



UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

Tesi di laurea

**USO COMBINATO DEL TEST DI SPLICING IN SILICO E IN VITRO PER L'INTEPRETAZIONE DI VARIANTI  
GENOMICHE DI SIGNIFICATO SCONOSCIUTO IN CARDIOMIOPATIA E CANALOPATIA.**

**COMBINED USE OF SILICO AND IN VITRO SPLICING ASSAYS FOR INTERPRETATION OF GENOMIC VARIANTS  
OF UNKNOWN SIGNIFICANCE IN CARDIOMYOPATHIES AND CHANNELOPATHIES.**

Tesi di Laurea di: Maria Luigia Pia Giuliani

Docente Referente: Chiar.mo Prof. Mauro Pesaresi

Matricola: S1093287

Sessione Straordinaria (Maggio)

A.A 2022-2023

# Introduzione:



Nel mondo circa 18 milioni di persone muoiono ogni anno per malattie cardiache . Di queste, circa 4,5 milioni sono colpite da morte cardiaca improvvisa (SCD), 60milla solo in Italia.

Le cause della morte improvvisa dipendono anche dall'età del paziente. In soggetti di età inferiore ai 35 anni le cause genetiche sono molto frequenti e possono causare sia cardiomiopatie sia malattie dei canali ionici.

Questi decessi possono essere causati sia da patologie genetiche , sia da patologie acquisite e, spesso, vengono classificati con il termine di “morte in culla”, rappresentata da un decesso improvviso in assenza di sintomi.

An anatomical illustration of the human heart and circulatory system, rendered in a semi-transparent blue and red style. The heart is centrally located, with major blood vessels branching out. A red ECG (heart rate) line is overlaid on the image, showing a regular rhythm. The background is dark, making the anatomical structures stand out.

Per **cardiomiopatia** si intende una serie di patologie che colpiscono il muscolo cardiaco, causando una riduzione della capacità di contrazione del cuore.

- Dilatativa
- Ipertrofica

**Canalopatia cardiaca:** anomalie genetiche di proteine delle cellule cardiache che controllano l'attività elettrica del cuore e pertanto possono causare la comparsa di irregolarità del ritmo.

# Materiali e metodi:

Lo studio ha incluso 740 pz non correlati con diagnosi clinica confermata: 350 con aritmia (250 con LQTS e 100 con sindrome di Brugada), 280 pazienti con HCM e 110 con DCM.

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando un kit di purificazione WIZARD.

Il rilevamento delle mutazioni è stato eseguito utilizzando una strategia di sequenziamento HRM.

Sono stati sottoposti a screening:

Casi di LQTS	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2
Casi di Brugada	SCN5A
Pazienti con HCM	MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3
Pazienti con DCM	LNMA

Per predire lo splicing è stato utilizzato Alamut, che integra quattro diversi algoritmi.

Nelle variazioni con effetto in silico positivo, l'esone viene amplificato con PCR e successivamente Wild-type e mutanti sono stati inseriti nel sito di restrizione *NdeI* del vettore del minigene pTB.

# Risultati:

Un primo ciclo di selezione è stato fatto con l'eliminazione sia dei comuni polimorfismi sia delle variazioni con effetto patogeno.

L'uso degli algoritmi per il punteggio computazionale dei siti di splicing 5' e 3' ha selezionato 15 variazioni genomiche che potrebbero influenzare i siti naturali o creare nuovi siti di splicing.

Le varianti positive al test di splicing in silico sono state trasfettate nel minigene e studiate in vivo.

