forza contrattile e dilatazione compensatoria.

Questo spiega perché fenotipi diversi possano derivare dallo stesso gene o addirittura dalla stessa mutazione: la variabilità clinica è influenzata da fattori genetici, ambientali ed epigenetici.

Genetica e mutazioni del gene TNNI3

La genetica è la branca della biologia che studia come i caratteri ereditari vengono codificati, trasmessi ed espressi. Si articola in quattro branche principali:

- Genetica classica: studia la trasmissione dei geni tra le generazioni;
- Genetica molecolare: analizza struttura e funzione dei geni a livello biochimico;
- Genetica di popolazione: studia la distribuzione degli alleli nella popolazione;
- Genetica quantitativa: analizza i caratteri descrivibili mediante parametri numerici;

La Next Generation Sequencing (NGS), ancor più del metodo Sanger, sta rivoluzionando il campo della genomica e sta rapidamente trasformando la diagnosi clinica e la medicina di precisione. Questa tecnologia di sequenziamento avanzata consente l'analisi rapida ed economica di dati genomici su larga scala, consentendo un'esplorazione completa del panorama genetico delle malattie. La NGS ha dimostrato di essere un potente strumento per identificare le varianti che causano malattie, permettendo una diagnosi accurata e precoce delle malattie genetiche. Inoltre, NGS facilita l'identificazione di nuovi geni e varianti associati alla malattia, aiutando nello sviluppo di terapie mirate e strategie di trattamento personalizzate.

Nonostante ciò, il Sequenziamento Sanger rappresenta ancora il gold standard per la verifica delle varianti ma, avendo un throughput limitato (quantità di dati trasmessi nell'unità di tempo) e per ragioni di costo, permette l'analisi di uno o pochi geni per paziente.

3.1 Differenze tra mutazioni e polimorfismi

La costituzione genica di un individuo è definita genotipo, mentre le manifestazioni osservabili derivanti dall'interazione tra genotipo e ambiente definiscono il fenotipo.

Una mutazione consiste in una modifica permanente della normale sequenza del DNA (wild-type).

Un polimorfismo è la presenza di due o più alleli associati a un dato locus nella stessa popolazione. Il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) è il tipo più comune di modificazione del genoma umano.

Le varianti del DNA vengono classificate come alterazioni rispetto a un genoma di riferimento: i polimorfismi a singolo nucleotide e le mutazioni sono definiti rispettivamente come varianti rilevabili in più o meno dell'1% della popolazione.

I cambiamenti nella sequenza del DNA possono quindi essere:

- Privi di effetti fenotipici: polimorfismi (frequenza > 1%) o varianti private (frequenza <1%);
- Con effetti sul fenotipo: le mutazioni, che influenzano funzione e quantità del prodotto della trascrizione genica.

3.2 Classificazione delle mutazioni

1. In base all'estensione della mutazione

Puntiformi: variazioni della normale sequenza del DNA che coinvolgono uno o pochi nucleotidi. Si dividono in:

- Sostituzione: i due tipi principali sono le transizioni, che riguardano la sostituzione di una base con un'altra della stessa natura chimica, e le trasvezioni, in cui la base azotata viene sostituita con una di natura chimica diversa.
- Delezione: perdita di una singola coppia di basi azotate.
- Inserzione: aggiunta di una singola coppia di basi nella sequenza.

2. In base all'effetto sul prodotto genico

- Silenti: modificano la tripletta codificante ma il codone neoformato determina la traduzione dello stesso aminoacido della sequenza wild-type, grazie al processo di degenerazione del codice genetico.
- Missenso: portano alla formazione di un nuovo codone che codifica per un aminoacido diverso dall'originale, con possibile alterazione della funzione proteica. Le conseguenze funzionali delle mutazioni missenso dipendono dalla posizione e dalla natura dell'aminoacido sostituito.

- Non senso: convertono un codone di senso in un codone di stop prematuro (PTC), portando alla terminazione prematura della traduzione, con produzione di proteine tronche non funzionali.
- Delezioni/inserzioni in frame: perdita o inserzione di un numero di nucleotidi multiplo di 3 nella regione codificante. La cornice di lettura rimane intatta ma si perdono/aggiungono aminoacidi alla catena polipeptidica.
- Delezioni/inserzioni frameshift: alterano la sequenza aminoacidica a valle del punto della mutazione, spostando la cornice di lettura. Producono con alta probabilità proteine non funzionali, a meno che non avvengano nelle regioni terminali del gene.
- Mutazioni di splicing: colpiscono le sequenze regolatorie dello splicing creando siti di splicing aberranti o criptici, che si traducono in proteine aberranti. Portano a esclusione dell'esone dall'mRNA, ritenzione dell'introne, inclusione di parte dell'introne nel trascritto maturo ed esclusione parziale dell'esone.

3. In base all'effetto funzionale

- Con perdita di funzione (Loss of function): azzerano o riducono l'attività della proteina. Sono spesso recessive, ma possono portare alla creazione di un fenotipo patologico anche in eterozigoti attraverso il meccanismo dell'aploinsufficienza, quando la riduzione del 50% del prodotto della trascrizione non è sufficiente a garantire la normale funzione.
- Con acquisizione di funzione (Gain of function): caratterizzate da una funzione anomala o potenziata della proteina alterata. Sono relativamente rare e possono interessare sia le regioni codificanti sia quelle regolatorie dell'espressione genica.

3.3 Cause delle mutazioni

I fattori che determinano l'insorgenza di mutazioni sono:

- Agenti ambientali - radiazioni ionizzanti, raggi UV, composti chimici mutageni;
- Fattori endogeni - depurinazione, deaminazione, danno da radicali liberi dell'ossigeno, errori nella replicazione e ricombinazione del DNA.

Le mutazioni che si verificano come eventi de novo durante la gametogenesi saranno presenti in tutte le cellule della discendenza, sia germinali che somatiche.

Porzione C-terminale del TNNI3 e mutazioni

Come già descritto nei precedenti capitoli, la TnI rappresenta la subunità inibitoria del complesso della troponina, il quale svolge un ruolo centrale nella regolazione Ca^{2+} -dipendente della contrazione del muscolo cardiaco.

Oltre 600 mutazioni del gene TNNI3 sono state associate a diverse forme di cardiomiopatia ereditaria, tra cui la cardiomiopatia ipertrofica (HCM), quella dilatativa (DCM) e quella restrittiva (RCM): ciò contribuisce a definire TNNI3 come uno dei geni più pleiotropici del contesto delle cardiomiopatie familiari.

È possibile, tramite un'analisi approfondita della struttura funzionale della proteina, comprendere le basi molecolari dell'associazione genotipo-fenotipo delle mutazioni, ponendo particolare attenzione alla porzione C-terminale, sede della maggioranza delle mutazioni patogenetiche documentate in letteratura.

Il dominio C-terminale di cTnI è il centro delle interazioni proteina-proteina, di fondamentale importanza per la regolazione del ciclo contrattile.

Le sue principali interazioni sono:

- Interazione con l'actina: in assenza di Ca^{2+} (diastole), il CMD si lega alla superficie della F-actina con un'affinità nell'ordine del micromolare, contribuendo insieme alla regione inibitoria al mantenimento dello stato "off" del miofilamento. Studi di cross-linking e biofisici condotti da Abbott et al. e Luo et al. hanno dimostrato che i residui C-terminali di cTnI stabilizzano la conformazione "bloccata" della tropomiosina sull'actina, ostruendo il sito di legame della miosina. In particolare, i residui basici del CMD (Lys-183, Arg-186, Lys-193, Arg-204) sembrano avere interazioni elettrostatiche con i residui acidi sulla superficie dell'actina, contribuendo significativamente all'energia di legame. (5,16)
- Interazione con la tropomiosina: permette la stabilizzazione della configurazione bloccata del filamento sottile. Studi di microscopia crioelettrica (crio-EM) condotti da Yamada et al. nel 2020 hanno rivelato che la porzione C-terminale contatta il modo specifico il secondo sito di legame della tropomiosina (Tm-site 2) nella regione di overlap tra molecole adiacenti di Tm, suggerendo un ruolo nel

mantenimento del meccanismo di cooperatività longitudinale del filamento sottile. (17)

Questa interazione è di particolare rilevanza al fine di comprendere gli effetti delle mutazioni patogenetiche, poiché anomalie in questa regione possono modificare la posizione di equilibrio della tropomiosina sull'actina, aumentando la sensibilità al Ca^{2+} del miofilamento anche in sua assenza.

- Interazione con cTnC: sebbene l'interazione primaria tra cTnI e cTnC avvenga nella regione switch (SR), alcuni studi hanno documentato un'interazione secondaria tra CMD e il lobo C-terminale di cTnC, implicata nella modulazione della sensibilità al Ca^{2+} e nella stabilizzazione del complesso ternario. Perry nel 1999 ha sollevato l'ipotesi che questa interazione secondaria funzioni da modulatore allosterico, amplificando la risposta Ca^{2+} -dipendente del sistema. (18,19)

4.1 Ruolo del dominio C-terminale nella regolazione del ciclo contrattile

Il meccanismo molecolare attraverso cui il CMD di cTnI partecipa alla regolazione della contrazione cardiaca può essere schematizzato nel modello a tre strati del filamento sottile proposto da McKillop e Geeves nel 1993: (20)

1. Stato “bloccato”: in assenza di Ca^{2+} , la regione inibitoria (IR) e il CMD si legano all'actina, mantenendo la tropomiosina in posizione “bloccante”, che impedisce l'accesso della miosina al sito di legame sull'actina. Il CMD contribuisce alla stabilizzazione di questo stato attraverso le sue interazioni con actina e Tm.
2. Stato “chiuso”: con l'aumento del Ca^{2+} intracellulare, questo si lega al dominio N-terminale di cTnC inducendo una modificazione conformazionale che porta la SR di TnI a legarsi alla tasca idrofobica di cTnC, riducendo parzialmente l'interazione IR-actina. In questo stato, la Tm si sposta parzialmente, consentendo un legame debole della miosina.
3. Stato “aperto”: il legame forte della miosina all'actina determina un ulteriore spostamento della Tm verso la posizione completamente aperta, consentendo la

formazione di cross-bridge e la generazione di forza contrattile. In questo stato, il CMD si dissocia completamente dall'actina e dalla Tm.

Mutazioni patogenetiche nel CMD alterano l'equilibrio tra questi tre stati, tipicamente spostandolo verso lo stato “aperto” anche a basse concentrazioni di Ca^{2+} , determinando un aumento della sensibilità al Ca^{2+} del miofilamento.

Inoltre, la cTnI contiene siti di fosforilazione aggiuntivi nel dominio C-terminale oltre a quelli presenti nell'N-terminale (Ser-23/Ser-24), che modulano la funzione contrattile.

La fosforilazione del CMD da parte di PKC è particolarmente rilevante in condizioni di stress emodinamico e nello scompenso cardiaco e si propone come un meccanismo adattativo che modifica le proprietà meccaniche del sarcomero in risposta a stimoli patogeni.

4.2 Mutazioni patogenetiche della porzione C-Terminale di TNNI3

Le mutazioni in TNNI3 rappresentano circa l' 1-5% di tutte le mutazioni sarcomeriche identificate nei pazienti con HCM.

Nello studio di Walsh et al. (2017), condotto su 6.047 pazienti con HCM confrontati con 53.856 campioni di riferimento, si conferma che TNNI3 è un gene HCM di alta penetranza. (21)

Nella coorte di pazienti con mutazioni del filamento sottile analizzata da Coppini et al. (2014), le mutazioni di TNNI3 rappresentavano il 30% dei casi, configurandosi come il secondo gene più frequentemente mutato dopo TNNT2. (22)

La distribuzione delle mutazioni patogenetiche lungo la sequenza proteica di cTnI non è uniforme: la vasta maggioranza delle mutazioni associate ad HCM e RCM si concentra nel dominio C-terminale e nella regione switch (residui 128–210), mentre le mutazioni associate a DCM sono più rare e dislocate lungo l'intera proteina. Questa distribuzione topografica riflette il ruolo critico del dominio C-terminale: mutazioni in questa regione tendono ad alterare la capacità di cTnI di mantenere lo stato inibito in diastole, con conseguente aumento patologico della sensibilità al Ca^{2+} .

- NM_000363.5(TNNI3):c.532A>G (p.Lys178Glu)

La Lys178Glu è una delle mutazioni identificate da Mogensen et al. (2003) come causa di RCM in un paziente di 16 anni con scompenso cardiaco restrittivo e successivo trapianto cardiaco a 19 anni. (23)

Gomes et al. (2005) dimostrarono che questa mutazione determina un aumento critico dell'attività ATPasica basale e una quasi completa incapacità di inibire l'ATPasi actomiosinica in presenza di una bassa concentrazione di Ca^{2+} , configurandosi come una delle mutazioni con effetto più marcato di "guadagno di funzione" documentate per cTnI. (12) In ClinVar è classificata come "Pathogenic".

