

Varianti (A31P, A74T, R820W) della Proteina C legante la Miosina nei gatti domestici e la loro associazione con la Cardiomiopatia Iperτροφica.

M. Longeri, P. Ferrari, P. Knafelz, A. Mezzelani, A. Marabotti, L. Milanese, G. Pertica, M. Polli, P.G. Brambilla, M. Kittleson, L.A. Lyons, and F. Porciello

Dal Dip. Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università di Milano, Milano, Italia (Longeri, Pertica, Polli, Brambilla); dalla Clinica Veterinaria Orobica- Bergamo e il Dip. Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia, Italia (Ferrari); dall'Ospedale Veterinario Gregorio VII – Roma e il Dip. Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia, Italia (Knafelz); dall'Istituto per le Tecnologie Biomediche – Consiglio Nazionale delle Ricerche d'Italia, Segrate (Milano), Italia (Mezzelani, Marabotti, Milanese); dal Department of Medicine and Epidemiology and Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California – Davis, Davis, CA (Kittleson, Lyons); e dal Dip. Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia, Italia (Porciello).

Corresponding author: Prof. Maria Longeri – via Celoria, 10; 20133 Milan, Italy; e-mail: maria.longeri@unimi.it

Submitted March 19, 2012; Revised September 9, 2012;

Accepted November 6, 2012.

Copyright © 2013 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/jvim.12031

Background: Due mutazioni nel gene della Proteina C legante la Miosina (MYBPC3) sono state identificate nei gatti Maine Coon (MCO) e Ragdoll (RD) con Cardiomiopatia Iperτροφica (HCM).

Obiettivo: Questo studio ha esaminato la frequenza di queste mutazioni e del polimorfismo A74T per descrivere la loro distribuzione a livello mondiale e la loro correlazione con il referto ecocardiografico. Animali campionati: 1855 gatti, che rappresentano 28 razze pure e gatti di casa da tutto il mondo, di cui 446 sottoposti ad esame ecocardiografico.

Metodi: Questo è uno studio prospettico trasversale. I polimorfismi sono stati individuati nel genoma tramite Illumina VeraCode Golden Gate o tramite sequenziamento diretto. Lo stato della malattia è stato definito tramite ecocardiografia secondo le linee guida stabilite a livello internazionale. Il calcolo della probabilità congiunta di avere HCM clinica e un determinato assetto allelico è stata calcolata anche con meta-analisi (NdT. cioè mettendo insieme i dati del presente lavoro e quelli precedentemente pubblicati da altri autori). E' stata anche simulata un'analisi funzionale.

Risultati: Le varianti di MYBPC3 A31P e R820W sono state trovate rispettivamente soltanto nell'MCO e nel RD. HCM clinica si è riscontrata sia nei gatti di razza pura che nei gatti di casa e l'incidenza risulta aumentare con l'età. Il polimorfismo A74T non è associato ad alcun fenotipo. HCM è risultato prevalente nei MCO omozigoti per la mutazione A31P e la penetranza risulta aumentare con l'età. Nel MCO La penetranza del genotipo eterozigote A/P è risultata più bassa (0,08) rispetto a quella del genotipo omozigote P/P (0,58).

Conclusioni e importanza clinica: La mutazione A31P è presente frequentemente nei gatti MCO. L'alta incidenza di HCM negli omozigoti per la mutazione supporta la natura causativa della mutazione A31P. La penetranza è incompleta per gli eterozigoti al locus A31P, almeno in giovane età. La variante A74T non appare correlata con l'HCM.

Parole chiave: Gatto domestico; HCM; Meta-analisi; Mutazioni; SNP.

Abbreviazioni:

A: adenina

BUN: azoto ureico nel sangue (NdT Il valore chiamato BUN è utilizzato soprattutto nei paesi anglosassoni per indicare il livello di azotemia, e si calcola dividendo il valore di urea espresso in mg/dl per 2,14 (intervallo di confidenza).

C: citosina

G: guanina

HCM: cardiomiopatia ipertrofica

IVS: setto interventricolare

LA/Ao: rapporto atrio sinistro/radice aortica

LVW parete ventricolare sinistra

MYBPC3: Proteina C legante la Miosina

OR: Odd Ratio

RMC: cardiomiopatia restrittiva

SAM: movimento sistolico anteriore della valvola mitrale

SNP: polimorfismo a singolo nucleotide

T-4: l-tiroxina

T: timina

US: ultrasuoni

La cardiomiopatia ipertrofica (HCM) è la più comune malattia cardiaca nei gatti. Essa colpisce anche l'uomo, circa uno su 500, e mostra una enorme eterogeneità genotipica e fenotipica.^{1,2} Nell'uomo più di 630 mutazioni in almeno 12 diversi geni, 10 dei quali sono geni del sarcomero, causano HCM.³⁻⁵

I modelli animali indicano che la malattia clinica non è la conseguenza di un'aplo-insufficienza o di un'alterata stechiometria dei componenti del sarcomero, ma si manifesta con gli effetti dominanti della proteina mutante sulla funzionalità del sarcomero.⁶

Presumibilmente, le mutazioni del sarcomero alterano il processo molecolare della contrazione muscolare e attivano i processi di replicazione del sarcomero, causando un aumento della larghezza delle cellule muscolari e, conseguentemente, un ispessimento della parete cardiaca (ipertrofia).⁷ Comunque, permangono molte domande riguardo ai meccanismi che stanno alla base di questa patologia. Nei gatti, una prevalenza in particolari razze, che suggerisce una componente ereditabile dell'HCM, è stata descritta per i gatti Siberiano, Sphynx, American Shorthair, Cornish Rex, Persiano, Europeo, British Shorthair, Bengal, Chartreux, e Norvegese Delle Foreste.⁷⁻¹⁵ nei Maine Coon e nei Ragdoll è stata identificata l'ereditarietà autosomica di tipo dominante e sono state individuate 2 mutazioni causative nella Proteina C legante la Miosina (MYBPC3), che consistono in sostituzioni amminoacidiche – A31P nel MCO e R820W nel RD.⁹⁻¹³ Nell'uomo le mutazioni di MYBPC3 mostrano una penetranza bassa e correlata all'età negli eterozigoti. Si è visto che le proteine codificate da alcuni geni modificatori contribuiscono alla penetranza di tali mutazioni, tra questi il gene codificante per l'enzima convertitore dell'angiotensina e il gene codificante per il recettore dell'angiotensina 1.¹⁶ Questi ed altri geni "modificatori", suggeriti dalla penetranza incompleta e dall'eterogeneità fenotipica, non sono però stati identificati nei gatti. Inoltre, nessun'altra maggiore mutazione causativa di HCM è stata fin'ora identificata in altre razze feline.

Diversi studi hanno investigato nei gatti Maine Coon la frequenza della mutazione causativa di HCM (NdT A31P) in diversi Paesi e la sua correlazione con l'HCM.¹⁷⁻¹⁹

Questi studi tuttavia hanno esaminato gatti visitati una sola volta e per la maggior parte gatti giovani che avrebbero potuto non esprimere ancora un fenotipo compatibile con HCM. Nel marzo 2008 fu fondato l'Osservatorio Italiano HCM Felina (<http://www.hcmfelina.com/>) da un network di allevatori, genetisti e

veterinari clinici per valutare in modo integrato e nel tempo l'HCM felina. Questa collaborazione punta a monitorare le malattie ereditabili del gatto, primariamente HCM, in Italia. L'osservatorio fornisce servizi agli allevatori ed alla comunità scientifica: (1) aggiornamento agli allevatori; (2) genetic consulting ad allevatori e veterinari clinici, principalmente riguardo alla corretta applicazione dei nuovi strumenti diagnostici genetici; (3) organizzazione a livello nazionale di veterinari selezionati che operano in riferimento a linee guida controllate e condivise; (4) creazione di una banca biologica e di un database da condividere con la comunità scientifica.