Gene	Variation	Splice site finder like	In silico studies WT 5'ss > MUT 5'ss		Human splicing finder	HBond	In vitro splicing studies
			MaxEntScan	NNSplice			
KCNQ1	c.477+5G>A	80.40 > below threshold cryp 5'ss (+80): 80.23	9.89 > 4.52 (- 54.3%) cryp 5'ss (+80): 5.87	0.97 > below threshold cryp 5'ss (+80): 0.7	85.49 > 73.33 (- 14.2%) cryp 5'ss (+80): 87.61	HC2→LC3 HP	Use of a cryptic 5'ss c.477+80
	c.683+5G>A	84.85 > 72.7 (- 14.3%)	9.73 > 4.89 (- 49%)	0.99 > 0.79 (- 20.2%)	90.04 > 77.87 (- 13.5%)	HC1→LC4 HP	Exon 4 skipped
	c.1032+5G>A	77.95 > below threshold cryp 5'ss (+16): 71.76	9.00 > 3.46 (- 61.6%) cryp 5'ss (+16): 5.46	0.97 > below threshold	85.15 > 72.98 (- 14.3%) cryp 5'ss (+16): 83.2	HC1→LC3 HP	Use of a cryptic 5'ss c.1032+16; exon 7 skipped
MYBPC3	c.1090G>A (p.Ala364Thr)	80.35 > 72.21 (- 14.4%) cryp 5'ss (+74): 80.22	4.90 > below threshold	0.98 > below threshold	92.80 > 82.22 (-11.4%) cryp 5'ss (+74): 90.82	HC2→LC2 HP	Exon 12 skipping
	c.1213A>G (p.Met405Val)	physiological: not detected mutant: 89.86	physiological: 4.95 mutant: 9.60	physiological: not detected mutant: 0.99	physiological: 75.94 mutant: 96.67	NT	Exclusive use of the mutant donor site at c.1213
	c.1624G>C (p.Glu542Gln)	80.59 > below threshold cryp 5'ss (+82): 79.15	7.75 > 4.09 (-47.2%)	0.90 > 0.45 (-49.7%)	90.86 > 79.84 (-12.1%)	HC3→HC1 HP	Exon 17 skipping
	c.2067G>T (p.Gln689His)	71.80 > below threshold	9.04 > below threshold	0.91 > below threshold	76.95 > 66.08 (- 14.1%)	HC2→LC2 HP	Exon 21 skipped
	c.3190+5G>A	72.21 > below threshold	6.18 > below threshold	physiological: not detected	83.31 > 71.14 (- 14.6%)	LC3→LC2 LP	Exon 29 skipped
LMNA	c.1488G>A (p.Thr496Thr)	86.42 > 74.28 (-14%) cryp 5'ss (c.1489-26: 87.98)	11.45 > 8.34 (-27.2%) cryp 5'ss (c.1489-26: 9.65)	0.99 > 0.83 (-15.7%) cryp 5'ss (c.1489-26: 1.00)	93.14 > 82.56 (-11.4%) cryp 5'ss (c.1489-26: 93.38)	HC3→HC1 HP	No effect
PSAP	c.1359+5G>A	83.44 > 71.28 (- 14.6%)	10.12 > 7.29 (- 27.9%)	0.99 > 0.88 (- 11.1%)	89.02 > 76.86 (- 13.6%)	HC2→HC2 LP	No effect

Predizione in silico e risultati in vitro dell'effetto sullo splicing delle variazioni nel sito di splicing donatore.