- NM_000363.5(TNNI3):c.547A>G (p.Lys183Glu)

La mutazione Lys183Glu è stata descritta da Van Driest et al. (2003) e Konno et al. (2005) in pazienti HCM. (24) La Lys-183 si trova nel dominio mobile C-terminale in una regione implicata nelle interazioni elettrostatiche con l'actina. L'inversione di carica o la neutralizzazione di questo residuo basico portano a un'alterazione dell'energia di legame nell'interazione cTnI-actina, riducendo l'inibizione basale e aumentando la sensibilità al Ca^{2+} . In ClinVar è classificata come "Pathogenic".

- NM_000363.5(TNNI3):c.557G>A (p.Arg186Gln)

La Arg186Gln è una delle mutazioni di TNNI3 documentate nella coorte di pazienti analizzata nello studio di Coppini et al. (2014), dove è associata a un fenotipo HCM con disfunzione diastolica progressiva. (22) L'Arg186 si trova in una regione di contatto del CMD con l'actina e la tropomiosina. Alcuni studi suggeriscono che questo residuo contribuisce all'energia di legame dell'interazione cTnI-actina attraverso ponti salini con residui acidi sull'actina. (25) La sostituzione con glutammina neutra riduce questa interazione, spostando l'equilibrio verso lo stato attivo del miofilamento. In ClinVar è classificata come "Pathogenic/Likely Pathogenic".

- NM_000363.5(TNNI3):c.585C>G (p.Ile195Met)

La mutazione Ile195Met è stata identificata da Van Driest et al. (2003) in pazienti HCM americani ed è riportata anche nella revisione sistematica di Willott et al. (2010). (26,27) L'isoleucina in posizione 195 si trova nel segmento finale del CMD, in una regione per la quale i dati strutturali atomici sono più limitati, data l'elevata flessibilità conformazionale. Studi funzionali specifici su questa variante sono scarsi in letteratura, in ClinVar è classificata come "VUS".

- NM_000363.5(TNNI3):c.586G>A (p.Asp196Asn)

La Asp196Asn è stata documentata in pazienti con HCM da Van Driest et al. (2003), Konno et al. (2005) e Coppini et al. (2014). (22,24,27)

In Coppini et al. (2014) è una delle varianti TNNI3 più rappresentate nella coorte di pazienti con HCM da mutazioni del filamento sottile. L'acido aspartico in posizione 196 è un residuo acido nel CMD che partecipa alle interazioni con l'actina; la sostituzione con asparagina neutra altera queste interazioni. Studi di Willott et al. (2010) la classificano nella categoria delle mutazioni che aumentano la sensibilità al Ca^{2+} attraverso riduzione dell'inibizione del miofilamento. (26) In ClinVar è classificata come "Pathogenic/Likely Pathogenic".

- NM_000363.5(TNNI3):c.596G>A (p.Ser199Asn)

La Ser199Asn è stata documentata da Van Driest et al. (2003) e Konno et al. (2005) in pazienti con HCM. (24,27) La serina in posizione 199 è un potenziale sito di fosforilazione ROCK e la sostituzione con l'asparagina può alterare sia le interazioni strutturali del CMD, sia la regolazione post-traduzionale della proteina. È classificata in ClinVar come "Pathogenic/Likely Pathogenic".

- NM_000363.5(TNNI3):c.607G>A (p.Gly203Ser)

Le mutazioni in posizione 203, particolarmente la Gly203Ser, sono state documentate in famiglie con HCM da Niimura et al. (2002) e Van Driest et al. (2003). (27,28) Sono associate a un rischio elevato di aritmie ventricolari e morte improvvisa in giovani atleti.

La glicina in posizione 203 è un residuo strutturalmente importante che consente la flessibilità conformazionale del CMD: la sostituzione con residui ingombranti (arginina o serina) può ridurre questa flessibilità, alterando la dinamica dell'interazione del CMD con i partner molecolari. In ClinVar la G203R è classificata come “Pathogenic”.

- NM_000363.5(TNNI3):c.610C>T(p.Arg204Cys)/
NM_000363.5(TNNI3):c.611G>A (p.Arg204His)

Le mutazioni nell'arginina in posizione 204 sono tra le mutazioni TNNI3 più frequentemente identificate e studiate. La Arg204His è stata documentata sia in associazione ad HCM sia a RCM, configurandosi come una delle rare mutazioni di TNNI3 correlabile a entrambi i fenotipi. (26)

Willott et al. (2010) la classificano come mutazione con doppia associazione fenotipica (HCM e RCM), evidenza del fatto che la severità del fenotipo può variare considerevolmente tra portatori della stessa mutazione in famiglie diverse, a suggerire un ruolo significativo dei geni modificatori. La Arg204Cys e la Arg204His sono classificate in ClinVar come “Pathogenic/ Likely Pathogenic”.

- NM_000363.5(TNNI3):c.616A>C (p.Lys206Gln)

La Lys206Gln è stata documentata da Niimura et al. (2002) in pazienti anziani con HCM. (28) La lisina in posizione 206 si trova in una regione di cui le proprietà funzionali sono meno caratterizzate rispetto ai residui più prossimali. Studi di Deng et al. (2003) dimostrarono che questa mutazione, insieme alla Gly203Ser, altera la risposta alla fosforilazione PKA del miofilamento cardiaco, suggerendo un meccanismo patogenico additivo che coinvolge sia le alterazioni strutturali del CMD, sia la perturbazione della risposta adrenergica. (29) È classificata in ClinVar come “Pathogenic”.

4.3 Correlazioni genotipo-fenotipo nelle mutazioni C-terminali di TNNI3

4.3.1 Mutazioni C-terminali e cardiomiopatia ipertrofica

Le mutazioni del dominio C-terminale di cTnI associate ad HCM producono un fenotipo caratterizzato da alcune peculiarità.. Come riportato da Coppini et al. (2014), i pazienti con mutazioni HCM-associate di TNNI3 presentano:

- Ipertrofia di grado lieve-moderato, con distribuzione frequentemente atipica (apicale o concentrica nel 41% dei pazienti con TNNI3).
- Minore frequenza di ostruzione del tratto di efflusso ventricolare (LVOTO).
- Maggiore prevalenza di disfunzione diastolica avanzata, con pattern restrittivo nel 16% dei pazienti.
- Elevata prevalenza di fibrosi miocardica estesa alla RM cardiaca (LGE >30% della massa ventricolare nel 27% dei pazienti con HCM associata a mutazioni del filamento sottile).
- Progressione verso disfunzione sistolica (LVEF <50%) o diastolica restrittiva nel 29% dei pazienti al follow-up a 4.7 anni. (22)

Queste caratteristiche fenotipiche riflettono il meccanismo molecolare delle mutazioni della porzione C-terminale: l'aumento della sensibilità Ca^{2+} del miofilamento determina un'attivazione inappropriata del sarcomero in diastole, con conseguente aumento del costo energetico del ciclo di contrazione-rilassamento, stress cardiomiocitario cronico, rimodellamento fibrotico progressivo e disfunzione diastolica grave. (30)

4.3.2 Mutazioni C-Terminali e cardiomiopatia restrittiva

Le mutazioni TNNI3 rappresentano la causa genetica più frequente di RCM familiare identificata fino ad oggi.

Mogensen et al. (2003) identificarono mutazioni TNNI3 come causa di RCM idiopatica in nove pazienti non correlati, documentando l'associazione tra RCM e mutazioni nei residui 144, 145, 178, 192. (23) La caratteristica distintiva delle mutazioni TNNI3

associate a RCM, rispetto a quelle associate ad HCM, è l'entità dell'aumento della sensibilità Ca^{2+} : Gomes et al. (2005) dimostrarono che le mutazioni RCM producono aumenti della sensibilità Ca^{2+} significativamente maggiori rispetto alle mutazioni HCM nella stessa posizione, suggerendo che l'intensità dell'alterazione molecolare definisce la severità del fenotipo clinico. (12)

Clinicamente, la RCM da mutazioni di TNNI3 è caratterizzata da:

- Esordio tipicamente in età pediatrica o giovanile (prima-seconda decade di vita).
- Grave disfunzione diastolica con funzione sistolica preservata nelle fasi iniziali.
- Dilatazione biatriale progressiva e ipertensione polmonare.
- Alta incidenza di morte cardiaca improvvisa e di progressione verso lo scompenso cardiaco terminale.
- Frequente indicazione al trapianto cardiaco in età giovanile. (23,31)

4.3.3 Mutazioni con doppia associazione fenotipica HCM-RCM

Una caratteristica peculiare di alcune mutazioni del dominio C-terminale di cTnI è la loro associazione a fenotipi sovrapposti di HCM e RCM all'interno della stessa famiglia o nello stesso paziente.

Mogensen et al. (2003) osservarono che la mutazione D190G determina un fenotipo misto HCM-RCM, con ipertrofia concentrica associata a pattern di riempimento restrittivo. (23)

Kubo et al. (2007) condussero uno studio sistematico sulla prevalenza e sul significato clinico del fenotipo restrittivo-ipertrofico nell'HCM, documentando che le mutazioni TNNI3 sono la causa genetica più frequente di questo fenotipo misto.

La coesistenza di ipertrofia e pattern restrittivo riflette la progressione naturale della malattia: nelle fasi iniziali la risposta ipertrofica compensa l'aumento della rigidità diastolica ma, con il progredire della fibrosi e del rimodellamento, il fenotipo evolve verso la forma puramente restrittiva. (31,32)

4.4 Basi molecolari dell'aumento della sensibilità Ca^{2+} nelle mutazioni C-terminali

L'aumento della sensibilità al Ca^{2+} del miofilamento è il fenomeno molecolare alla base della maggior parte delle mutazioni del dominio C-terminale di cTnI associate ad HCM e RCM. I meccanismi principali attraverso cui le mutazioni C-terminali producono questo effetto sono:

1. Riduzione dell'interazione IR/CMD-actina: mutazioni che neutralizzano o invertono le cariche di residui basici chiave (Arg145, Lys183, Arg186, Arg204) nel CMD riducono le interazioni elettrostatiche con l'actina (acida), diminuendo l'energia di legame e spostando l'equilibrio del filamento sottile verso lo stato aperto anche a basse concentrazioni di Ca^{2+} . (16,25)
2. Modifica conformazionale del dominio inibitore: mutazioni che introducono perturbazioni conformazionali o alterano il volume della catena laterale in posizioni critiche modificano la geometria dell'interazione cTnI-actina, riducendo l'efficacia dell'inibizione allo stato basale. (12)
3. Alterazione dell'interazione cTnI-tropomiosina: mutazioni nel CMD che perturbano l'interazione con la tropomiosina riducono la stabilizzazione dello stato "bloccato" del filamento, aumentando la sensibilità Ca^{2+} attraverso un meccanismo indipendente dall'interazione con l'actina. (17,20)
4. Disaccoppiamento della risposta alla fosforilazione PKA: alcune mutazioni del CMD alterano la risposta del miofilamento alla fosforilazione PKA dei residui Ser-23/Ser-24 dell'N-terminale, riducendo l'efficienza del disaccoppiamento Ca^{2+} -sensibilità mediato dalla stimolazione adrenergica. (29,33)

4.5 Conseguenze a livello cardiomiocitario e tissutale

L'aumento cronico della sensibilità Ca^{2+} del miofilamento determina una cascata di effetti a livello cardiomiocitario e tissutale che spiegano il fenotipo clinico delle mutazioni C-terminali di TNNI3:

- Aumentato del consumo energetico: l'attivazione inappropriata del sarcomero durante la diastole aumenta il costo energetico della contrazione e del rilassamento muscolare, determinando depauperamento energetico miocardico e attivazione di pathway di signaling ipertrofico. (34)
- Ritardo nel rilassamento miocardico: l'aumentata sensibilità Ca^{2+} prolunga la durata della contrazione e ritarda il rilassamento attivo, aumentando la pressione di riempimento diastolico. (35,36)
- Stimolazione di vie di segnalazione di ipertrofia/fibrosi: l'aumento prolungato della tensione sarcomerica e del consumo energetico attiva pathway di segnalazione (CaMKII, calcineurina-NFAT, Rho-kinasi) che promuovono la crescita ipertrofica cardiomiocitaria, la trasformazione fibroblastica e la deposizione di collagene interstiziale. (37,38)
- Aumentato rischio aritmico: l'elevata sensibilità al Ca^{2+} del miofilamento aumenta l'affinità del filamento sottile per il Ca^{2+} libero citoplasmatico, alterando l'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare e predisponendo ad aritmie ventricolari da depolarizzazione ritardata. (39)

4.6 Ruolo delle mutazioni doppie

Come documentato da Maron et al. (2012) e da Arad et al. (2014), le mutazioni TNNI3 possono presentarsi associate a mutazioni di altri geni sarcomerici (MYBPC3, MYH7), determinando un fenotipo più grave rispetto alla singola mutazione portando all'effetto "doppia dose genica". (40)

In questi casi, il rischio di morte cardiaca improvvisa è aumentato anche in assenza dei fattori di rischio per HCM noti, con implicazioni importanti sulle scelte di prevenzione primaria, come l'impianto di un defibrillatore (ICD).