Il presente lavoro esamina la frequenza delle mutazioni di MYBPC3 specifiche associate ad HCM, in gatti di razza pura e popolazioni feline random-bred (NdT sono i gatti di casa o di strada, comunque non sottoposti a riproduzione selezionata) in provenienti da tutto il mondo. In aggiunta alle mutazioni del Maine Coon e del Ragdoll riportate, un altro polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) in MYBPC3 (A74T) si è sospettato che causasse HCM nei MaineCoon, sebbene ciò sia stato successivamente smentito.¹⁹⁻²⁰ Quindi anche il polimorfismo A74T è stato genotipizzato per il seguente lavoro, sequenziando gatti italiani che erano stati arruolati nell'Osservatorio e sottoposti ad ecocardiografia.

Materiali e Metodi

Animali

Sono stati genotipizzati per le mutazioni MYBPC3 A31P e R820W 1174 gatti con pedigree di 28 razze e 681 gatti random-bred provenienti da 20 differenti aree geografiche di tutto il mondo (per un totale di n=1855 gatti) (Tabella 1). La genotipizzazione è stata effettuata con tecnologia Illumina VeraCode GoldenGate o con sequenziamento diretto classico. Solo i gatti con pedigree e i gatti "di casa" provenienti dall'Italia con i risultati ecocardiografici, e conseguentemente utilizzabili nell'analisi statistica OR, sono stati testati per il polimorfismo A74T (tramite sequenziamento diretto classico). (Tabella 3). I gatti con pedigree sono stati forniti da proprietari residenti in Italia o nella Svizzera italiana. I gatti provenienti dagli USA comprendono gatti della California del Sud e del Nord e delle Hawaii. La valutazione ecocardiografica non è stata eseguita per la maggior parte dei gatti. Tuttavia, una sub-campionatura di 446 gatti, comprendente 232 Maine Coon, 37 Ragdoll, 37 gatti di casa dall'Italia, 55 Siberiani, 35 Norvegesi delle Foreste, e 7 gatti di altre razze, è stata controllata per HCM tramite ecocardiografia. Inoltre un ulteriore sottocampione di 203 gatti (11 razze) è stato esaminato con sequenziamento diretto nelle regioni fiancheggianti i loci A31P, A74T, e R820W per di identificare ulteriori eventuali polimorfismi.

Caratterizzazione fenotipica di HCM

Quindici veterinari, con pratica clinica di cardiologia, sono stati accreditati come esaminatori dal Comitato Scientifico dell'osservatorio attraverso un esame pratico. Gli esaminati hanno sottoposto al Comitato Scientifico uno studio clinico-ecocardiografico completo. Tutte le immagini ecocardiografiche e le misure sono state archiviate digitalmente e analizzate per assicurare che fossero stati ottenuti piani d'immagine, posizionamento del cursore, e misure atriali e ventricolari sinistre corretti. Le misure fatte dagli esaminati dovevano cadere nei limiti di 0,5 mm ($\pm 0,25$ mm) delle misure ottenute dal Comitato Scientifico tramite il software dedicato (MayLab-Desk v6.10-Esaote and Sante DICOM Viewer v1.3.4). I veterinari che hanno completato con successo l'esame sono stati arruolati nell'osservatorio e hanno eseguito tutti gli esami ecocardiografici per definire lo stato della malattia. Gli studi ecocardiografici sono stati eseguiti seguendo le linee guida pubblicate sul sito web dell'osservatorio e sono basate sulle raccomandazioni dell'American College of Veterinary Internal Medicine.¹⁷ I risultati sono stati inviati da ogni esaminatore ad un database online. Le misure degli spessori di fine-diastole delle pareti ventricolari (LV) di sinistra (sia settali che parete libera) sono state ottenute nella proiezione asse corto parasternale a livello del muscolo papillare in B-mode. Dalla stessa proiezione sono state ottenute le misure in M-mode delle dimensioni della camera ventricolare sinistra e lo spessore della parete dell'LV (sia settale che caudale) ed è stata calcolata la frazione d'accorciamento. Ogni ispessimento focale della parete settale o caudale del ventricolo sinistro è stato misurato anche durante la diastole, con particolare riferimento alla possibile presenza di ispessimento settale interventricolare subaortico o morfologia anormale dei muscoli papillari. Sono stati anche misurati il

diametro della radice dell'aorta e l'atrio sinistro e il rapporto atrio sinistro/radice aortica (LA/Ao) è stato calcolato tramite immagine in B-mode nella vista dell'asse corto parasternale a livello della valvola aortica.

I criteri per la categorizzazione dell'HCM sono presentati in Tabella 2. L'HCM è stato classificato come grave se la parete del LV era >7 mm, e dove almeno una delle seguenti condizioni era presente: obliterazione sistolica della camera dell'LV; presenza di ostruzione dinamica (movimento sistolico craniale della valvola mitrale [SAM] od ostruzione dinamica medio-ventricolare); allargamento dell'atrio sinistro o presenza di un trombo nell'atrio sinistro insieme con un ecocontrasto spontaneo.

Prima dell'inserimento finale delle misure e i calcoli nel database nazionale, i dati e le immagini sono state analizzate tramite MayLab Desk v6.10–Esaoite and Sante DICOM Viewer v1.3.4 da 2 dei 3 veterinari del Comitato Scientifico (PF e PK), per verificare che le viste ecocardiografiche e le misure fossero state ottenute correttamente. In caso di dubbio, l'esame ecocardiografico e le misure sono state analizzate dal terzo membro del Comitato Scientifico (FP). I gatti con severa ipertrofia dei muscoli papillari (valutazione soggettiva), ma senza ispessimento della parete dell'LV sono stati considerati dubbi. Nei pazienti con una parete dell'LV maggiore di 6 mm, sono stati eseguiti test addizionali per escludere ipertiroidismo, insufficienza renale, ipertensione concomitante e diabete mellito (vedi Tabella 2).

Tabella 1. Razza e numero di gatti con pedigree e gatti di casa genotipizzati a MYBPC3 per i polimorfismi relativi all'HCM. I gatti italiani sono stati genotipizzati per i loci A31P, R820W e A74T. I gatti statunitensi sono stati tipizzati per i loci A31P e R820W.

Pedigreed Breed Populations			Random Bred Cats				
Breed	Origin	n	Breed	Origin	n	Origin	n
Abyssinian (ABY)	USA	26	Norwegian Forest Cat	USA	18	BRAZIL	30
American SH (ASH)	USA	13	(NFC)	Italy	23	CHINA	20
Bengal	Italy	4	Persian (PER)	USA	94	CYPRUS	30
Birman (SBI)	USA	29		Italy	3	DUBAI	9
British Shorthair (BSH)	USA	23	Ragdoll (RAG)	USA	25	EGYPT	46
	Italy	11		Italy	141	GERMANY	29
Burmese (BUR)	USA	24	Russian Blue (RUS)	USA	16	INDIA	27
Chartreuse (CHA)	USA	21	Scottish Fold (SFS)	USA	15	IRAQ	4
Cornish rex (CRX)	USA	15	Siamese (SIA)	USA	16	IRAN	112
Devon Rex (DRX)	Italy	1	Siberian (SIB)	USA	15	ISRAEL	46
Egyptian Mau (MAU)	USA	15		Italy	31	ITALY	59
Exotic (EXO)	USA	27	Singapura (SIN)	USA	17	KOREA	39
Havana Brown	USA	10	Sokoke (SOK)	USA	8	KENYA	36
Japanese Bobtail (JBT)	USA	19	Sphynx (SPH)	USA	23	PATE-LAMU	30
Korat (KOR)	USA	25		Italy	3	SINGAPORE	29
Maine Coon (MCO)	USA	31	Turkish Angora (TUA)	USA	13	SRI LANKA	24
	Italy	502	Turkish Van (TUV)	USA	17	TURKEY	62
Manx (MAN)	USA	15				USA	29
						VIETNAM	20
			Total Pedigreed	1174		Total random bred	681

Tabella 2. Criteri diagnostici ecocardiografici: Misure di fine-diastole della parete ventricolare sinistra (LVW) e del setto interventricolare (IVS) ottenute dalla vista destra dell'asse corto parasternale in B/M mode. Risultati clinici e diagnosi.