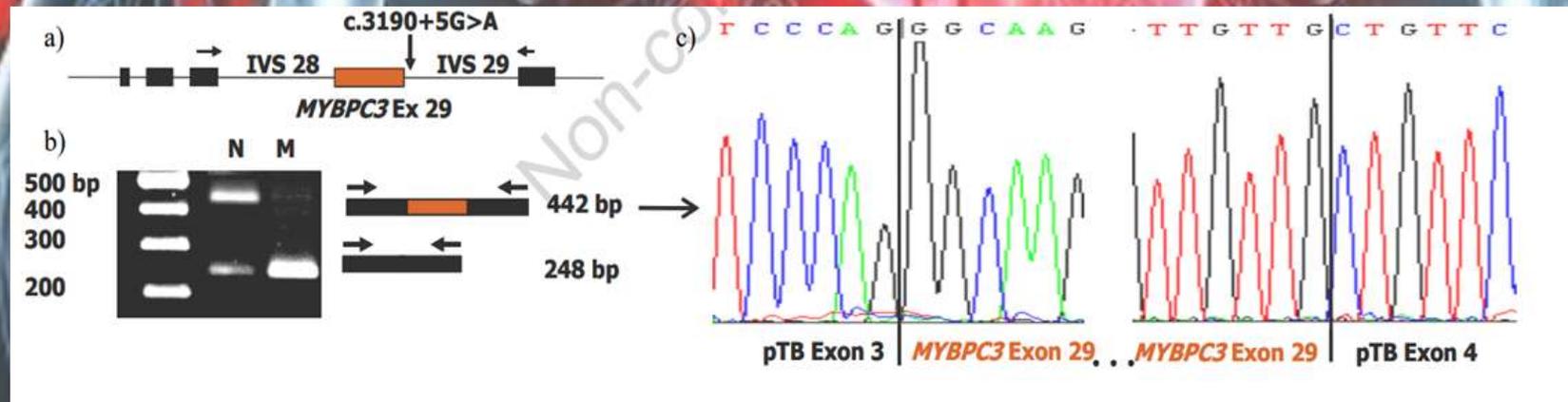
## Siti di splicing del donatore 5'ss

9 variazioni genomiche sono state selezionate e ulteriormente studiate in vivo: 4 di esse hanno interessato la G altamente conservata (80%) in posizione intronica +5

Nel dettaglio:

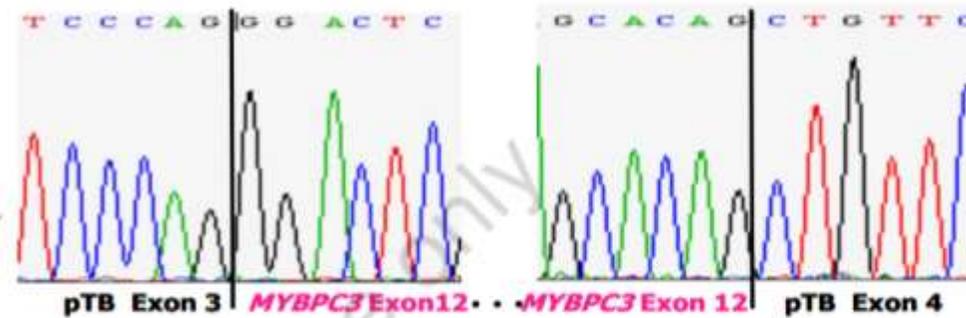
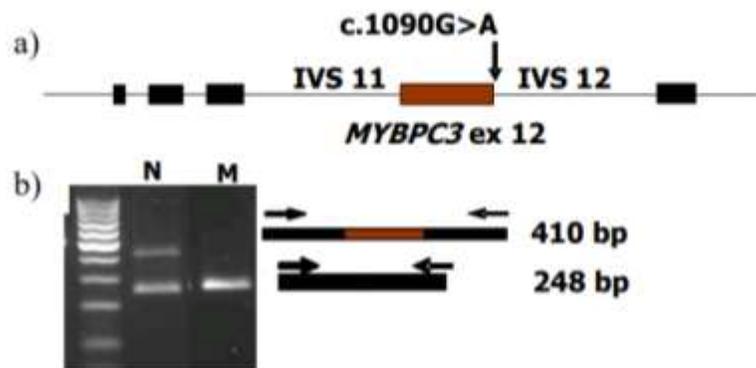
### MYBPC3 c. 3190+5G>A introne 29

Tre dei cinque algoritmi testati hanno previsto un impatto sullo splicing mediante la completa abolizione del sito di splicing donatore. Nelle cellule HeLa trasfettate con la sequenza wild-type, alcune delle trascrizioni mancano dell'esone 29 e la trascrizione risultante codificherebbe una proteina troncata contenente i 1063 aminoacidi seguiti da 10 aminoacidi aberranti e un PTC



## MYBPC3 c.1090G>A esone 12

Questa variazione colpisce l'ultimo nucleotide dell'esone 12 e cambia il residuo di Ala altamente conservato in posizione 364 in un Thr. Tutti e 4 gli algoritmi hanno previsto un impatto sullo splicing e, in effetti, il test del mini gene mutante ha mostrato il salto completo dell'esone 12 che produce un PTC e la trascrizione anomala verrebbe degradata dall'NMD.