4.7 Implicazioni per il counseling genetico

Considerando l'elevata penetranza delle mutazioni patogeniche del dominio C-terminale di TNNI3, il counseling genetico familiare con screening a cascata dei familiari di primo grado è raccomandato dalle linee guida europee ESC 2014 e americane ACC/AHA 2011 per la cardiomiopatia ipertrofica. L'identificazione precoce di portatori asintomatici consente la sorveglianza clinica, la stratificazione del rischio aritmico e l'eventuale trattamento preventivo, con impatto potenzialmente significativo sulla prognosi. (41)

Mutazione Leu198Val

5.1 Introduzione e identificazione della variante

La mutazione Leu198Val del gene *TNNI3*, descritta in nomenclatura HGVS come c.592C>G p.(Leu198Val) secondo il trascritto di riferimento NM_000363.4 nel genoma hg19, è data dalla sostituzione di una leucina (aminoacido idrofobico, non polare) con una valina (aminoacido idrofobico, non polare) in posizione 198 della proteina troponina I cardiaca (cTnI).

La posizione 198 si colloca nel dominio mobile C-terminale di cTnI (residui 168–210), regione funzionalmente critica per la regolazione Ca^{2+} -dipendente della contrazione cardiaca e sede di numerose mutazioni patogeniche associate a cardiomiopatia ipertrofica HCM, RCM e, più raramente, DCM, come dettagliatamente discusso precedentemente.

5.2 Storia della mutazione

La prima documentazione in letteratura scientifica della mutazione Leu198Val di *TNNI3* risale al 2012, con lo studio di Maron et al. focalizzato sulle doppie mutazioni sarcomeriche come potenziale fattore di rischio per morte cardiaca improvvisa, in cui inclusero la Leu198Val. Una paziente, membro della famiglia denominata H290D, presentava una doppia mutazione MYBPC3 (Gln208His) e *TNNI3* (Leu198Val), con fenotipo HCM misto restrittivo-ipertrofico ad esordio in età adulta tardiva. (42)

Coppini et al. (2014), in uno studio multicentrico su 80 pazienti con HCM da mutazioni del filamento sottile (coorte comprendente centri italiani, americani e britannici), identificarono la Leu198Val tra le mutazioni di *TNNI3* presenti nella loro coorte, documentando un fenotipo caratterizzato da ipertrofia di grado lieve-moderato, disfunzione diastolica progressiva e aumentata prevalenza di fibrosi miocardica alla RM cardiaca. (22) In questo studio, i pazienti con mutazione di *TNNI3* mostravano distribuzione atipica dell'ipertrofia, apicale o concentrica nel 41% dei casi, coerentemente con il profilo fenotipico atteso per le mutazioni di questo gene.

Arad et al. (2014), nello studio “Merits and pitfalls of genetic testing in a hypertrophic cardiomyopathy clinic” presentarono dettagliatamente la famiglia H29OD, nella quale fu identificata la co-presenza delle varianti MYBPC3 Gln208His e TNNI3 Leu198Val. Il probando mostrava un fenotipo HCM con evoluzione restrittiva in età avanzata, con severa disfunzione diastolica; i due figli adulti (50 e 54 anni) risultavano asintomatici con Eco-Doppler ed ECG nella norma, e uno dei discendenti portava entrambe le mutazioni mentre l’altro la sola MYBPC3. Gli autori discussero le implicazioni della coesistenza delle due varianti e la difficoltà di attribuire il contributo specifico di ciascuna al fenotipo clinico. (40)

Otsuka et al. (2012) in uno studio sulla distribuzione delle mutazioni sarcomeriche in pazienti giapponesi con HCM familiare (112 probandi), identificarono la Leu198Val come una delle mutazioni TNNI3 presenti nella loro coorte documentando la sua presenza nella famiglia CM1590. (43)

Cava et al. (2021), in un case report pubblicato su Molecular Genetics and Metabolism Reports, attestarono la presenza della mutazione Leu198Val di TNNI3 in un probando di 24 anni con diagnosi di HCM non ostruttiva e QTc lungo, co-ereditata insieme alla variante KCNQ1 c.1781G>A p.(Arg594Gln). Gli autori condussero l’analisi mediante NGS su pannello multi-gene di 26 geni, confermando la variante mediante sequenziamento Sanger e classificandola come “Likely Pathogenic” secondo i criteri ACMG. (44)

5.3 Presenza nei database genetici

La variante c.592C>G p.(Leu198Val) di TNNI3 è registrata nei principali database internazionali:

- ClinVar (NCBI): la variante è presente in ClinVar con Variation ID 177694. La classificazione più recente è “Likely Pathogenic”.
- gnomAD v4.1.1 (Genome Aggregation Database): la frequenza allelica della variante nella popolazione generale è riportata come estremamente bassa, 0.000002.

5.4 Posizione della variante

La leucina in posizione 198 si trova in una regione del CMD che, sulla base di studi di mutagenesi sistematica e modellistica molecolare, sappiamo partecipare alle interazioni idrofobiche con l'actina e alla stabilizzazione della conformazione dello stato "bloccato" del filamento sottile. (18,26)

La sostituzione leucina-valina in posizione 198, pur mantenendo il carattere idrofobico del residuo, potrebbe determinare:

1. Riduzione del volume della catena laterale: la leucina ha una catena laterale isobutilica (C_4H_9) con volume di $\sim 166 \text{ \AA}^3$, mentre la valina ha una catena laterale isopropilica (C_3H_7) con volume di $\sim 140 \text{ \AA}^3$. Questa riduzione ($\sim 15\%$) può compromettere l'ottimale "impacchettamento" idrofobico all'interfaccia proteina-proteina, riducendo l'energia di legame delle interazioni cTnI-actina. (45)
2. Alterazione della geometria conformazionale: la leucina e la valina differiscono per la ramificazione della catena laterale (β -ramificazione della valina, γ -ramificazione della leucina), con conseguenti differenze nelle preferenze di angolo diedro e nella propensione alla formazione di strutture secondarie: la valina ha una maggiore propensione a formare strutture β rispetto alla leucina, che preferisce le α -eliche, con potenziali effetti sulla geometria del CMD. (46)
3. Perturbazione delle interazioni con l'actina: studi funzionali sistematici condotti da Gomes et al. (2005) hanno dimostrato che alterazioni anche conservative in questa regione possono ridurre significativamente la capacità inibitoria di cTnI sull'ATPasi acto-miosinica, aumentando la sensibilità al Ca^{2+} del miofilamento. (12)

5.5 Implicazioni funzionali specifiche

Sulla base del framework strutturale e funzionale, le conseguenze molecolari specifiche della sostituzione Leu198Val possono essere così riassunte:

- Riduzione dell'energia di legame cTnI-actina: la riduzione del volume della catena laterale in posizione 198 può ridurre l'area di contatto idrofobico tra il

CMD di cTnI e la superficie dell'actina, diminuendo l'energia di legame dell'interazione inibitoria.

- Alterazione dell'equilibrio del filamento sottile: se la mutazione riduce l'affinità del CMD per l'actina, il CMD si dissocia più facilmente da quest'ultima anche a basse concentrazioni di Ca^{2+} , destabilizzando lo stato "blocked" e favorendo lo spostamento verso lo stato "closed" anche in diastole. La minore affinità CMD actina abbassa la soglia di Ca^{2+} necessaria per la transizione, aumentando quindi la sensibilità al Ca^{2+} .
- Ridotta cooperatività del filamento sottile: la stabilizzazione del CMD sull'actina è importante per la cooperatività longitudinale del filamento sottile mediata dalla tropomiosina; una sua riduzione può alterare la risposta del miofilamento al Ca^{2+} , modificando la steepness della curva forza- Ca^{2+} (parametro Hill) oltre che la Ca^{2+} sensitivity (pCa_{50}). Tuttavia, il ruolo specifico del CMD nella cooperatività mediata dalla tropomiosina è ancora oggetto di studio. (20,31)

5.6 Dati clinici e fenotipo associato

Sulla base delle segnalazioni disponibili in letteratura, i portatori della mutazione Leu198Val di TNNI3 presentano un fenotipo HCM con le seguenti caratteristiche:

- Coppini et al. (2014): spessore parietale medio di 18 ± 5 mm, elevata prevalenza di disfunzione diastolica avanzata e progressione verso la disfunzione ventricolare nel 29% dei pazienti al follow-up di 4.5 anni. Il rischio di progressione verso NYHA classe III-IV era significativamente aumentato. (22)
- Maron et al. (2012) / Arad et al. (2014): fenotipo HCM con evoluzione verso la forma restrittiva in età adulta, con severa disfunzione diastolica che non era presente nei portatori della sola mutazione MYBPC3 nella stessa famiglia, suggerendo un contributo additivo della Leu198Val al fenotipo. (40,42)
- Cava et al. (2021): HCM non ostruttiva con spessore massimo di 19-26 mm cresciuto durante il follow-up, ipocinesia basale inferiore, dilatazione dell'atrio sinistro, LGE shaded al setto medio-basale anteriore alla RMC cardiaca e QTc prolungato (470-498 ms) in co-ereditarietà con KCNQ1 p.Arg594Gln. Funzione sistolica conservata. (44)

5.7 Presenza in studi di doppie mutazioni

La coesistenza della Leu198Val con la mutazione MYBPC3 Gln208His nella famiglia H29OD, documentata sia da Maron et al. (2012) che da Arad et al. (2014), è particolarmente rilevante per la comprensione del potenziale ruolo di questa variante. Come dimostrato da Maron et al. (2012) in una coorte di 18 pazienti con doppie mutazioni sarcomeriche, la presenza di due varianti causative indipendenti è associata a un'incidenza di eventi avversi maggiori (39%) significativamente superiore a quanto atteso per i singoli genotipi, includendo casi di arresto cardiaco improvviso in assenza di fattori di rischio associati. (42) La Leu198Val, coesistendo con la MYBPC3 Gln208His nella paziente di quella famiglia, contribuisce al complesso fenotipo osservato.

Walsh et al. (2017), nell'analisi sistematica delle varianti di TNNI3 in 7.855 pazienti HCM confrontati con 70.706 controlli ExAC, dimostrarono un odds ratio di 11.6 per le varianti missenso non-troncanti di TNNI3, con una frazione eziologica di 0.91. (21) Questo dato di popolazione ci porta a pensare che una variante rara di TNNI3 identificata in un paziente HCM ha una probabilità molto elevata di essere causativa, supportando indirettamente la patogenicità della Leu198Val nel contesto clinico HCM.

5.8 Classificazione della variante

5.8.1 Criteri ACMG/AMP

Il sistema di classificazione ACMG/AMP si basa su una serie di evidenze, distinte in:

- Evidenze patogene: molto forti (PVS1), forti (PS1-PS4), moderate (PM1-PM6) e di supporto (PP1-5).
- Evidenze benigne: standalone (BA1), forti (BS1-BS4) e di supporto (BP1-BP7).

La classificazione delle varianti viene fatta tramite valutazione dei criteri patogeni e benigni con pesi diversi e il processo può esitare nell'attribuzione a una delle cinque categorie: secondo le linee guida, l'attribuzione alla categoria "Pathogenic" corrisponde a un livello di certezza di patogenicità >99%, "Likely Pathogenic" a un livello tra il 90 e il 98%, mentre le mutazioni che ricadono nella classificazione VUS presentano un ampio intervallo di probabilità di essere patogene, che va dal 10% al 90%.

5.8.3 Classificazione ACMG/AMP

Per quanto riguarda la mutazione Leu198Val di TNNT3, l'applicazione dei criteri di valutazione produce il seguente quadro:

- Evidenze a favore della patogenicità
 - PM2 (di supporto): variante assente o estremamente rara nella popolazione generale (gnomAD MAF $<1 \times 10^{-5}$), compatibile con una variante patogena in un gene di malattia dominante ad alta penetranza.
 - PS4 (strong): variante documentata in molteplici pazienti non correlati con HCM in popolazioni diverse, soddisfacendo il criterio di prevalenza aumentata nei pazienti rispetto ai controlli.
 - PP1 (di supporto): evidenze di co-segregazione con la malattia in alcune famiglie. Può avere forza variabile in base al numero di meiosi informative.
 - PP3 (di supporto).
- Evidenze contro la patogenicità:
 - BP4 (di supporto): predittori in silico (PolyPhen-2, Align-GVGD C0) classificano la variante come “benigna” o “probabile benigna”.
 - Assenza di dati funzionali diretti specifici sulla variante Leu198Val: nessuno studio ha caratterizzato biochimicamente e funzionalmente questa specifica variante in sistemi ricostituiti.