LVWed and/or IVSed Thickness (mm)	Results	HCM	Recheck Time and Laboratory Tests
≤ 5.5	normal	negative	12 months
> 5.5 and ≤ 6.0	questionable	borderline	6 months
> 6.0 and ≤ 6.5	affected	mild	6 months + t4 creatinine, BUN and systemic blood pressure
> 6.5 and ≤ 7.0	affected	moderate	6 months + t4 creatinine, BUN, and systemic blood pressure
> 7.0	affected	severe	1–3 months + t4 creatinine, BUN, and systemic blood pressure

Sono richiesti visite di ricontrollo programmate e ulteriori test di laboratorio per confermare la diagnosi. t4 = L-tiroxina, BUN = azoto ureico nel sangue

Caratterizzazione genotipica

Il DNA genomico è stato estratto sia da tamponi buccali che da sangue periferico tramite kit commerciali (Illustra Blood Genomic Prep Mini-Spin Kit,^a o QIAamp DNA blood mini kit^b) in accordo con le istruzioni del produttore.

I campioni dall'Italia sono stati genotipizzati tramite sequenziamento di entrambi i filamenti di DNA, usando l'ABI Dye Terminator Sequencing Chemistry 3.1 e un sequenziatore automatico ABI310^c, seguendo i protocolli standard. La sequenza di riferimento per il disegno dei primers e per i confini esone-introne è stata ENSFCAG00000002530, da Ensemble. La nomenclatura per la descrizione delle variazioni di sequenza è stata stilata secondo denDunnen.²¹ Un amplificato di 209 bp ha compreso sia la mutazione A31P che il polimorfismo A74T, mentre un secondo amplificato è stato disegnato per includere la mutazione R820W. Questi ampliconi sono stati ottenuti rispettivamente usando i seguenti primers: F1-5'GAAGCCAAGGTCAGTGGAAAG, R1-5'CCTACGCAGTCATCGCTG e F2-5'CAGCAATGTGGGTGAGGAC, R2-5'CTGACCAGGGAGGGTGTG,. Un ulteriore amplificato di 442 bp (introne1-2/esone2), parzialmente sovrapposto all'amplificato F1-R1 è stato prodotto per analizzare l'estremità 3' dell'introne1-2, usando i seguenti primers: F3:5'TTCTGCCTACTGGCTGTGTG e R1:5'CCTACGCAGTCATCGCTG. L'amplificazione standard con Flexi DNA Polymerase^d è stata eseguita in un volume finale di 30 µL, usando 33 cicli con una temperatura di annealing di 58 e 62°C rispettivamente per i frammenti A31P-A74T e R820W, su un termociclatore 9300ABI.^e Per il sequenziamento è stata usata la chimica Big Dye Terminator v3.1^e e l'elettroforesi è stata eseguita su un Applied Biosystems 310 o un 3100 DNA Analyzer. Gli elettroferogrammi di sequenza sono stati processati con BioEdit v7.0.5, allineati e confrontati con MEGA v4.²²

I campioni dagli altri Paesi sono stati genotipizzati tramite Illumina VeraCode GoldenGate Genotyping Assay.^e I primers sono stati disegnati con il software VeraCode Assay Designer. L'amplificazione con GoldenGate Assay e le letture BeadXpress sono state eseguite, secondo il protocollo del produttore, su 50-500 ng di DNA o su prodotto di amplificazione dell'intero genoma. Per analizzare i dati è stato usato il software BeadStudio v3.1.3.0 con il modulo di Genotipizzazione vs3.2.23^e. Qualsiasi campione con un call rate <0,80 è stato escluso dalle successive analisi di cluster. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dovevano avere un Gen Train Score >0,55 per essere inclusi nello studio.

Analisi statistiche

Le frequenze alleliche e genotipiche sono state calcolate tramite conta diretta. L'allele selvatico al locus A31P è sul DNA la guanina (G), mentre l'allele mutato è la citosina (C). Al locus A74T l'allele presunto selvatico è ancora una guanina (G) e il presunto allele mutato è un'adenina (A). Al locus R820W l'allele selvatico è una citosina (C) e l'allele mutato è una timina (T).

I gatti sottoposti ad ecocardiografia sono stati raggruppati in classi di età come segue: 0=≤12 mesi; 1=13-24 mesi; 2=25-36 mesi; 3=37-48 mesi; 4=49-60 mesi; 5=≥61 mesi. Sono stati esclusi dalle analisi statistiche i gatti con diagnosi dubbia (borderline). Per il confronto genotipo / fenotipo effettuato nei Maine Coon, i gatti sono stati classificati in 2 classi: sani o malati; questi ultimi comprendono tutti i gradi di severità clinica dell'HCM: lieve, moderato e grave.

L'OR per la probabilità di avere sia HCM che gli alleli mutati è stato calcolato sia per le varianti A31P che A74T indipendentemente, considerando 4 scenari: Scenario 1: Numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti P/P contro numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti per l'allele selvatico A/A al locus A31P, e numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti T/T contro numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti per l'allele selvatico A/A al locus A74T.

Scenario 2: numero di Maine Coon (sia sani che malati) eterozigoti A/P contro numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti A/A al locus A31P; e numero di Maine Coon (sia sani che malati) eterozigoti A/T contro numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti A/A al locus A74T.

Scenario 3: Numero di Maine Coon (sia sani che malati) eterozigoti A/P contro numero di Maine Coon (sia sani che malati) omozigoti P/P al locus A31P; e numero di Maine Coon (sia sani che malati) eterozigoti A/T contro numero di Maine Coon (sia sani che malati) T/T al locus A74T.

Scenario 4: Numero di Maine Coon (sia sani che malati) P/P e A/P contro A/A al locus A31P; e numero di Maine Coon (sia sani che malati) T/T e A/T contro A/A al locus A74T.

Applicando tutti e 4 gli scenari (quindi limitata ai loci A31P e A74T) è stata effettuata una meta-analisi, unendo i dati del presente lavoro e quelli pubblicati precedentemente^{19,23}

E' stato calcolato l'OR per la probabilità congiunta di avere HCM ed entrambi gli alleli mutati nei siti A31P e A74T; ed è stato anche calcolato l'OR di avere HCM ed uno specifico sesso. La capacità del test per la mutazione A31P di predire il fenotipo ecocardiografico è stata valutata calcolandone sensibilità e specificità.