Sequencing of the 410 bp normal product

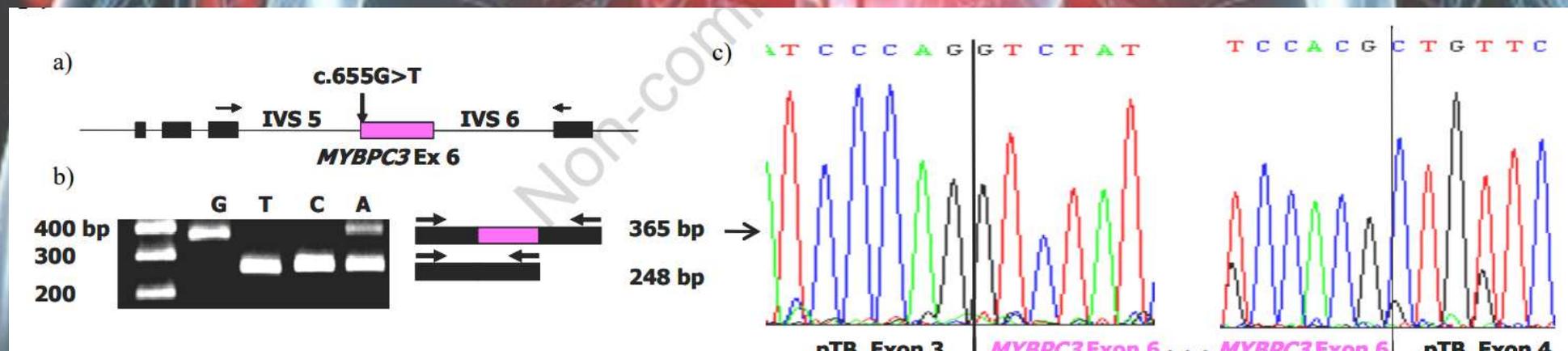
## Siti di splicing dell'accettore 3'ss

6 mutanti sono stati selezionati per il test di splicing del minigene in vitro

Nel dettaglio:

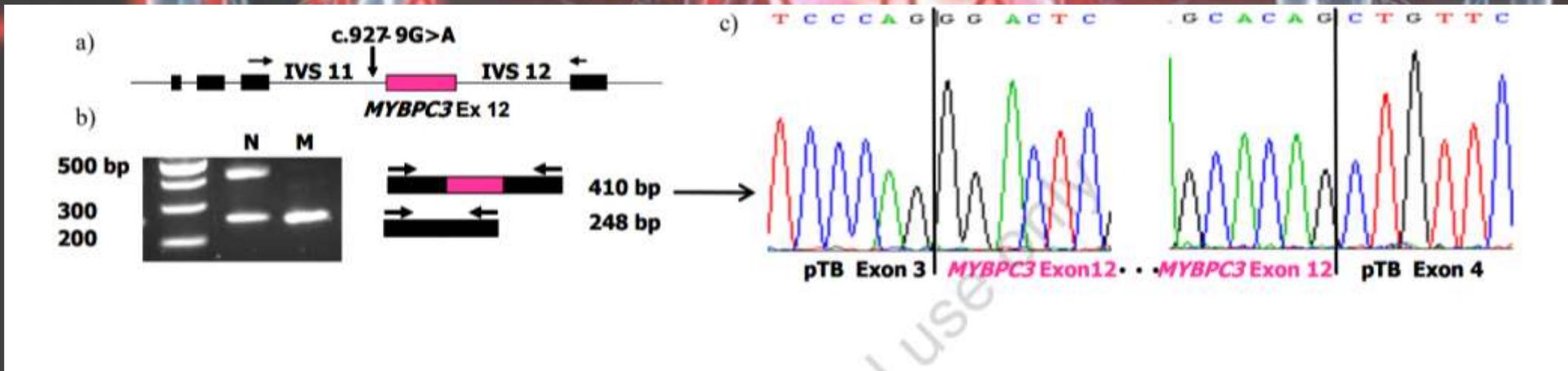
### MYBPC3 c. 655G>T esone 6

Questa sostituzione ha influenzato il primo nucleotide esonico con variazione G>T. L'analisi in silico ha previsto una diminuzione del punteggio che va da 5% al 57% tuttavia nel test del minigene la mutazione ha indotto il salto completo dell'esone 6.