Classificazione risultante: la combinazione delle evidenze disponibili PS4 (strong) + PM2 (moderate) + PP1 + PP2 + PP3 punta verso la classificazione in “Likely Pathogenic” (LP), con evidenze insufficienti per il passaggio a “Pathogenic” in assenza di dati funzionali diretti o di un numero maggiore di meiotici informativi per la co-segregazione.

5.8.4 Classificazione ACGV

Nel database Atlas of Cardiac Genetic Variation, la variante è classificata come “Pathogenic/Likely Pathogenic”, classificazione in cui si riconosce la predominanza di evidenze a favore della patogenicità pur in assenza di prove conclusive.

5.9.5 Classificazione HGMD Professional

In HGMD Professional, la variante è registrata con tag “DM” (disease-causing mutation), sebbene questo database utilizzi criteri di inclusione meno stringenti rispetto a ClinVar, e l’inclusione in HGMD non equivale a classificazione “Pathogenic” secondo i criteri ACMG/AMP.

Scopo della tesi

La variante missenso p.Leu198Val del gene TNNI3 rappresenta ad oggi una mutazione Probabilmente Patogenetica secondo i criteri classificativi in ClinVar.

Questa condizione di incertezza, tutt'altro che infrequente nell'ambito della genetica delle cardiomiopatie ereditarie, pone sfide concrete sia sul piano diagnostico che su quello della gestione clinica: i portatori di una mutazione Probabilmente Patogenetica (LP) si trovano in una zona grigia, priva delle evidenze certe che sono necessarie per orientare le decisioni terapeutiche e il counseling familiare.

L'interesse su questa particolare mutazione nasce dal suo riscontro in un numero significativamente alto di pazienti marchigiani giunti alla nostra attenzione per disturbi di natura cardiologica, prima tra tutti l'HCM di precoce insorgenza.

L'obiettivo centrale di questa tesi è quello di raccogliere e integrare evidenze cliniche e genetiche che possano contribuire a far luce sul reale significato patogenetico della variante Leu198Val, con la volontà di supportarne una eventuale riclassificazione della sua patogenicità.

Un aspetto su cui questa tesi pone particolare attenzione è la caratterizzazione del fenotipo associato alla variante. Comprendere come la mutazione si manifesta clinicamente nei soggetti portatori, quali espressioni cardiologiche presenta, con quale intensità e con quale variabilità da individuo a individuo, rappresenta non solo un elemento cruciale ai fini classificativi, ma anche un contributo utile alla conoscenza di questa entità nosologica. Le cardiomiopatie genetiche, e in particolare quelle legate a varianti del gene TNNI3, sono notoriamente caratterizzate da un'ampia eterogeneità fenotipica, e definire con maggiore precisione lo spettro clinico associato a questa specifica variante costituisce un obiettivo prioritario.

Parallelamente, il lavoro si è proposto di analizzare la segregazione della variante all'interno dei nuclei familiari dei casi indice, attraverso un'indagine a cascata che ha permesso di estendere l'analisi genetica ai familiari dei probandi. Valutare se e in quale misura la variante co-segrega con il fenotipo patologico rappresenta infatti uno degli strumenti più forti per raccogliere evidenze a favore della sua patogenicità, in linea con i criteri ACMG. In questo contesto, è stato inoltre esaminato il pattern di trasmissione osservato nei pedigree analizzati, verificandone la compatibilità con un modello

autosomico dominante, coerente con quanto atteso per varianti patogenetiche di TNNI3 associate a cardiomiopatia ipertrofica.

In sintesi, questa tesi si propone di avanzare nella comprensione di una variante ancora non completamente definita, intrecciando lo studio del fenotipo clinico con quello della genetica familiare, nella prospettiva di offrire un contributo concreto alla sua riclassificazione e a una gestione più consapevole e informata dei pazienti portatori e delle loro famiglie.

Materiali e metodi

Nel corso dell'indagine è stata analizzata la sequenza di 105 geni coinvolti in patologie cardiache ereditarie tra cui i principali geni coinvolti in HCM mediante sequenziamento massivo parallelo, piattaforma Ion Torrent S5™, metodo Ion AmpliSeq™; validazione delle mutazioni con metodo Sanger.

Sensibilità analitica: 99% (>30x, copertura media 390).

Sensibilità diagnostica: 20-30% nei probandi senza storia familiare di HCM, 50-60% in quelli con storia familiare.

1. Metodo

Il metodo utilizzato per la ricerca della mutazione permette la sequenza delle regioni codificanti e parte dai siti di splicing dei geni (Cv9): ABCC9, ACTA2, ACTC1, ACTN2, AKAP9, ANK2, ANKRD1, BAG3, CACNA1C, CACNA2D1, CACNB2, CALM1, CALM2, CALM3, CASQ2, CAV3, CDH2, CSRP3, CTNNA3, DEPDC5, DES, DMD, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, EMD, EYA4, FGF12, FHL1., FLNC, GAA, GATAS, GATA6, GLA, GNB5, GPD1L, HCN4, HEY2, JPH2, JUP, KCND2, KCND3, KCNE1, KCNEZ, KCNE3, KCNES, KCNH2, KCNJ2, KCNJS, KCNJ8, KCNQ1, LAMP2, LDB3, LMNA, MYBPC3 (+ ex 10 +/- 100 bp; ex 14 + 10/ 100bp Sanger), MYH6, MYH7 (+ ex 5=20 bp; ex 30=100 bp Sanger), MYL2, MYL3, MYLK, MYLK2, MYOZZ, MYPN, NEXN, NKX2 5, NKX2 6, NOS1AP, PKP2, PLN, PRKAG2, PSENZ, PTPN11, RAF1, RBM20, RYR2, SCN10A, SCNIA, SCN1B, SCN2B, SCN38, SCN4B, SCNSA, SCN8A, SGCD, SLC8A1, SLMAP, SNTA1, TAZ, TCAP, TECRL, TGFB2, TGFB3, TMEM43, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRDN, TRPM4, TTN, TTR, VCL. Il test è effettuato mediante sequenziamento massivo parallelo (MPS) su strumento ION TORRENT S5. Le sequenze sono allineate con il genoma di riferimento hg19 mediante Torrent Suite Software e le varianti sono annotate con wANNOVAR.

Vengono riportate solamente le mutazioni esoniche missenso, nonsense e frameshift e le mutazioni nei siti di splicing. Le regioni con un coverage (numero di volte che una data posizione di interesse viene sequenziata) minore di 30X sono escluse dall'analisi. Le varianti identificate ed eventuali alcune regioni non coperte con MPS sono confermate mediante sequenziamento Sanger. Filtraggio e prioritizzazione seguono le Linee Guida

ACMG/AMP, $MAF < 0.05$. Laddove eseguito, il test MLPA consente la rilevazione di varianti genetiche come delezioni o duplicazioni di regioni esoniche nei geni indicati nel pannello, eseguito su strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers e polimero POP7. I prodotti della reazione sono analizzati con software MRC Holland Coffalyser.

2. Varianti

Vengono riportate le varianti patogenetiche, probabilmente patogenetiche e di incerto significato (VUS); le VUS non devono essere utilizzate per decisioni di tipo clinico fino a che non venga confermata la patogenicità in seguito ad approfondimenti. Le varianti benigne e probabilmente benigne non vengono riportate.

3. Limiti

Questo test non rileva le mutazioni in regioni geniche non coperte (coverage $< 30X$) e quelle delle regioni non codificanti o i cambiamenti del numero di copie di un gene o di parte di esso che possono alterare la funzionalità del gene. Per il presente test sono stati impiegati in parte kit e strumenti RUO (Research Use Only). Il laboratorio è certificato ISO9001:2015, accreditato ISO/IEC 17025 e partecipa ai controlli di qualità internazionali EQMN (EQA Cardiac Genetics), ERIC, GHEP-ISFG.

Risultati

All'interno del presente elaborato sono stati analizzati 28 pazienti giunti all'attenzione del reparto di Cardiologia Ospedaliera e UTIC e del reparto di Cardiologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche tra il 2021 e il 2025. Alcuni di questi sono stati indirizzati al reparto dal proprio cardiologo o MMG per problematiche di natura cardiologica: sono stati successivamente sottoposti ad esami diagnostici quali ECG e/o Ecocardiogramma e/o RM cardiaca. Successivamente si è reputato opportuno sottoporli a indagine genetica molecolare per la ricerca di eventuali mutazioni patogenetiche. Altri pazienti sono giunti alla nostra attenzione solo successivamente all'arrivo dei risultati del test genetico di loro familiari; in seguito al riscontro della mutazione Leu198Val di TNNT3, è suggerito il test a cascata sui familiari di primo grado.

Oltre ai dati clinici e strumentali, sono stati raccolti importanti elementi anamnestici che ci permettono di studiare la segregazione della mutazione di interesse e la sua dominanza. I dati raccolti possono essere sintetizzati come segue.

Famiglia 1

Paziente 1: M, 59 aa.

- Fenotipo: insufficienza mitralica.
- Ecocardiogramma: normali spessori parietali, Vsx di normali dimensioni, dilatazione lieve-moderata Asx. Valvola mitralica con note displastiche: marcata anteriorizzazione della commissura anteriore e posteriorizzazione della commissura posteriore. Dislocazione apicale e anteriore di entrambi i muscoli papillari, ipoplasici; marcato allungamento dell'apparato cordale. LAM estesamente rappresentato con lunghezza pari a 36-38mm. Degenerazione mixomatosa dei lembi con marcato ispessimento del LAM. Alterazioni al TDI, insufficienza mitralica.

Paziente 2: M, 62 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 18 aa.

- Anamnesi Familiare: padre deceduto per IMA, madre con HCM con assenza della mutazione. Fratello del Paziente 1.
- Anamnesi patologica remota: asportazione di melanoma nel 2015.
- ECG: aspetti di pseudo-necrosi laterale alta con onde Q in DI-aVL, T negative in DIII-aVF.
- Ecocardiogramma: HCM non ostruttiva. Insufficienza mitro-aortica di grado lieve. Ipertrofia asimmetrica del SIV: spessore SIV posteriore 14-15 mm, SIV anteriore basale 16 mm, SIV anteriore medio 14mm. Disfunzione diastolica di primo grado. Cuore dx normale.

Paziente 3: M, 25 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 5 aa.
- Anamnesi familiare: figlio del Paziente 2.
- Ecocardiogramma: HCM asimmetrica non ostruttiva.
- Altro: presenza di doppia mutazione → NM_000256.3(MYBPC3):c.3535G>A (p.Glu1179Lys), ereditata dalla madre.

Paziente 4: F, 23 aa.

- Fenotipo: asintomatico.
- Anamnesi familiare: figlia del Paziente 2.
- Ecocardiogramma: nessuna alterazione.
- Altro: presenza di doppia mutazione → NM_000256.3(MYBPC3):c.3535G>A (p.Glu1179Lys), ereditata dalla madre.

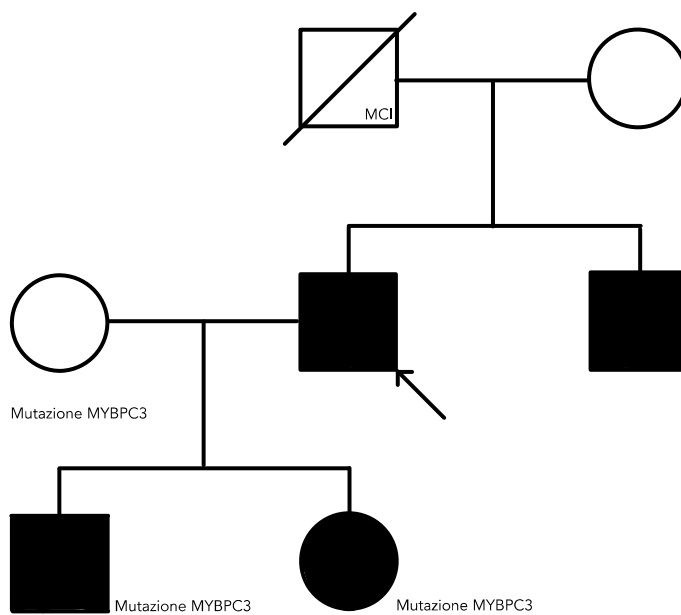


Grafico 1: albero genealogico Famiglia 1

Paziente 5: M, 46 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 38 aa. Diagnosi successiva ad accertamenti per cardiopalmo.
- Anamnesi familiare: padre con HCM diagnosticata a 55 anni e ictus ischemico a 63 anni.
- Ecocardiogramma: Vsx non dilatato, ipertrofia diffusa dei segmenti medio-apicali. Fibrosi del SIV. FE 63%. Insufficienza mitralica lieve. Assenza di aritmie. Espressione lieve, con conservata funzione sistolica e moderata disfunzione diastolica.
- RM cardiaca: SIV con spessore massimo 14 mm, non LGE.

Famiglia 2

Paziente 6: F, 70 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 53 aa.