Il modello per il primo dominio della proteina MYBPC3 di tipo selvatico è stato fatto tramite Modeller 9v8²⁴ usando la struttura della proteina MYBPC3 umana (file PDB: 2K1M) come templatato. La qualità sterica della proteina è stata valutata con Procheck²⁵ e l'energia dei legami strutturali è stata valutata con Prosa²⁶. Le forme mutate della proteina sono state create usando gli script "Mutate_model" di Modeller DSSP,²⁷ NACCESS,²⁸ HBPLUS.²⁹ Per le analisi funzionali sono stati usati il server PoPMuSIC³¹ e un "in-house" Perl script sulla base dei criteri formulati da Kumar e Nussinov.³⁰ per la ricerca di possibili ponti salini L'impatto delle mutazioni sulla struttura, la funzionalità e la stabilità della proteina è stato valutato tenendo conto degli effetti sulla struttura secondaria, la variazione dell'accessibilità nel solvente residuale, la rottura dei legami idrogeno, i pattern dei ponti salini, e la stabilità della proteina, similmente alla valutazione degli effetti strutturali delle mutazioni fatte sulla galattosio-1-fosfato uridiltransferasi, un'altra proteina coinvolta in una malattia genetica.³²

Risultati

I gatti random bred e i gatti con pedigree (N=1855) sono stati genotipizzati ai loci MYBPC-A31P, A74T, R820W, o a tutte le combinazioni di questi polimorfismi (Tabella 1). Solo i gatti sequenziati (colonna "Origin Italy" in Tabella 3) sono stati genotipizzati per tutti e tre i loci, mentre i gatti genotipizzati con DNA array felino (NdT: analisi su una matrice ad alta densità di loci SNP) sono stati tipizzati solo per A31P e R820W, non essendo incluso nell'array il polimorfismo A74T (Tabella 3). La mutazione A31P era risultata presente solo nei Maine Coon. Le frequenze alleliche nei Maine Coon dall'Italia e dagli USA sono state rispettivamente 0,23 e 0,145. Tutti gli altri gatti di razze non Maine Coon e non Ragdoll erano omozigoti per l'allele selvatico. Lo SNP A74T era presente sia nei gatti random bred che in tutte le razze con pedigree, eccetto il Devon Rex (N = 1). La frequenza dell'allele era alta nel British Shorthair (0,32) e nei gatti di casa (0,53), con un range da 0,17 nel Persiano e nel Maine Coon fino ad essere "fissato" nei 4 gatti Bengala analizzati. L'allele mutato R820W è stato trovato solo nei Ragdoll. Le frequenze alleliche erano 0,17 nei gatti dall'Italia e 0,23 nei gatti dagli USA. Tutti gli altri gatti erano omozigoti per l'allele selvatico. (Tabella 3).

I 446 gatti che sono stati casualmente registrati nell'osservatorio, senza nessuna selezione, tanto da rappresentare un campione, nell'opinione degli autori, molto poco, se non completamente esente, da bias (NdT è l'assenza di casualità nella raccolta della campionatura che può distorcere il risultato dell'analisi statistica). I gatti sono stati caratterizzati fenotipicamente tramite ecocardiografia (presentata in Tabella 4). L'HCM è stato identificato nella maggioranza delle razze feline dello studio. L'HCM non è stato identificato in alcun gatto Sacro di Birmania (n=8), Scottish Fold (n=2), o Sphynx (n=10) esaminato. Un Devon Rex stato considerato dubbio (borderline). Nelle razze affette, la prevalenza ha un range dal 2,9% dei Ragdolls (95% CI = 2,7-8,6%) al 16,7% dei Bengala (95% CI= 13,2-46,5%). I gatti random bred italiani avevano una

prevalenza del 15,4% (95% CI = 1,5-29,3%) e i gatti Maine Coon avevano una prevalenza del 10,1% (95% CI = 5,8-14,3%). Tutti e 3 i Persiani esaminati erano affetti. I gatti con esami dubbi (n=46) sono stati esclusi dalle analisi statistiche successive.

Quando si è analizzata l'associazione tra i risultati ecocardiografici e l'età e il genotipo al sito A31P (gatti Maine Coon; Fig 1A), è stato visto un progressivo e rapido aumento nell'incidenza di HCM nei mutati omozigoti (n=12), e tutti i 4 gatti d'età superiore a 36 mesi erano malati (Fig 1A). Invece la penetranza nei Maine Coon eterozigoti era in valore assoluto bassa (0,08) e più bassa che nei mutati omozigoti (0,58), ma più alta che negli omozigoti per l'allele selvatico (0,05). Le meta-analisi hanno rilevato una penetranza simile nei gatti C/C (NdT omozigoti mutati) (0,59) e nei gatti omozigoti per l'allele selvatico (0,058), ma un rischio raddoppiato di HCM nei gatti eterozigoti C/G (0,10). L'età media d'insorgenza di HCM non è ancora determinata per questi eterozigoti. Nel nostro campione, più dell'80% dei gatti eterozigoti rimaneva sano almeno fino ai 4 anni di età e l'età media degli eterozigoti sani rimaneva maggiore del 50% dopo i 5 anni. Comunque solo pochi gatti nel nostro studio superavano i 4 anni di età e l'età media d'insorgenza di HCM non ha potuto essere determinata.

Sono state riscontrate anche alcune discrepanze: due gatti maschi omozigoti per l'allele selvatico (G/G) nelle classi di età 1 e 2 (Fig 1A) avevano HCM grave. C'erano anche 3 gatti omozigoti per l'allele selvatico, uno nella classe d'età 4 e due nella classe d'età 5 che erano lievemente affetti.

I risultati ecocardiografici non erano tuttavia associati con età o genotipo per il polimorfismo A74T. (Fig 1B).

Tabella 3. Frequenze alleliche e genotipiche per i polimorfismi su MYBPC3 nei gatti con pedigree e ad incrocio casuale.

Breed*	Origin	A31P					A74T					R820W				
		n.	G/G	G/C	C/C	C	n.	G/G	G/A	A/A	A	n.	C/C	C/T	T/T	T
Bengal	Italy	4	1	0	0	0	4	0.00	0.00	1.00	1.00	4	1	0	0	0
British Shorthair	Italy	11	1	0	0	0	11	0.64	0.09	0.27	0.32	10	1	0	0	0
Devon Rex	Italy	1	1	0	0	0	1	1.00	0.00	0.00	0.00	1	1	0	0	0
Maine Coon	Italy	502	0.62	0.30	0.08	0.23	359	0.68	0.29	0.03	0.17	95	1	0	0	0
	USA	31	0.774	0.161	0.064	0.145	-	-	-	-	-	31	1	0	0	0
Norwegian Forest	Italy	23	1	0	0	0	21	0.57	0.43	0.00	0.21	22	1	0	0	0
Persian	Italy	3	1	0	0	0	3	0.67	0.33	0.00	0.17	3	1	0	0	0
Ragdoll	Italy	27	1	0	0	0	26	0.50	0.46	0.04	0.27	141	0.67	0.32	0.01	0.17
	USA	25	1	0	0	0	-	-	-	-	-	24	0.583	0.375	0.041	0.229
Siberian	Italy	31	1	0	0	0	30	0.50	0.40	0.10	0.30	29	1	0	0	0
Sphynx	Italy	3	1	0	0	0	3	0.00	0.67	0.33	0.67	5	1	0	0	0
Random B.	Italy	20	1	0	0	0	18	0.17	0.61	0.22	0.53	18	1	0	0	0

*Solo le razze e le popolazioni positive per gli alleli mutanti su A31P (C) e R820W (T) o testati per il SNP A74T sono mostrati in tabella. Le razze tipizzate rimanenti sono elencate in Tabella 1.

A = adenina, T = timina, G = guanina, C = citosina.