## MYBPC3 c.927-9 G>A introne 11

Il debole sito di splicing accettore dell'introne 11 è stato rilevato solo da HSF che ha predetto la creazione in posizione 927-9 di un sito accettore più forte del WT. Le cellule HeLa trasfettate con la sequenza WT hanno mostrato due diverse trascrizioni: un prodotto normale da 410 pb contenente l'esone 12 e il prodotto da 248 pb corrispondente allo skipping dell'esone 12. Il test del minigene ha mostrato il salto completo dell'esone 12 e la trascrizione priva di questo codificherebbe una proteina troncata.



# Discussione:

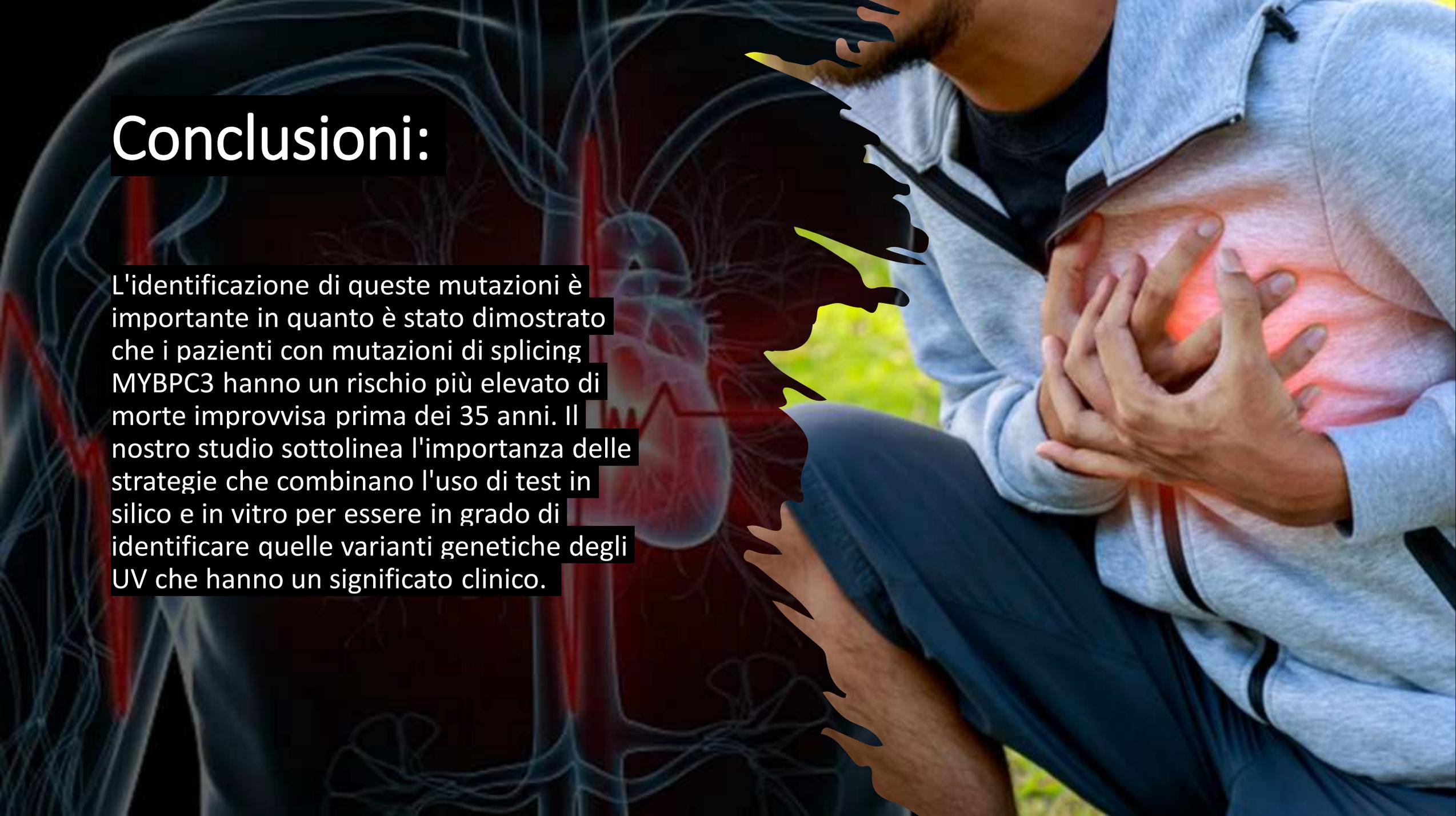
Considerando il sito di splicing del donatore, 4 mutanti su 9 hanno influenzato la posizione +5 con un cambiamento del nucleotide da G>A e 4 varianti hanno modificato l'ultima base esonica. Le posizioni -1 e +5 sono altamente conservate e il 35% delle mutazioni che interessano questa posizione ha causato splicing aberrante rispetto al 9% per le altre posizioni. Le posizioni -1 e +5 sono le più importanti nell'accoppiamento di basi con lo snRNA U1. L'analisi di 45519 5'ss ha mostrato che il numero di paia di basi varia da 3 a 9 ma la media è intorno a 7 ma vi è anche una forte dipendenza delle basi adiacenti.