- Anamnesi patologica remota: FA dai 50 aa., disturbo paranoideo, ipotiroidismo, pregresso embolismo arto inferiore sx, pregressi episodi di scompenso cardiaco congestizio, dispnea per sforzi lievi/moderati.
- Altro: riscontro di una mutazione di CTNNA3.

Paziente 7: M, 44 aa.

- Fenotipo: HCM ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 38 aa.
- Anamnesi familiare: figlio del Paziente 6, padre con IA.
- Anamnesi patologica remota: dubbio iperaldosteronismo primitivo con surreni normali, psicosi paranoidea in terapia psichiatrica, pregresso TSO. NYHA I.
- ECG: bradicardia sinusale, impegno atriale sx, marcate alterazioni della ripolarizzazione ventricolare da sovraccarico/ischemia a sede antero-laterale. Onde Q inferiori.
- RM cardiaca: HCM ostruttiva.
- Altro: effettuato CGH array per disturbi psichiatrici e riscontro di una mutazione di CTNNA3, ereditata dal Paziente 6.

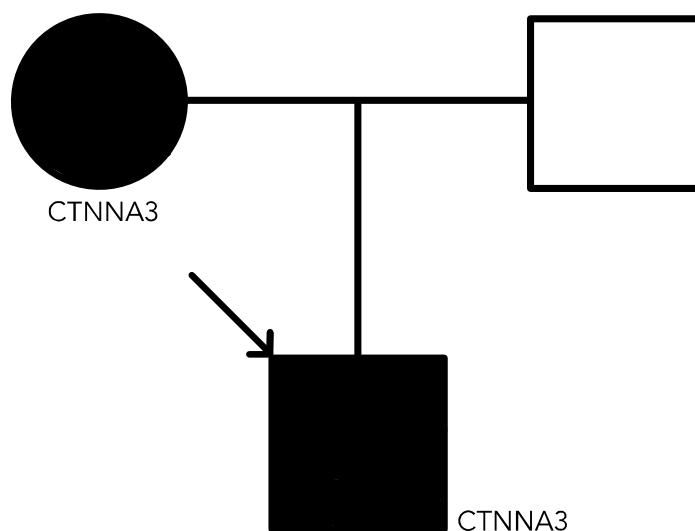


Grafico 2: albero genealogico Famiglia 2

Paziente 8: F, 64 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva, a evoluzione restrittiva.
- Età alla diagnosi: 58 aa., riscontro in corso di controllo cardiologico.
- Anamnesi familiare: negativa.
- Anamnesi patologica remota: tonsillectomia, nefrolitiasi.
- Ecocardiogramma: Vsx iperdinamico con obliterazione sistolica della cavità. Severa ipertrofia parietale SIV anteriore. Insufficienza mitralica lieve. SIV posteriore-medio: 17 mm.

Paziente 9: F, 77 aa.

- Fenotipo: HCM ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 35 aa.
- Anamnesi familiare: negativa.
- Anamnesi patologica remota: dispnea ingravesciente, sovrappeso, policitemia, MRGE, gammopatia monoclonale. NYHA II-III. Nel 2019 FAP e cardioversione farmacologica, impianto di loop recorder, successivo impianto di PMK per riscontro di pausa prolungata in corso di FAP.
- ECG: BAV I grado, insufficienza aortica lieve, insufficienza mitralica lieve.
- Ecocardiogramma: severa ipertrofia parietale SIV e della parete anteriore-laterale. Spessore SIV anteriore: 20 mm. SIV posteriore-medio: 19 mm.

Paziente 10: M, 49 aa.

- Fenotipo: HCM, asintomatico.
- Diagnosi: occasionale, in corso di indagini preoperatorie.
- Anamnesi familiare: negativa.
- Anamnesi patologica remota: meniscectomia. NYHA I.
- Ecocardiogramma: HCM non ostruttiva.
- ECG Holter 24h: BESV isolati, 3 BEV isolati.

Paziente 11: F, 62 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 57 aa., riscontro occasionale.
- Anamnesi familiare: negativa. Sorella negativa all'anamnesi e all'analisi genetica.
- Anamnesi patologica remota: NYHA I-II.
- ECG: alterazione della ripolarizzazione ventricolare da sovraccarico/ischemia con onde T negative in sede anteriore-laterale (V4-V6), laterale alta e DII.
- Ecocardiogramma: ipertrofia settale prevalente anteriore e della parete anteriore nei segmenti medio-apicali. SIV anteriore-basale: 13-14 mm.; SIV medio: 19-20 mm. Insufficienza mitralica lieve.

Paziente 12: F, 52 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 47 aa., riscontro occasionale in corso di indagini preoperatorie.
- Anamnesi familiare: padre con HCM ostruttiva a 42 anni con sostituzione valvolare mitralica e bypass aorto-coronarico, deceduto.
- Anamnesi patologica remota: asportazione nodulo mammario benigno.
- ECG: onde Q in sede infero-laterale, onde T negative in V1, V2, aVL.
- Ecocardiogramma: Vsx di dimensioni ai limiti inferiori, severa ipertrofia parietale Vsx asimmetrica. SIV anteriore: 19/20 mm; SIV medio: 21 mm; SIV posteriore: 14 mm. Insufficienza mitralica lieve, insufficienza tricuspidalica lieve.

Famiglia 3

Paziente 13: F, 74 aa.

- Fenotipo: HCM ostruttiva.
- Anamnesi familiare: madre deceduta di MCI, fratello con HCM deceduto a 62 aa.
- Anamnesi patologica remota: tiroidite di Hashimoto, ipoacusia sx post-frattura della rocca petrosa, Sindrome del tunnel carpale. NYHA I-II.
- ECG: alterazione della ripolarizzazione ventricolare da sovraccarico/ischemia a sede anteriore-laterale.

- Ecocardiogramma: severa ipertrofia parietale asimmetrica del Vsx. SIV anteriore: 21-22 mm; SIV posteriore-medio: 12 mm. Disfunzione diastolica, valvola mitralica con alterazioni degenerative.

Paziente 14: M, 47 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Anamnesi familiare: figlio del Paziente 13.
- Anamnesi patologica remota: varicocele, rinosettoplastica. NYHA I.
- ECG: segni di ipertrofia in sede settale V3, alterazione della ripolarizzazione ventricolare da sovraccarico/ischemia a sede anteriore-laterale.
- Ecocardiogramma: severa ipertrofia parietale asimmetrica del Vsx prevalentemente a livello del SIV. SIV anteriore: 18 mm; SIV posteriore-medio: 19-20 mm. Insufficienza mitralica lieve.

Paziente 15: F, 51 aa.

- Fenotipo: asintomatico.
- Anamnesi familiare: figlia del Paziente 13.
- Anamnesi patologica remota: IA sisto-diastolica.
- ECG: nella norma.
- Ecocardiogramma: lieve ipertrofia asimmetrica del Vsx. SIV: 11 mm.

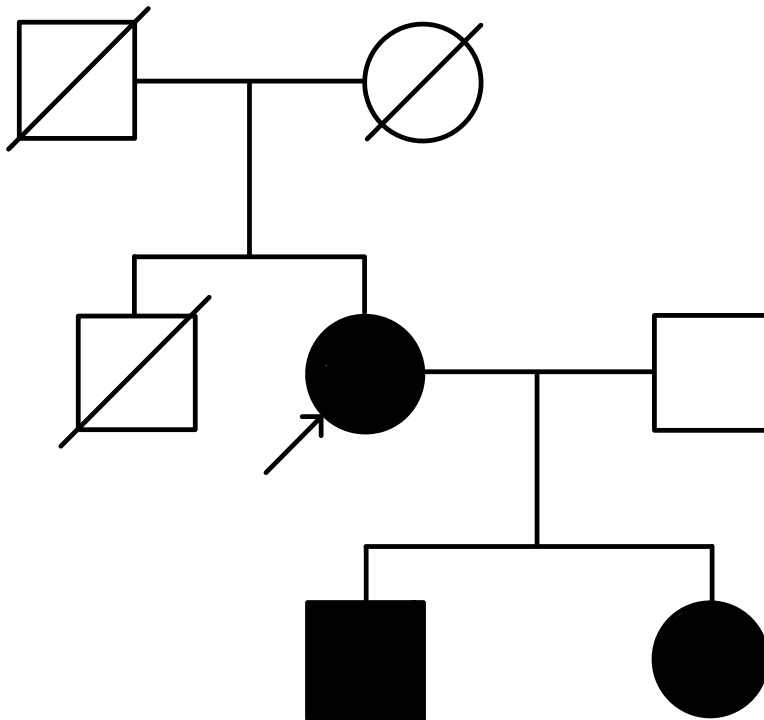


Grafico 3: albero genealogico Famiglia 3

Famiglia 4

Paziente 16: F, 61 aa.

- Fenotipo: HCM.
- Anamnesi familiare: madre di 80 anni con cardiopatia ipertensiva, bicuspidia aortica, FA, aneurisma aorta ascendente. Padre deceduto per scompenso cardiaco in cardiomiopatia dilatativa a 78 aa. Riferita familiarità per cardiomiopatia nel ramo paterno (zio con CMI). Nonna materna deceduta per MCI a 76 aa. Fratello con retinite pigmentosa dai 5 anni.
- Anamnesi patologica remota: emitiroidectomia, prolasso rettale e vescicale, isterectomia, Sindrome depressiva, dispnea per sforzi lievi/moderati. NYHA II.
- ECG: atipie del recupero diffuse con onde T negative in V4-V6.
- Ecocardio: lieve dilatazione Asx, FE 57%, ipertrofia Vsx, deficit diastolico Vsx. Insufficienza mitralica lieve-moderata.
- Altro: mutazione associata NM_007078.3(LDB3):c.1343del p.(Ser448Tyrfs*44).

Paziente 17: F, 39 aa.

- Fenotipo: HCM.
- Età alla diagnosi: 18 aa.
- Anamnesi patologica remota: nefrolitiasi bilaterale all'età di 6 anni.
- Anamnesi familiare: figlia del Paziente 16.
- Ecocardiogramma: ipertrofia asimmetrica Vsx soprattutto a livello del SIV anteriore (16 mm) e della parete anteriore (18mm). Assenza di ostruzione del tratto di efflusso.
- RM cardiaca: Vsx con spiccata ipertrofia parietale asimmetrica. SIV medio-basale: 21 mm, con coinvolgimento della parete anteriore e inferiore Vsx. Assenza di ostruzione dinamica. Late Enhancement al SIV, associabile a danno fibrotico/micro-ischemico.
- Altro: mutazione associata NM_007078.3(LDB3):c.1343del p.(Ser448Tyrfs*44) in eterozigosi, patogenetica.

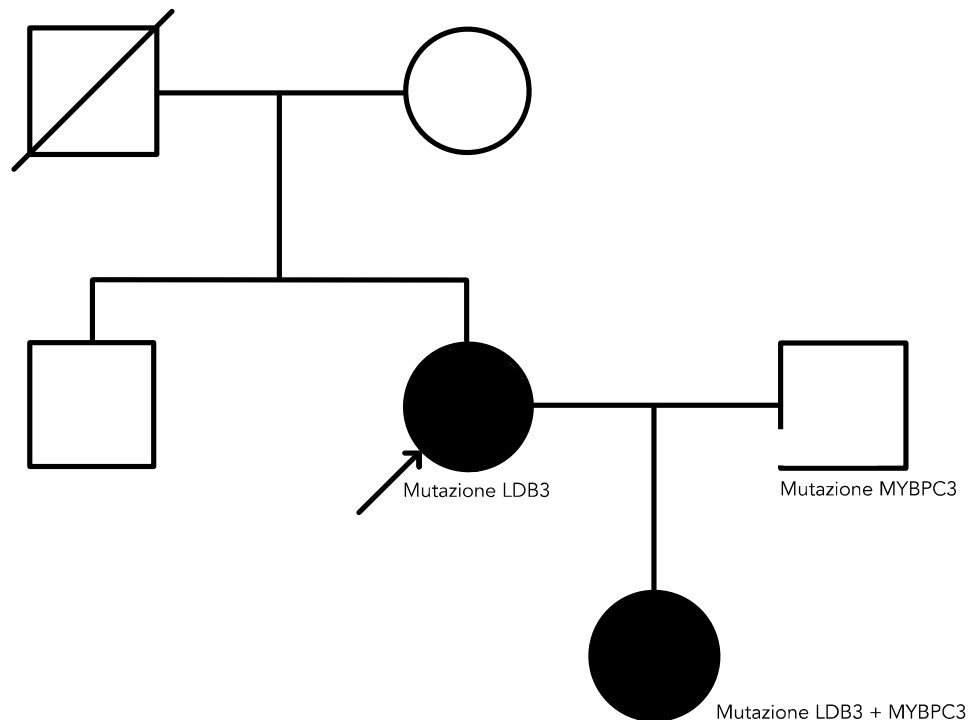


Grafico 4: albero genealogico Famiglia 4

Paziente 18: M, 48 aa.