L'analisi della correlazione tra i gatti affetti e il genotipo ai loci A31P e A74T, presi singolarmente ed ad entrambi i loci è stata eseguita solo nei Maine Coons, poiché questa era la razza più rappresentata e poiché A31P è esclusivo di tale razza. Abbiamo valutato 208 Maine Coon-189 sani e 19 affetti; 7 omozigoti mutati, 5 eterozigoti e 7 omozigoti di tipo selvatico (Tabella 5A). Significativamente, sono stati riconosciuti effetti differenti tra i genotipi C/C e G/G per il fenotipo ecocardiografico (affetti contro non affetti). Per un

MCO omozigote per la mutazione A31P l'OR di avere HCM era 26,4 (95% CI = 6,7-104; Fisher $\leq 0,0001$). La sensibilità del test era bassa (50%), ma la specificità era alta, 96% (CI 0,91-0,98) per i gatti di tutte le età. Quando è stata fatta una meta-analisi usando un totale di 335 gatti (151 gatti dalla popolazione di questo studio e 184 gatti da studi pubblicati precedentemente^{19,23}), questo effetto significativo è stato confermato (OR 23,7; 95% CI = 8,9-62; Fisher $\leq 0,00019$), Tabella 5A. Invece i Maine Coon eterozigoti per la mutazione A31P avevano un OR molto più basso di sviluppare HCM (OR 1,81; 95% CI = 0,84-3,90, Tabella 5A).^{24,33} Confrontando omozigoti mutati con eterozigoti più omozigoti di tipo selvatico, l'OR rimaneva alto (OR 21,46; 95% CI = 5,93-77,8; Fisher $\leq 0,0001$) (Tabella 5A). L'effetto del fattore sesso è risultato significativo (OR 5,95; 95% CI = 1,93-18,65; Fisher $\leq 0,0007$) con i maschi più frequentemente affetti delle femmine (Tabella 5C).

Nessuna correlazione statisticamente significativa è stata invece riconosciuta tra genotipo ed HCM per la presunta mutazione A74T sui campioni in questo studio né in meta-analisi (Tabella 5B), forse in parte perché il numero di omozigoti era basso. È stata anche considerata la covarianza di A31P e A74T; tuttavia nel campione di gatti esaminato non erano presenti tutte le possibili combinazioni di genotipi, ma erano disponibili erano presenti solo gatti con genotipi, rispettivamente ai loci A31P e A74T, selvatico-selvatico, eterozigote-eterozigote o eterozigote-omozigote, ma non è risultato nessun effetto significativo (dati non mostrati).

L'allele mutato al locus R820W è risultato esclusivo dei Ragdoll (Tabella 2). L'analisi statistica della correlazione tra HCM e genotipo per questo locus non è stata possibile poiché solo 37 gatti erano presenti nel campione (33 sani, 3 dubbi (borderline) ed uno lievemente affetto, Tabella 4).

Una coorte più piccola di 203 gatti, esaminati ecocardiograficamente, è stata valutata nei due amplicon più grandi (442 e 396 bp) per identificare eventuali ulteriori polimorfismi (Tabella 6). La variabilità della sequenza è stata rilevata principalmente nella regione fiancheggiante il locus A74T (posizioni 175, 186, 222), nell'esone 2 di MYBPC3, suggerendo un dominio meno conservato (Fig 2). Tutti i polimorfismi aggiuntivi identificati non avevano specificità di razza e l'OR non è stato calcolato a causa della campionatura troppo poco numerosa.

È stata infine eseguita un'analisi funzionale di ogni mutazione usando un approccio differente rispetto ai precedenti studi. La struttura sperimentale della proteina felina non è disponibile, ma le forme di tipo selvatico del primo dominio e la MYBPC3 umana condividono più del 90% dell'identità di sequenza. Di conseguenza, la struttura della proteina umana è un affidabile punto di partenza per modellizzare la struttura della proteina felina usando un protocollo modellistico comparativo. Sono stati creati 10 modelli e il migliore in termini di qualità sterica della proteina e dell'energetica della struttura è stato scelto per i passi successivi. Le mutazioni A31P e A74T sono state modellizzate usando lo script "Mutate_model" poiché questa procedura ha dato migliori risultati per il posizionamento del gruppo laterale.³⁴ Sembra che la mutazione A31P colpisca un residuo posto nel mezzo del filamento beta che forma il foglietto beta della proteina. La sostituzione dell'alanina con la prolina causa effetti non previsti sull'accessibilità ai solventi e potenziali collegamenti con ponti salini in questa zona. Comunque, è prevedibile che la mutazione alteri la struttura secondaria causando l'interruzione, e poi l'accorciamento, del foglietto beta nel core proteico (Fig 2, blu). In aggiunta, questa mutazione contrasta la formazione di un legame idrogeno coinvolgente il residuo 31 e His64. Questi due effetti strutturali sono potenzialmente capaci di alterare il ripiegamento complessivo e la stabilità della proteina. Questo è in accordo con la diminuita stabilità predetta per questa proteina mutata tramite il server PoPMuSIC. Al contrario, l'SNP A74T sembra non alterare alcuna caratteristica strutturale, come i legami idrogeno o i pattern dei ponti salini, le strutture secondarie o l'accessibilità ai solventi, o la stabilità complessiva della proteina. Comunque, poiché A74T è situato sulla parte esterna della proteina (Fig 2, magenta) potrebbe comunque disturbare l'interazione che la MYBPC3 potrebbe avere con altre proteine o strutture.

Discussione

Questo studio è stato finalizzato a chiarire l'effetto delle varianti genotipiche A31P e A74T nella MYBPC3 felina sullo sviluppo dell'HCM usando un largo campione di gatti domestici con pedigree e random bred. Gli esseri umani che presentano mutazioni nel gene MYBPC3 sviluppano un ampio spettro di fenotipi HCM, e gli eterozigoti frequentemente non hanno evidenza ecocardiografica di HCM fino a raggiungere la quinta o sesta decade di vita. Si è ipotizzato che questa penetranza ridotta e correlata con l'età sia un effetto legato alla funzione della proteina stessa all'interno del sarcomero, così come anche ad altri fattori multipli e complessi quali geni modificatori, effetti ambientali, fattori epigenetici, o tutte le cose insieme.³⁵ Allo stesso modo, il nostro studio conferma che i Maine Coon eterozigoti per la mutazione MYBPC3-A31P di solito mancano di evidenza ecocardiografica per HCM dalla giovane età fino ad un'età intermedia.^{18,19} Questo studio ha anche dimostrato che i Maine Coon omozigoti per la mutazione A31P di solito sviluppano HCM e quasi tutti lo fanno a partire da un'età intermedia. Questi risultati sono stati rafforzati e corroborati dall'esecuzione di una meta analisi effettuata usando anche dati provenienti da precedenti studi.^{17,19,23}

Negli ultimi anni, la prevalenza della mutazione A31P nei Maine Coon è stata registrata in differenti Paesi e la sua frequenza varia per area geografica.^{17-19,23} La prevalenza va da moderatamente alta in Germania (22%¹⁹), Asia (30,9%¹⁷), e Nord America (31,7%¹⁷ e 22,5% nel presente lavoro attuale) ad alta in Italia e Francia, (41,5%²³ e 38,2% nel presente lavoro) fino a quella persino più alta in Australia – Nuova Zelanda (46,3%¹⁷). Nessun dato è disponibile sulla prevalenza di R820W nei Ragdoll. A74T è stata confermata come un polimorfismo multi-razza ed è stata identificata in 8 delle 10 razze analizzate, persino in molte razze dove il numero di gatti era estremamente basso,¹⁹ e in gatti di casa random bred. La frequenza genotipica di A74T (35%) nei Maine Coon italiani è in accordo con un altro studio precedente in Germania.³³

Nel presente studio, un ampio campione di gatti di razze differenti è stato genotipizzato per determinare le frequenze alleliche e genotipiche su MYBPC3 ai loci A31P, A74T, e R820W. A31P e R820W sono state confermate come mutazioni esclusive rispettivamente del Maine Coon e del Ragdoll. Poiché le due mutazioni sono esclusive di queste 2 razze, probabilmente si verificarono luogo dopo la formazione della razza, che è recente per il Ragdoll ma decisamente anteriore per il Maine Coon, e risale agli inizi dell'allevamento felino in USA ai primi del '900. A74T è stata trovata in un gran numero di gatti di razza pura e random bred e quindi pare proprio un polimorfismo non specifico.