L'accuratezza della previsione in silico per le variazioni che influiscono su 5'ss dipende dall'algoritmo utilizzato e dal numero di legami idrogeno con lo snRNA U1.

Riguardo il sito accettore 3'ss, esso è costituito da 3 elementi che, fatta eccezione per AG, sono degenerati e la sua identificazione da parte della bioinformatica può essere molto difficile, rendendo quasi impossibile la previsione delle varianti. Una possibile spiegazione è che il nuovo AG creato da MYBPC3 c.927-9 G>A recluti componenti spliceosomici che potrebbero competere con il sito autentico, oppure che modifichi un elemento normativo necessario per il riconoscimento del sito di splicing dell'accettore debole dell'introne 11.

# Conclusioni:

L'identificazione di queste mutazioni è importante in quanto è stato dimostrato che i pazienti con mutazioni di splicing MYBPC3 hanno un rischio più elevato di morte improvvisa prima dei 35 anni. Il nostro studio sottolinea l'importanza delle strategie che combinano l'uso di test in silico e in vitro per essere in grado di identificare quelle varianti genetiche degli UV che hanno un significato clinico.



# *Bibliografia:*

- *Barsheshet A, Brenyo A, Moss AJ, Goldenberg I. Genetics of sudden cardiac death. Curr Cardiol Rep 2011;13:364-76.*
- *Millat G, Chevalier P, Restier-Miron L, et al. Spectrum of pathogenic mutations and associated polymorphisms in a cohort of 44 unrelated patients with long QT syndrome. Clin Genet 2006;70:214-27.*
- *Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. Nucleic Acids Res 1987;15:7155-74.*
- *Carmel I, Tal S, Vig I, Ast G. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. RNA 2004;10:828-40.*
- *Whiley PJ, Pettigrew CA, Brewster BL, et al. Effect of BRCA2 sequence variants predicted to disrupt exonic splice enhancers on BRCA2 transcripts. BMC Med Genet 2010;11:80.*
- *Haj Khelil A, Deguillien M, Morinière M, et al. Cryptic splicing sites are differentially utilized in vivo. FEBS J 2008;275:1150-62.*
- *Ehlermann P, Weichenhan D, Zehelein J, et al. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene. BMC Med Genet 2008;9:95.*