- Fenotipo: HCM.
- Anamnesi familiare: negativa. Fratello negativo all'analisi genetica.
- Anamnesi patologica remota: displipidemia.
- ECG: alterazione della ripolarizzazione ventricolare da sovraccarico/ischemia a sede antero-laterale. ST sottoslivellato con onda T invertita in V3-V6.
- Ecocardiogramma: FEVS 70% con ventricolo iperdinamico, di normali dimensioni. Severa ipertrofia parietale asimmetrica Vsx soprattutto a livello del SIV. SIV anteriore: 24 mm; SIV posteriore medio: 26 mm; PP 10mm. Moderata dilatazione Adx, lembi mitralici lievemente ispessiti.

Paziente 19: F, 66 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 46 aa.
- Anamnesi familiare: padre deceduto a 77 aa. per ictus, IMA a 39 aa. e HCM. Fratello presenta ecocardiogramma nella norma. Sorella di 67 aa. con riferito ispessimento del SIV. Figlio di 35 aa. con ecocardiogramma normale.
- Anamnesi patologica remota: IA, appendicectomia, tonsillectomia, nodulo tiroideo in follow-up, noduli mammari benigni in follow-up, Sindrome di Eagle.
- ECG: Bav I grado, lieve sottoslivellamento ST con onda T negativa in sede inferiore e anteriore. QTc 450 ms.
- Ecocardiogramma: Vsx di normali dimensioni con severa ipertrofia parietale prevalente del SIV. SIV anteriore-inferiore: 22-23 mm; PP: 8mm. Lieve-moderata dilatazione Asx, insufficienza mitralica lieve.

Paziente 20: M, 35 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Anamnesi familiare: familiarità per CAD e HCM. Padre operato con triplo stent coronarico, contestualmente diagnosticato con ipertrofia Vsx. Nonno paterno con IMA a 60 anni.
- Anamnesi patologica remota: obesità, IA, ipotiroidismo, ernia iatale, MRGE, pericardite cronica recidivante con versamento pericardico cronico. Impianto di

loop recorder per cardiopalmo, comparsa di FA persistente a 30 aa., successiva cardioversione farmacologica. Ablazione transcateretere per trattamento definitivo della FA.

- Esami diagnostici: non disponibili.

Paziente 21: F, 65 aa.

- Fenotipo: HCM.
- Anamnesi familiare: negativa. Figlia negativa all'analisi genetica.
- Anamnesi patologica remota: rimozione di mioma uterino, glaucoma. NYHA II.
- ECG: segni di pregressa necrosi infero/laterale.
- Eco-stress: alterazioni ECG/eco indicative di ischemia.
- Ecocardiogramma: HCM non ostruttiva.
- RM cardiaca: FE 83%, ipertrofia concentrica Vsx a livello della parete anteriore basale (18mm) e del SIV anteriore basale (15 mm).

Paziente 22: F, 60 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 25 aa.
- Anamnesi familiare: madre di 81 aa. con HCM. Figli nella norma. Fratello con sarcoidosi.
- Anamnesi patologica remota: FAP, Morbo di Still dell'adulto, Morbo di Paget bulbare.
- Ecocardiogramma: severa ipertrofia parietale dei segmenti medio-apicali.
- RM cardiaca: spessore massimo del SIV infero-basale di 24 mm. Disfunzione diastolica.

Paziente 23: M, 53 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Età alla diagnosi: 49 aa., in corso di visita cardiologica.
- Anamnesi familiare: padre deceduto a 79 aa. per problematiche vescicali, madre deceduta a 65 aa. Due sorelle riferite in buona salute. Non ha figli.

- Anamnesi patologica remota: IA, dislipidemia. NYHA I.
- ECG: bradicardia sinusale a FC 57 bpm, alcuni BSV, onde T negative da V4 a V6.
- ECG holter 24h: rari BEV isolati,
- Ecocardiogramma: moderata/severa ipertrofia asimmetrica del SIV. Siv anteriore: 15-16 mm; SIV posteriore: 13 mm; PP: 9mm. Normale funzione diastolica.
- RM cardiaca: spessore massimo SIV anteriore 16 mm, tenue LGE anteriore, anteroseptale e posteroseptale in sede basale.

Famiglia 5

Paziente 24: F, 72 aa.

- Fenotipo: HCM, con evoluzione restrittiva.
- Età alla diagnosi: 49 aa.
- Anamnesi familiare: padre operato per correzione di difetto settale interatriale, madre con malattia valvolare post-reumatica. Una sorella deceduta per leucemia a 32 aa., una deceduta per tumore polmonare a 52 aa. MCI della nonna paterna a 60 anni.
- Anamnesi patologica remota: IMA infero-laterale complicato da ACC con successivo impianto di ICD. FA permanente, ricoveri per scompenso cardiaco, ipertensione polmonare, dispnea per sforzi moderati. NYHA II.
- Ecocardiogramma: HCM a evoluzione restrittiva con moderata-severa disfunzione sistolica Vsx. Severa ipertrofia del SIV: anteriore 18mm, inferiore 15 mm, PP 12 mm. Severa insufficienza mitro-tricuspidalica. Acinesia e assottigliamento dell'apice, acinesia dei segmenti medi delle pareti inferiore e postero-laterale, ipocinesia degli altri segmenti. Asx notevolmente dilatato, Adx severamente dilatato. Dilatazione lieve dell'aorta ascendente, insufficienza aortica lieve-moderata.

Paziente 25: M, 49 aa.

- Fenotipo: HCM.
- Anamnesi familiare: figlio del Paziente 24. Due fratelli negativi all'analisi genetica.

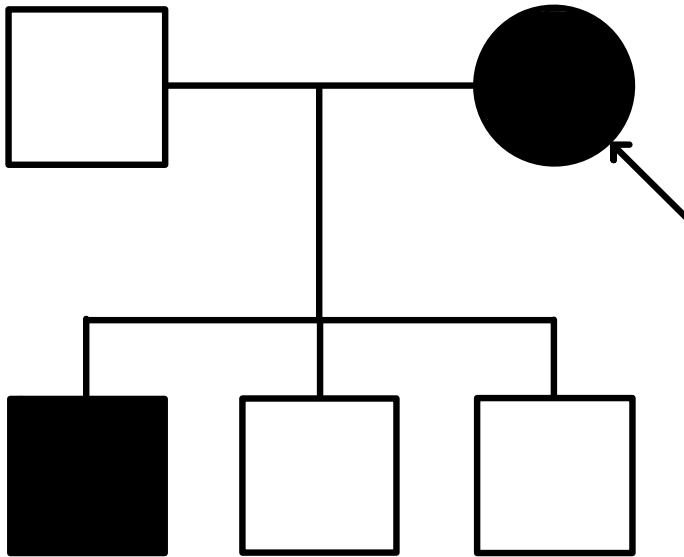


Grafico 5: albero genealogico Famiglia 5

Paziente 26: F, 65 aa.

- Fenotipo: HCM non ostruttiva.
- Anamnesi familiare: madre deceduta a 76 anni per sospetto IMA. Zio deceduto a 40 anni per sospetto IMA; due sorelle e due figli in buona salute. Decesso improvviso di un figlio in epoca perinatale.
- Anamnesi patologica remota: aritmie maligne, con impianto di ICD ed episodi di shock; episodi di FAP, episodi di TVNS. DM di tipo 2, IRC moderata, IA, malattia coronarica ectasiante.
- ECG: criteri di voltaggio per ipertrofia, onde T negative in sede antero-laterale e inferiore.
- Ecocardiogramma: severa dilatazione Asx, Vsx con severa ipertrofia asimmetrica del setto (SIV inferiore medio-basale: 25 mm) e della parte anteriore (17-18 mm). Anomalie papillari, FEVs 48%, insufficienza mitralica moderata.

Paziente 27: M, 63 aa.

- Fenotipo: CMD.
- Anamnesi familiare: negativa.

- Anamnesi patologica remota: Flutter atriale a 55 aa., successiva ablazione. Due episodi di TVNS e numerosi episodi di FA evidenziati al loop recorder. Obesità, OSAS moderata, resezione sigmo-rettale per adenocarcinoma infiltrante colico, minor stroke cerebrale frontale dx.
- ECG: ritmo da flutter atriale atipico a RVM 49/min, EAS, atipie aspecifiche del recupero.
- RM cardiaca: ipertrofia parietale eccentrica e dilatazione Vsx, ipocinesia globale e acinesia del setto, dilatazione biatriale severa. Estesa area di LGE al SIV medio-basale a pattern non ischemico.

Paziente 28: F, 73 aa.

- Fenotipo: HCM.
- Ulteriori analisi in corso.

I dati clinici e anamnestici possono essere sintetizzati nella tabella:

Dati disponibili	Totale	Femmine	Maschi
Numero di pazienti	28	16	12
Età media	55	61	48
Età media alla diagnosi	36	43	30
Motivo della diagnosi			
Sintomi	21% (6)	12,5% (2)	33% (4)
Screening familiare	25%(7)	12,5% (2)	42% (5)
Incidentale	11% (3)	12,5% (2)	8% (1)
ND	43% (12)	62,5% (10)	17% (2)
Anamnesi Familiare			
SCD	39% (11)	44% (7)	33% (4)
HCM	46% (13)	37,5% (6)	58% (7)
Fenotipo			
Insufficienza mitralica	4% (1)	-	8,3% (1)
HCM non istruttiva	75% (21)	75% (12)	75% (9)
HCM ostruttiva	20,8% (3)	12,5% (2)	8,3% (1)
CMD		-	8,3% (1)
Fenotipo negativo	7% (2)	12,5% (2)	-
Rilevazioni ECG			
Ipertrofia	18% (5)	19% (3)	17% (2)
Aritmie	32% (9)	31% (5)	33% (4)
Sovraccarico/ischemia	32% (9)	31% (5)	33% (4)
Rilevazioni Ecocardio			
SIV posteriore medio	17mm	16mm	18mm
SIV anteriore medio	18mm	19mm	17mm
Insufficienza mitralica moderata o severa	18% (5)	25% (4)	8% (1)
NYHA II-III	11% (3)	19% (3)	-
Impianto loop recorder	11% (3)	12,5% (2)	17% (2)
Impianto PMK/ICD	11% (3)	19% (3)	-
Cardioversione	7% (2)	6% (1)	8% (1)
Ablazione	7% (2)	-	17% (2)

Tabella 1: riassunto dei dati clinici e anamnestici

Nel nostro studio sono stati coinvolti 28 pazienti, 16 di sesso femminile e 12 di sesso maschile.

L'età media generale è di 55 anni, con un minimo di 23 del Paziente 4 e un massimo di 77 del Paziente 9.

L'età media alla diagnosi particolarmente bassa, 36 anni, è compatibile con altre mutazioni di TNNI3 associate a cardiomiopatie.

Il 21% dei pazienti ha ricevuto la propria diagnosi di HCM in seguito a visita cardiologia per l'insorgenza di sintomi quali cardiopalmo o dispnea, mentre l'11% ha avuto una diagnosi incidentale in sede di analisi preoperatorie.

Il 25%, 7 dei pazienti coinvolti, è risultato positivo successivamente alla segregazione successiva al riscontro della mutazione in loro familiari di primo grado.

Il 39% riferisce una Sudden Cardiac Death e il 46% casi di HCM nella propria storia familiare, elemento importante per ipotizzare la presenza di altri portatori della mutazione all'interno dell'albero genealogico.

Il fenotipo dei portatori della mutazione è eterogeneo: un paziente presenta solamente grave insufficienza mitralica, il 75% ha fenotipo HCM non ostruttiva (con evoluzione restrittiva in due casi), il 20,8% HCM ostruttiva e solo a un paziente è stata diagnosticata CMD.

Solo due pazienti presentano esami diagnostici privi di alterazioni e assenza di manifestazione fenotipica.

È stato possibile visionare l'ECG e l'Ecocardiogramma della maggior parte dei pazienti con i seguenti risultati:

- ECG: il 18% dei pazienti presenta reperti indicativi di ipertrofia, il 32% presenta aritmie e nei tracciati del 32% dei pazienti ci sono segni di sovraccarico/ischemia.
- Ecocardiogramma: ipertrofia parietale e del setto con SIV posteriore medio di 17mm e SIV anteriore medio di 18mm. Insufficienza mitralica riscontrata nel 18% dei pazienti. NYHA II-III riportato nel referto dell'11% dei pazienti.

È interessante notare come il quadro clinico di alcuni pazienti si sia aggravato a tal punto da richiedere l'impianto di un loop recorder e in 3 pazienti è stato ritenuto opportuno impiantare un PMK o un ICD. Due pazienti sono stati sottoposti a cardioversione e due ad ablazione.

Inoltre, è stata effettuata un'analisi di genetica di popolazione, da cui è emerso che tutti i pazienti portatori della mutazione di TNNI3 hanno origine dalla zona Sud delle Marche.