In base a questo studio e a studi precedenti, i Maine Coon eterozigoti per A31P di solito non presentano HCM clinico durante gli anni nei quali più comunemente sono allevati. Perfino gli omozigoti per la mutazione A31P possono non avere evidenza di HCM finché non sono prossimi ad un'età intermedia. Di conseguenza, l'esame ecocardiografico, specialmente di gatti giovani, non dovrebbe essere l'unico strumento diagnostico per identificare i gatti potenzialmente affetti da HCM perché per identificare i gatti con mutazioni associate all'HCM è necessario il test genetico. Quantomeno, gli allevatori dovrebbero genotipizzare i loro gatti per essere sicuri di non accoppiare tra loro gatti eterozigoti e così produrre gatti omozigoti per la mutazione A31P.

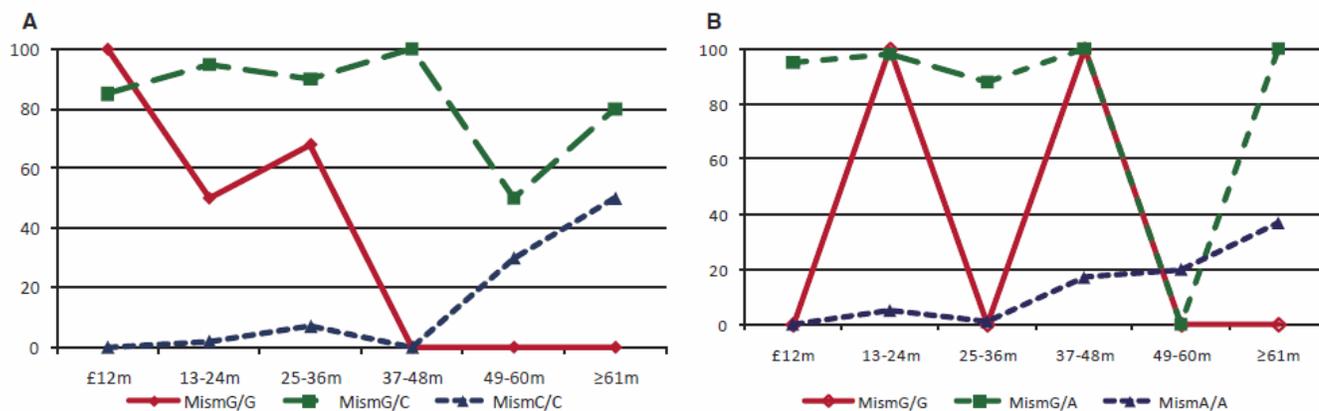


Fig 1. A. Percentuale di discordanza tra i genotipi e i risultati ecografici attesi per classe di età. La discordanza esiste quando il risultato ecografico non è concordante con il genotipo sotto l'ipotesi di un effetto causativo di HCM dominante dell'allele C al locus A31P di MYBPC3. In ordinata è indicato il numero totale di genotipi per ogni classe di età. B. Percentuale di discordanza tra i genotipi e i risultati ecografici attesi per ogni classe di età. La discordanza esiste quando il risultato ecografico non è concordante con il genotipo sotto l'ipotesi di un effetto causativo di HCM dominante dell'allele A al locus A74T di MYBPC3. In ordinata è indicato il numero totale di genotipi per ogni classe di età.

I gatti di questo studio provenienti dall'Italia ($n = 446$) sono stati sottoposti a valutazione ecocardiografica e sono stati reclutati interagendo con le associazioni di razza che hanno incoraggiato tutti i loro membri a rendere disponibili i loro gatti. I gatti sono stati reclutati dall'osservatorio casualmente, senza nessuna preselezione – ciò suggerisce, secondo l'opinione degli autori, che il campionamento sia per la maggior parte esente da bias. Comunque non si può escludere completamente che le stime siano lievemente affette da bias per quanto concerne i gatti affetti e i gatti a rischio, poiché la scelta degli allevatori di inserire o meno i loro gatti in osservatorio è stata libera. Ciò potrebbe aver fatto aumentare la frequenza dell'allele di rischio identificata nella popolazione. Lo stesso bias probabilmente esiste anche in altri studi in base al fatto che in genere gli allevatori sottopongono a controllo solo i loro gatti importanti per la riproduzione e i gatti che sanno essere a rischio, per un risparmio sui costi. Ad ogni modo, l'incoraggiamento alla partecipazione fatto dall'osservatorio può aver ridotto in gran parte il bias, considerato che la maggioranza dei proprietari partecipanti si è offerta di testare i propri gatti senza nessun criterio di priorità.

C'è stata una grande e statisticamente significativa correlazione tra la mutazione MYBPC3-A31P e il fenotipo della malattia nei mutati omozigoti Maine Coon. Ciò supporta fortemente l'ipotesi che la mutazione conferisca un significativo rischio di malattia. Lo studio ha anche mostrato che la penetranza è correlata con l'età nei gatti mutati omozigoti dal momento che alcuni dei gatti con meno di 36 mesi di età non avevano segni ecocardiografici di HCM, mentre tutti i gatti reclutati più vecchi di 36 mesi erano malati.

I risultati di questo studio sono simili a quelli effettuati sull'uomo con le mutazioni MYBPC3, sia per quanto riguarda l'insorgenza individuabile della malattia e la sua gravità. Gli esseri umani con HCM causato da una mutazione nel gene MYBPC3 (approssimativamente il 30% di tutte le mutazioni HCM conosciute nell'uomo) hanno un fenotipo più lieve con minor ipertrofia e qualche anomalia delle onde T, esordio più tardivo della forma clinica e penetranza minore se confrontati con HCM causata da mutazioni dei geni della troponina T e della subunità grande della beta miosina.³⁶ Anche la prognosi e l'aspettativa di vita sono generalmente migliori di quanto si osservi nei gatti con HCM causato da mutazioni in altri geni sarcomerici.^{37,38}

Tabella 5. Rapporto incrociato (OR) tra cardiomiopatia ipertrofica (HCM), status ecografico (US) (i gatti borderline sono esclusi) e varianti A31P-A74T (C = Citosina, G = Guanina, A = Adenina) e genere nei Maine Coon (MCO).

G/C		vs	G/G		C/C + G/C		vs	G/G		C/C	vs	G/C + G/G	
Tot	OR	95 CI	Tot	OR	95 CI OR	Tot	OR	95 CI OR	Tot	OR	95 CI OR		
196	1.81 Fisher exact t.	0.55-5.97 0.246	208	3.96 Fisher exact t.	1.48-10.60 0.0049	208	21.46 Fisher exact t.	5.92-77.80 0.00001					
433	1.82 Fisher exact t.	0.849-3.905 0.091	455	3.50 Fisher exact t.	1.841-6.658 0.0001	455	19.40 Fisher exact t.	7.676-49.04 2.084e-9					
G/A		vs	G/G		A/A + G/A		vs	G/G		G/G + G/A		vs	A/A
Tot	OR	95 CI OR	Tot	OR	95 CI OR	Tot	OR	95 CI OR	Tot	OR	95 CI OR		
180	0.76 Fisher exact t.	0.22-2.54 0.453	183	0.923 Fisher exact t.	0.30-2.82 0.566	183	5.928 Fisher exact t.	0.50-69.51 0.227					
253	1.026 Fisher exact t.	0.42-2.50 0.559	262	1.307 Fisher exact t.	0.57-2.94 0.327	262	4.770 Fisher exact t.	1.12-20.30 0.053					

		Geno type		C/C		vs		G/G	
		C/C	G/G	Tot	OR			95 CI	
A	MCO								
	Pheno-type								
	Healthy	5	52	132	151	26.4		6.66-04.58	
	HCM	7	5	7		Fisher		0.000007	
						exact t.			
	A31P	9	108	295	335	23.67		8.937-62.70	
	HCM	13	12	18		Fisher		7.44e-10	
						exact t.			

		Geno type		A/A		vs		G/G	
		A/A	G/A	G/G	Tot	OR			95 CI OR
B	MCO								
	Pheno-type								
	Healthy	2	57	109	122	5.54		0.45-65.49	
	HCM	1	4	10		Fisher		0.248	
						exact t.			
	A74T	6	75	154	179	4.812		1.09-21.10	
	HCM	3	8	16		Fisher		0.056	
						exact t.			

		Gender		Males vs Females		
		M	F	Tot	OR	95 CI OR
C	MCO					
	Pheno-type					
	Healthy	73	116	208	5.95	1.93-18.65
	HCM	15	4		Fisher	0.0007
					exact t.	

*Meta-analisi con dati da Mary e Wess.

**Meta analisi con dati da Wess. A31P; C allele mutante, G allele selvatico

La correlazione genotipo-fenotipo di MYBPC3-A74T nei Maine Coon non è risultata statisticamente significativa, ciò suggerisce fortemente che la variante aminoacidica T (nucleotidica A) sia un polimorfismo, non una mutazione associata ad un rischio di malattia, in accordo a quanto già segnalato in precedenti studi.¹⁹ Comunque, il numero di omozigoti per questo SNP in questo studio era troppo esiguo per formulare una definitiva conclusione riguardo la sua capacità di causare HCM. E' stata considerata anche la covarianza di A31P e A74T ; purtroppo nei gatti campionati non erano presenti tutte le possibili combinazioni di genotipi (NdT e quindi l'analisi è stata fatta solo con quelle disponibili). In particolare, mancavano gatti con combinazioni genotipiche P/P al locus A31P e T/T al locus A74T (dati non mostrati).

Tabella 6. Allineamento di sequenza a nucleotide multiplo di MYBPC3 felina incluse le mutazioni implicate in HCM. Le posizioni dei nucleotidi si riferiscono alla sequenza del genoma del gatto in Ensembl#ENSFCAG00000002530. US = ultrasuoni

Breed	cat n./breed	cat n./profile	Exon 2 ENSFCAE000000025802 (26-267)										Exon 26 ENSFCAE00 0000025823 (2284-2572)		US results		
			Intron 1-2 26-86 A>C	91 A31P	112	154	169	172	175	186	220 A74T	222	249	Intron 25-26 2283+28 T>C	2328	Affected	Border line
ENSFCAG00000002530			A	G	G	A	C	G	G	G	G	C	T	T	C		
Bengal	4	4	A	.	.	C	.	0	1
British	10	6	1	0
		2	A	.	.	C	.	0	0
Shorthair	10	1	R	.	.	C	.	0	0
		1	R	C	.	0	0
Random bred from Italy	18	1	R	1	0
		2	Y	.	1	0
		1	.	.	.	G	Y	.	1	0
		4	A	.	.	C	.	0	0
		3	R	.	.	C	.	0	0
		1	R	.	R	.	.	.	C	.	0	0
		5	R	.	R	.	Y	.	1	1
1	R	.	R	0	1		
Devon Rex	1	1	.	.	.	R	.	C	.	R	0	0
Persian	3	2	1	0
		1	R	1	0	
Birman	7	2	0	0
		1	A	.	.	C	.	0	0	
		1	R	.	.	C	.	0	0	
		1	R	.	.	Y	.	.	.	0	0	
Sphynx	3	2	R	.	R	Y	.	C	.	0	0
		1	A	.	.	C	.	0	0	
Siberian	28	1	R	.	R	Y	C	.	0	0
		1	R	.	R	Y	C	.	0	0
		1	.	.	A	0	0
Norwegian Forest cat	21	10	0	0
		1	C	.	1	0	
		4	R	0	0	
		5	R	.	.	C	.	1	0	
		1	R	.	.	Y	.	.	.	0	0	
Siberian	28	9	0	0
		3	C	.	0	0	
		5	R	1	0	
		3	A	.	.	C	.	0	0	
		5	R	.	.	C	.	1	0	
		1	R	.	R	Y	.	C	.	0	0	
		1	0	0
1	K	.	.	0	0		

Maine Coon	83	8	-	0	2	
		2	C	0	0
		1	M	0	0
		1	M	Y	.	0	0
		1	-	S	0	0
		1	-	A	C	.	1	0
		2	A	A	C	.	0	0
		11	-	R	Y	.	1	0
		2	-	R	C	.	0	0
		1	A	R	C	.	0	0
		6	A	R	Y	.	0	0
		4	M	R	Y	.	0	1
		3	C	R	Y	.	0	1
		3	M	S	R	Y	.	1	0
		1	C	S	R	Y	.	0	0
		3	-	S	R	Y	.	0	0
		16	-	S	Y	.	2	2
		7	-	C	4	1
		3	M	S	0	0
		6	C	S	0	0
1	C	C	1	0		
Ragdoll	25	2	-	0	0	
		1	-	T	1	0	
		3	-	Y	0	1	
		1	-	A	C	.	0	0	
		3	-	R	Y	.	0	0	
		6	-	R	C	.	0	0	
		4	-	R	.	.	Y	.	.	.	C	.	0	0	
		1	-	R	.	.	Y	.	.	.	Y	.	0	0	
		3	-	R	.	R	Y	.	.	.	C	.	0	0	
		1	-	.	.	.	R	.	S	0	0	

Una valutazione del potenziale impatto delle sostituzioni amminoacidiche causate da A31P e A74T con il software PolyPhen non ha suggerito effetti di danneggiamento sulla proteina, in accordo con Wess.¹⁹ I 2 polimorfismi, situati all'interno del motif 0-2, sono in una posizione molto esterna e uno potrebbe interagire con la titina e l'altro con l'actina.³⁹ A livello della proteina, la nostra analisi suggerisce che A31P è in grado di perturbare il ripiegamento complessivo e la stabilità della proteina e in tal modo la mutazione può causare HCM. Al contrario, A74T, anch'essa situata esternamente, sembra non alterare nessuna caratteristica strutturale di cMYBPC. Comunque, essa potrebbe potenzialmente disturbare l'interazione che la proteina potrebbe avere con altre proteine o interagenti. Similmente ai quanto riportato in studi precedenti,¹⁹ anche noi abbiamo trovato Maine Coon con HCM che non avevano la mutazione A31P, ciò suggerisce almeno un'altra causa di HCM in questa razza.