	Sesso	Anno di nascita	Luogo di nascita
Paziente 1	M	1967	San Benedetto del Tronto
Paziente 2	M	1964	San Benedetto del Tronto
Paziente 3	M	2001	Ancona
Paziente 4	F	2003	Ancona
Paziente 5	M	1980	San Benedetto del Tronto
Paziente 6	F	1956	Offida
Paziente 7	M	1982	San Benedetto del Tronto
Paziente 8	F	1962	Ascoli Piceno
Paziente 9	F	1949	Nereto
Paziente 10	M	1977	Ascoli Piceno
Paziente 11	F	1964	San Benedetto del Tronto
Paziente 12	F	1974	San Benedetto del Tronto
Paziente 13	F	1952	San Benedetto del Tronto
Paziente 14	M	1979	Venaria Reale
Paziente 15	F	1975	Venaria Reale
Paziente 16	F	1965	Offida
Paziente 17	F	1987	Ascoli Piceno
Paziente 18	M	1978	Offida
Paziente 19	F	1960	San Benedetto del Tronto
Paziente 20	M	1991	Giulianova
Paziente 21	F	1961	Ascoli Piceno
Paziente 22	F	1966	Folignano
Paziente 23	M	1973	San Benedetto del Tronto
Paziente 24	F	1954	Offida
Paziente 25	M	1977	San Benedetto del Tronto
Paziente 26	F	1961	San Benedetto del Tronto
Paziente 27	M	1963	Montelparo
Paziente 28	F	1953	Castorano

Tabella 2: anno e luogo di nascita dei pazienti portatori della mutazione.



Immagine 2: distribuzione dei pazienti in base al luogo di nascita.

Discussione

I risultati emersi dall'analisi genetica e dall'indagine anamnestica e clinica offrono elementi rilevanti per il raggiungimento degli obiettivi che questo studio sperimentale si pone, che sono contribuire a far luce sul reale significato patogenetico della variante Leu198Val, con la volontà di supportarne la riclassificazione di patogenicità, e la caratterizzazione del fenotipo associato alla variante.

In primo luogo, si può notare che la mutazione Leu198Val del gene TNNI3 ha un'espressività variabile: individui diversi con lo stesso genotipo possono manifestare il fenotipo associato con gravità e intensità differenti.

Un'altra caratteristica è la penetranza incompleta: come possiamo vedere nel Paziente 4 della Famiglia 1 e nel Paziente 15 della Famiglia 3, non tutti gli individui che portano questa mutazione manifestano il fenotipo associato, anche se la mutazione è dominante. Queste due proprietà sono tipiche di molte mutazioni di geni associate all'insorgenza di cardiomiopatie e aritmie.

Il riscontro di una doppia mutazione in alcuni dei pazienti sottoposti al test genetico ci permette di ragionare sull'effetto di "doppia dose genica" descritto da Maron et al. (2012) e da Arad et al. (2014) (40,42): questo fenomeno determinerebbe un fenotipo più grave rispetto alla singola mutazione. Analizzando la Famiglia 1, questo potrebbe trovare conferma nel Paziente 3, in cui è stata diagnosticata una HCM in età infantile. La mutazione NM_000256.3(MYBPC3):c.3535G>A (p.Glu1179Lys) ereditata dalla madre non sembra avere lo stesso effetto nel Paziente 4, sorella del Paziente 3: in questo caso, anche in presenza di una doppia mutazione che dovrebbe generare un effetto cumulativo sulla gravità dei sintomi, la paziente rimane asintomatica. Analizzando la Famiglia 4, invece, si potrebbe dedurre che la presenza di una mutazione associata abbia contribuito alla severità del quadro clinico: la mutazione NM_007078.3(LDB3):c.1343del p.(Ser448Tyrfs*44), classificata come patogenetica, è presente in entrambi i Pazienti 16 e 17 ed associata ad una sintomatologia modesta e di precoce insorgenza.

La presenza di 5 famiglie all'interno della coorte dei 28 pazienti presi in analisi ci permette di fare una riflessione sulla segregazione di questa mutazione: è interessante notare come all'interno delle Famiglie 1 e 3, i due figli che hanno ereditato la mutazione dal genitore presentino fenotipi diametralmente opposti; il Paziente 4 e il Paziente 15,

rispettivamente figlie femmine di Paziente 2 e Paziente 13, risultano asintomatiche. I loro fratelli maschi, Paziente 14 per il Paziente 15 e Paziente 3 per Paziente 4, presentano una sintomatologia severa e un fenotipo ben delineato sin dalla giovane età.

Un altro elemento che può essere analizzato è la provenienza dei probandi e delle loro famiglie: tramite la ricerca sul sito Gens.info è stato possibile risalire alla distribuzione dei cognomi dei pazienti all'interno del territorio italiano ed è sorprendente notare che non solo questi sono nati tutti nella zona Sud delle Marche, ma anche i loro cognomi sono presenti in quei territori più che in altre parti della penisola.

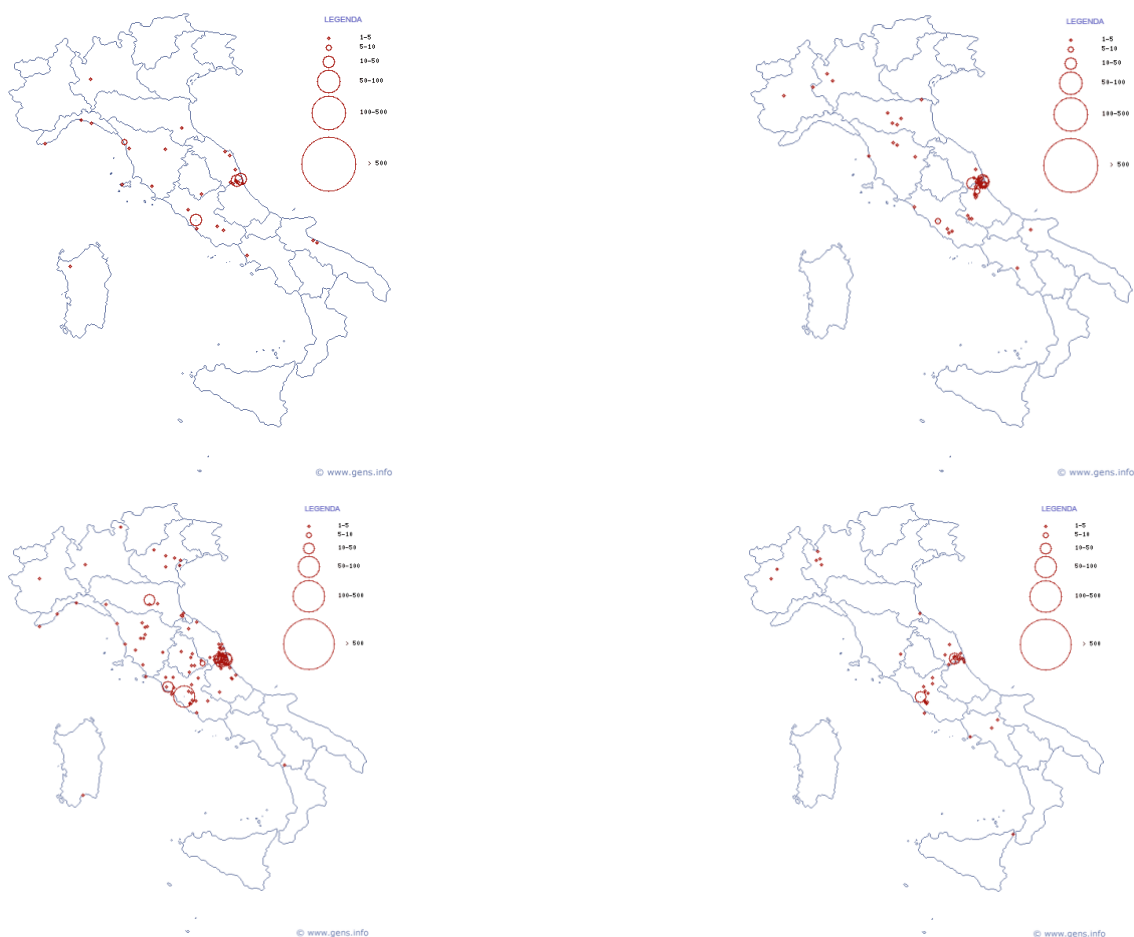


Immagine 3: mappe di distribuzione dei cognomi di alcuni dei probandi in Italia (Gens.info)

Questi elementi ci portano a pensare che la presenza della mutazione non sia una casualità, ma che invece si tratti di un vero e proprio cluster geografico, cioè una

concentrazione anomala di una determinata variante genetica in una specifica area geografica.

Alla luce dei dati raccolti e da quelli disponibili relativi alla popolazione generale, il fatto che sia stata trovata con una frequenza elevata in pazienti originari dal Sud delle Marche ci fa pensare a un possibile effetto fondatore, un meccanismo evolutivo appartenente alla categoria della deriva genetica, che si verifica quando un sottoinsieme limitato di individui si separa da una popolazione parentale per fondare una nuova popolazione, determinando una riduzione drastica della variabilità allelica rispetto alla popolazione di origine.

Uno dei principali fattori che ci ha spinti ad analizzare la mutazione Leu198Val di TNNI3 è stata la sua rilevazione nel test genetico di 18 pazienti sui 524 totali giunti presso il reparto di Cardiologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche tra il 2021 e il 2025 con fenotipo HCM o DCM. In aggiunta, è stata trovata la positività in 6 su 11 segregazioni familiari. La frequenza risultante è del maggiore del 4%, sorprendentemente alta se confrontata con la frequenza della variante a livello della popolazione generale riportata su gnomAD v4.1.1 di 0.000002.

La frequenza nella nostra coorte è 100 volte maggiore rispetto alla frequenza globale presente nei casi di HCM, che è dello 0.3% (LMM, cadiondb), suggerendo un possibile effetto fondatore.

Oltre alle valutazioni sulla distribuzione e sulle caratteristiche della mutazione, è importante evidenziarne il fenotipo e le alterazioni associate grazie all'analisi dei dati clinici e anamnestici, che sono sintetizzati nella tabella. Il fenotipo risultante non è unico, come nella maggior parte delle cardiomiopatie associate a mutazioni di TNNI3, ma quello di HCM non ostruttiva è prevalente.

Fenotipo prevalente nella coorte:

- HCM asimmetrica non ostruttiva;
- Disfunzione diastolica;
- Fibrosi miocardica (LGE);
- Insufficienza mitralica lieve-moderata, severa nei casi avanzati;
- Complicanze ricorrenti: FA/Flutter atriale, aritmie ventricolari;

È degno di nota come un quadro complicato da aritmie sia presente in diversi pazienti, fino ad aritmie anche gravi, che hanno portato ad intervenire attraverso procedure invasive come l'impianto di PMK/ICD, cardioversione e ablazione.

I risultati appaiono particolarmente interessanti e, anche se ottenuti analizzando una coorte limitata, ci permettono di sopperire alla mancanza di dati relativi alla distribuzione e al fenotipo associati alla mutazione Leu198Val di TNNI3.

Conclusioni

Alla luce dei dati ottenuti e delle considerazioni da essi derivanti, è fondamentale comprendere come questi possano tradursi in strumenti concreti per la pratica clinica.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di contribuire a una migliore caratterizzazione della variante p.Leu198Val (c.592C>G) del gene TNNI3, ancora classificata come “Probabilmente Patogenetica” nei principali database internazionali, nell'ottica di supportarne la riclassificazione e di migliorare la gestione dei pazienti portatori e delle loro famiglie.

I dati raccolti in 28 pazienti originari del Sud delle Marche offrono un apporto rilevante alla conoscenza di questa mutazione genetica.

La frequenza della mutazione nella nostra coorte, superiore al 4% tra i pazienti con fenotipo HCM o DCM giunti all'osservazione tra il 2021 e il 2025, risulta nettamente superiore alla frequenza globale riportata in gnomAD v4.1.1 (0,000002). Questo dato, combinato con l'origine geografica comune dei portatori e la distribuzione dei loro cognomi nel territorio marchigiano, costituisce un'evidenza solida a favore di un effetto fondatore. L'analisi di segregazione familiare ha inoltre confermato la trasmissione autosomica dominante della variante, con penetranza incompleta ed espressività variabile e ha permesso di raccogliere ulteriori dati informativi a supporto della patogenicità.

Nonostante l'importanza delle evidenze cliniche e genetiche raccolte, le informazioni disponibili sulla Leu198Val di TNNI3 rimangono ancora limitate: queste lacune sono i fattori principali che ad oggi non consentono una riclassificazione di patogenicità. La principale è l'assenza di dati funzionali diretti: nessuno studio pubblicato ha caratterizzato biochimicamente o funzionalmente la variante Leu198Val, elemento essenziale per soddisfare il criterio PS3 di classificazione.

Parallelamente, l'ampliamento della coorte e il coinvolgimento di centri genetici di altre regioni italiane potrebbero consentire l'identificazione di ulteriori portatori, aumentando il numero di meiotici informativi per la co-segregazione e rafforzando le evidenze epidemiologiche.

Sul piano clinico, i risultati di questo lavoro hanno implicazioni immediate. La caratterizzazione del cluster geografico marchigiano suggerisce l'opportunità di

implementare protocolli di screening cardiologico e genetico mirati nella popolazione del Sud delle Marche, con particolare attenzione ai fenotipi maggiormente associati alla mutazione. Inoltre, lo screening a cascata consente l'identificazione precoce di soggetti a rischio, anche asintomatici, permettendo una sorveglianza clinica personalizzata, la stratificazione del rischio aritmico e l'eventuale adozione di misure preventive.

Per queste ragioni, lo studio del significato di questa variante assume un valore che va oltre il singolo caso clinico: definire con certezza il ruolo patogenetico della Leu198Val significherebbe offrire una diagnosi più precisa ai pazienti portatori, migliorare il counseling genetico familiare e contribuire alla conoscenza più ampia delle cardiomiopatie ereditarie legate a mutazioni del gene *TNNI3*.

Bibliografia e sitografia

1. Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJR. Isolation and Characterization of the Human Cardiac Troponin I Gene (TNNI3). *Genomics*. luglio 1996;35(1):11–23. doi:10.1006/geno.1996.0317
2. Li MX, Wang X, Sykes BD. Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology. *J Muscle Res Cell Motil*. ottobre 2004;25(7):559–79. doi:10.1007/s10974-004-5879-2
3. Akhter S, Bueltmann K, Huang X, Jin JP. Restrictive cardiomyopathy mutations demonstrate functions of the C-terminal end-segment of troponin I. *Arch Biochem Biophys*. giugno 2014;552–553:3–10. doi:10.1016/j.abb.2013.12.001
4. Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maéda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form. *Nature*. luglio 2003;424(6944):35–41. doi:10.1038/nature01780
5. Abbott MB, Dong WJ, Dvoretzky A, DaGue B, Caprioli RM, Cheung HC, et al. Modulation of Cardiac Troponin C–Cardiac Troponin I Regulatory Interactions by the Amino-terminus of Cardiac Troponin I. *Biochemistry*. 1 maggio 2001;40(20):5992–6001. doi:10.1021/bi0100642
6. Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, Arbustini E, Barriales-Villa R, Basso C, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 1 ottobre 2023;44(37):3503–626. doi:10.1093/eurheartj/ehad194
7. Lindholm D, Ribom G, Gustafsson S, Pol T, Sundström J. Cardiomyopathies: Nationwide Trends in Prevalence, Incidence, and Mortality (2004-2023). *JACC*. marzo 2026;87(8):1087–90. doi:10.1016/j.jacc.2025.12.009
8. Hao L, Chen X, Qin B. Hypertrophic cardiomyopathy: comprehensive insights into pathogenic genes and genotype-phenotype associations. *Front Cell Dev Biol*. 30 gennaio 2026;14:1741252. doi:10.3389/fcell.2026.1741252

9. Li Y, Yu J. Are clinical trajectories in obstructive hypertrophic cardiomyopathy mutation-specific? A systematic review and meta-analysis of MYH7 vs. MYBPC3. *Front Cardiovasc Med.* 29 aprile 2026;13:1752303. doi:10.3389/fcvm.2026.1752303
10. Rapezzi C, Aimo A, Barison A, Emdin M, Porcari A, Linhart A, et al. Restrictive cardiomyopathy: definition and diagnosis. *Eur Heart J.* 1 dicembre 2022;43(45):4679–93. doi:10.1093/eurheartj/ehac543
11. Van Den Wijngaard A, Volders P, Van Tintelen JP, Jongbloed JDH, Van Den Berg MP, Lekanne Deprez RH, et al. Recurrent and founder mutations in the Netherlands: cardiac Troponin I (TNNI3) gene mutations as a cause of severe forms of hypertrophic and restrictive cardiomyopathy. *Neth Heart J.* agosto 2011;19(7–8):344–51. doi:10.1007/s12471-011-0135-z
12. Gomes AV, Liang J, Potter JD. Mutations in Human Cardiac Troponin I That Are Associated with Restrictive Cardiomyopathy Affect Basal ATPase Activity and the Calcium Sensitivity of Force Development. *J Biol Chem.* settembre 2005;280(35):30909–15. doi:10.1074/jbc.M500287200
13. Yang Z, Chen J, Li H, Lin Y. Genotype-Phenotype Associations with Restrictive Cardiomyopathy Induced by Pathogenic Genetic Mutations. *Rev Cardiovasc Med.* 25 maggio 2022;23(6):185. doi:10.31083/j.rcm2306185
14. Sorrentino U, Gabbiato I, Canciani C, Calosci D, Rigon C, Zuccarello D, et al. Homozygous TNNI3 Mutations and Severe Early Onset Dilated Cardiomyopathy: Patient Report and Review of the Literature. *Genes.* 19 marzo 2023;14(3):748. doi:10.3390/genes14030748
15. Hwang J won, Jang MA, Jang SY, Seo SH, Seong MW, Park SS, et al. Diverse Phenotypic Expression of Cardiomyopathies in a Family with TNNI3 p.Arg145Trp Mutation. *Korean Circ J.* 2017;47(2):270. doi:10.4070/kcj.2016.0213

16. Luo Y, Wu JL, Gergely J, Tao T. Localization of Cys133 of Rabbit Skeletal Troponin-I with Respect to Troponin-C by Resonance Energy Transfer. *Biophys J*. giugno 1998;74(6):3111–9. doi:10.1016/S0006-3495(98)78017-8
17. Yamada Y, Namba K, Fujii T. Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism. *Nat Commun*. 9 gennaio 2020;11(1):153. doi:10.1038/s41467-019-14008-1
18. Kobayashi T, Solaro RJ. CALCIUM, THIN FILAMENTS, AND THE INTEGRATIVE BIOLOGY OF CARDIAC CONTRACTILITY. *Annu Rev Physiol*. 17 marzo 2005;67(1):39–67. doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.114025
19. Perry SV. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem*. gennaio 1999;190(1–2):9–32. PubMed PMID: 10098965.
20. McKillop DF, Geeves MA. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys J*. agosto 1993;65(2):693–701. doi:10.1016/S0006-3495(93)81110-X
21. Walsh R, Thomson KL, Ware JS, Funke BH, Woodley J, McGuire KJ, et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med*. febbraio 2017;19(2):192–203. doi:10.1038/gim.2016.90
22. Coppini R, Ho CY, Ashley E, Day S, Ferrantini C, Girolami F, et al. Clinical Phenotype and Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated With Thin-Filament Gene Mutations. *J Am Coll Cardiol*. dicembre 2014;64(24):2589–600. doi:10.1016/j.jacc.2014.09.059
23. Mogensen J, Kubo T, Duque M, Uribe W, Shaw A, Murphy R, et al. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J Clin Invest*. 15 gennaio 2003;111(2):209–16. doi:10.1172/JCI200316336

24. Konno T, Shimizu M, Ino H, Fujino N, Hayashi K, Uchiyama K, et al. Phenotypic differences between electrocardiographic and echocardiographic determination of hypertrophic cardiomyopathy in genetically affected subjects. *J Intern Med.* settembre 2005;258(3):216–24. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01539.x
25. Huang Q, Brozovich FV, Jin J. Fast skeletal muscle troponin T increases the cooperativity of transgenic mouse cardiac muscle contraction. *J Physiol.* ottobre 1999;520(1):231–42. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.00231.x
26. Willott RH, Gomes AV, Chang AN, Parvatiyar MS, Pinto JR, Potter JD. Mutations in Troponin that cause HCM, DCM AND RCM: What can we learn about thin filament function? *J Mol Cell Cardiol.* maggio 2010;48(5):882–92. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.10.031
27. Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Prevalence and Spectrum of Thin Filament Mutations in an Outpatient Referral Population With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* 29 luglio 2003;108(4):445–51. doi:10.1161/01.CIR.0000080896.52003.DF
28. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, et al. Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly. *Circulation.* 29 gennaio 2002;105(4):446–51. doi:10.1161/hc0402.102990
29. Deng Y. Phosphorylation of human cardiac troponin I G203S and K206Q linked to familial hypertrophic cardiomyopathy affects actomyosin interaction in different ways. *J Mol Cell Cardiol.* novembre 2003;35(11):1365–74. doi:10.1016/j.yjmcc.2003.08.003
30. Tardiff JC. Sarcomeric Proteins and Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: Linking Mutations in Structural Proteins to Complex Cardiovascular Phenotypes. *Heart Fail Rev.* settembre 2005;10(3):237–48. doi:10.1007/s10741-005-5253-5
31. Kubo T, Gimeno JR, Bahl A, Steffensen U, Steffensen M, Osman E, et al. Prevalence, Clinical Significance, and Genetic Basis of Hypertrophic

- Cardiomyopathy With Restrictive Phenotype. *J Am Coll Cardiol.* giugno 2007;49(25):2419–26. doi:10.1016/j.jacc.2007.02.061
32. Gomes AV, Potter JD. Molecular and Cellular Aspects of Troponin Cardiomyopathies. *Ann N Y Acad Sci.* maggio 2004;1015(1):214–24. doi:10.1196/annals.1302.018
 33. Haworth RS, Cuello F, Herron TJ, Franzen G, Kentish JC, Gautel M, et al. Protein Kinase D Is a Novel Mediator of Cardiac Troponin I Phosphorylation and Regulates Myofilament Function. *Circ Res.* 26 novembre 2004;95(11):1091–9. doi:10.1161/01.RES.0000149299.34793.3c
 34. Javadpour MM, Tardiff JC, Pinz I, Ingwall JS. Decreased energetics in murine hearts bearing the R92Q mutation in cardiac troponin T. *J Clin Invest.* 1 settembre 2003;112(5):768–75. doi:10.1172/JCI15967
 35. Wen Y, Pinto JR, Gomes AV, Xu Y, Wang Y, Wang Y, et al. Functional Consequences of the Human Cardiac Troponin I Hypertrophic Cardiomyopathy Mutation R145G in Transgenic Mice. *J Biol Chem.* luglio 2008;283(29):20484–94. doi:10.1074/jbc.M801661200
 36. Wen Y, Xu Y, Wang Y, Pinto JR, Potter JD, Kerrick WGL. Functional Effects of a Restrictive-Cardiomyopathy-Linked Cardiac Troponin I Mutation (R145W) in Transgenic Mice. *J Mol Biol.* ottobre 2009;392(5):1158–67. doi:10.1016/j.jmb.2009.07.080
 37. Molkenstein JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell.* aprile 1998;93(2):215–28. doi:10.1016/S0092-8674(00)81573-1
 38. Schober T, Huke S, Venkataraman R, Gryshchenko O, Kryshtal D, Hwang HS, et al. Myofilament Ca Sensitization Increases Cytosolic Ca Binding Affinity, Alters Intracellular Ca Homeostasis, and Causes Pause-Dependent Ca-Triggered Arrhythmia. *Circ Res.* 6 luglio 2012;111(2):170–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.270041

39. Baudenbacher F, Schober T, Pinto JR, Sidorov VY, Hilliard F, Solaro RJ, et al. Myofilament Ca²⁺ sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest.* 20 novembre 2008;JCI36642. doi:10.1172/JCI36642
40. Arad M, Monserrat L, Haron-Khun S, Seidman JG, Seidman CE, Arbustini E, et al. Merits and pitfalls of genetic testing in a hypertrophic cardiomyopathy clinic. *Isr Med Assoc J IMAJ.* novembre 2014;16(11):707–13. PubMed PMID: 25558701.
41. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 14 ottobre 2014;35(39):2733–79. doi:10.1093/eurheartj/ehu284
42. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: A potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors. *Heart Rhythm.* gennaio 2012;9(1):57–63. doi:10.1016/j.hrthm.2011.08.009
43. Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, et al. Prevalence and Distribution of Sarcomeric Gene Mutations in Japanese Patients With Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J.* 2012;76(2):453–61. doi:10.1253/circj.CJ-11-0876
44. Cava F, Cristiano E, Musumeci MB, Savio C, Germani A, Monaco ML, et al. TNNI3 and KCNQ1 co-inherited variants in a family with hypertrophic cardiomyopathy and long QT phenotypes: A case report. *Mol Genet Metab Rep.* giugno 2021;27:100743. doi:10.1016/j.ymgmr.2021.100743
45. Halling PJ. *Proteins: Structures and molecular properties* (2nd edition). by Thomas E. Creighton, W. H. Freeman, New York, 1992, xiii + 512 pp, price £22.95. ISBN 0-7167-7030-X. *J Chem Technol Biotechnol.* gennaio 1995;62(1):105–105. doi:10.1002/jctb.280620121

46. Pace CN, Fu H, Fryar KL, Landua J, Trevino SR, Shirley BA, et al. Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability. *J Mol Biol.* maggio 2011;408(3):514–28. doi:10.1016/j.jmb.2011.02.053