Gli allevatori di gatti e alcuni clinici discutono se considerare l'HCM nei Maine Coon causata dalla mutazione A31P un carattere autosomico dominante oppure recessivo. Nella descrizione originaria pubblicata sull' HCM nei Maine Coon, la patologia si manifestava come un carattere autosomico dominante. Questo, secondo l'opinione degli autori del presente lavoro, corrispondeva a una situazione di colonia sperimentale dove i gatti hanno più probabilità di incrocio consanguineo che in qualsiasi particolare linea di Maine Coon d'allevamento.⁷ Questo incrocio sperimentale in alta consanguineità ha probabilmente prodotto un'alta percentuale di genotipi omozigoti mutati. Una spiegazione alternativa (dati non pubblicati) è che questo gruppo di gatti avesse una prevalenza più elevata di un gene modificatore o addirittura forse un altro gene causativo di HCM, poiché è risaputo che in questa colonia anche gatti senza la

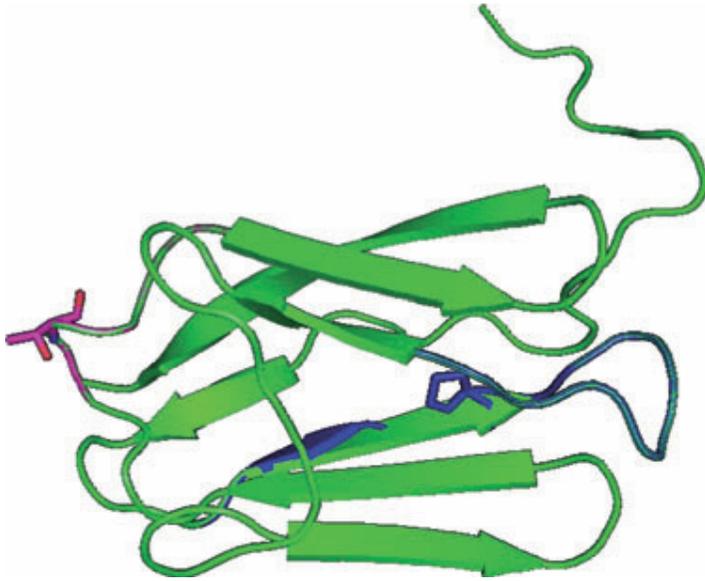


Fig 2. Modello della struttura del primo dominio della proteina MYBPC3 nella forma selvatica (verde) e delle forme polimorfiche, A31P (blu) e A74T (magenta). Il backbone della proteina è rappresentato come un fiocco, e i foglietti beta come frecce piatte. I residui 31 e 74 delle forme polimorfiche sono mostrati in rappresentazione ad aste. L'immagine è stata ottenuta usando PyMOL Molecular Graphics System.

mutazione A31P avevano sviluppato HCM. Sebbene possa essere più che altro una questione semantica chiamare una patologia ereditabile recessiva o dominante a penetranza incompleta la mutazione (NdT A31P) è in un gene (NdT MyBPC3) che codifica per una proteina strutturale e mutazioni in questo tipo di proteine di solito causano una modalità di trasmissione di tipo dominante. Infatti quando si tratta di una proteina strutturale è spesso sufficiente che solo metà di tutte le molecole di quella proteina prodotte dalla cellula siano disfunzionali (NdT come nel caso di un eterozigote) perché si determini la malattia.^{40,41} Ad ogni modo, nel caso di MYBPC3 (NdT almeno relativamente alle mutazioni A31P e R820W), pur trattandosi di una proteina strutturale, apparentemente il sarcomero può funzionare anche in completa assenza di una MyBPC3 completamente normale perché i gatti omozigoti mutati A31P e R820W non muoiono *in utero*. Se ne deduce che è pertanto possibile anche per una mutazione in un gene che codifica per una proteina strutturale determinare un tipo di trasmissione più simile a quella di un carattere autosomico recessivo. D'altra parte i caratteri autosomici recessivi si manifestano (NdT nei soggetti omozigoti) più comunemente nei soggetti giovani e più raramente presentano espressione variabile. Di conseguenza, l'HCM nei gatti Maine Coon causata dalla mutazione A31P più probabilmente dovrebbe essere teoricamente considerato un carattere autosomico dominante a penetranza incompleta.

Ringraziamenti

Ringraziamo l'Osservatorio Italiano HCM (www.osservatoriohcm.com), in particolare A. Cala DVM, A. Pini DVM, e A. Bellemo DVM per l'accurato aiuto tecnico. Ringraziamo il sig. E. Figini e il Maine Coon Club d'Italia, per la grande propositività e il supporto, l'ANFI e tutti gli allevatori che hanno reso disponibili i loro gatti e hanno reso possibile questo lavoro. Ringraziamo tantissimo il sig. P. Valiati e tutti i membri del Laboratorio di Genetica Molecolare DSA-UNIMI, e Vetogene per il grande supporto tecnico e l'aiuto. Ringraziamo anche Jennifer Kurushima, PhD, e i componenti del laboratorio della Prof.ssa L. Lyons che hanno fornito i dati genotipici Illumina. A. Marabotti e L. Milanesi sono supportati da MIUR FIRB ITALBIONET (RBPR05ZK2Z e RBIN064YAT_003), progetto pilota InterOmics. Questa ricerca è stata finanziata da UNIMI-PUR 2009 e per L. Lyons dal National Center for Research Resources R24 RR016094 ed è attualmente supportata dall'Office of Research Infrastructure Programs/OD R24OD010928.

Dichiarazione di Conflitto d'Interessi: gli Autori non rivelano alcun conflitto d'interesse.

Footnotes

- a GEHealthcare UK limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK
- b Qiagen srl, Milan, Italy
- c Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA
- d Promega Corporation, Fitchburg, WI
- e Illumina Inc, San Diego, CA

Bibliografia

1. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. *J Am Med Assoc* 2002;287:1308–1320.
2. Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: One, two, or more diseases? *Curr Opin Cardiol* 2007;22:193–199.
3. Keren A, Syrris P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: The genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008;5:158–168.
4. Xu Q, Dewey S, Nguyen S, et al. Malignant and benign mutations in familial cardiomyopathies: Insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *JMCDA* 2010;48(5):899–909.
5. Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 2011;364:1643–1656.
6. Shephard R, Semsarian C. Role of animal models in HCM research. *J Cardiovasc Transl Res* 2009;2:471–82.
7. Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon cats: An animal model of human disease. *Circulation* 1999;99:3172–3180.
8. Haggstrom J. Hypertrophic cardiomyopathy in cats—it used to be so simple! *J Feline Med Surg* 2003;5:139–141.
9. Meurs KM, Sanchez X, David RM, et al. A cardiac myosin-binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2005;14:3587–3593.
10. Feline Ferasin L, disease myocardial. *J Feline Med Surg* 2009;11:3–13.
11. Hsu A, Kittleson MD, Paling A. Investigation into the use

of plasma NT-proBNP concentration to screen for feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2009;11:563–570.

12. Schober K, Todd A. Echocardiographic assessment of left ventricular geometry and mitral valve apparatus in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2010;12:1–16.
13. Meurs KM, Norgard MM, Ederer MM, et al. A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in Ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. *Genomics* 2007;90:261–264.
14. Silverman SJ, Stern JA, Meurs KM. Hypertrophic cardiomyopathy in the Sphynx cat: A retrospective evaluation of clinical presentation and heritable etiology. *J Feline Med Surg* 2012;14:246–9.
15. Trehou-Sechi E, Tissier R, Gouni V, et al. Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: A retrospective analysis of 344 cases (2001–2011). *J Vet Intern Med* 2012;26:532–41.
16. Coto E, Palac_in M, Mart_in M, et al. Functional polymorphisms in genes of the angiotensin and serotonin systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: AT1R as a potential modifier. *J Transl Med* 2010;8:64.
17. Fries R, Heaney AM, Meurs KM. Prevalence of the myosin-binding protein C mutation in Maine Coon cats. *J Vet Intern Med* 2008;22:893–896.
18. Sampedrano CC, Chetboul V, Mary J, et al. Prospective echocardiographic and tissue doppler imaging screening of a population of Maine Coon cats tested for the A31P mutation in the myosin-binding protein C gene: A specific analysis of the heterozygous status. *J Vet Intern Med* 2009;23:91–99.
19. Wess G, Schinner C, Weber K, et al. Association of A31P and A74T polymorphisms in the myosin binding protein C3 gene and hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon and other breed cats. *J Vet Intern Med* 2010;24:527–532.
20. Nyberg MT, Koch J, Christiansen M. Intra-allelic Genetic Heterogeneity of Hypertrophic Cardiomyopathy in the Maine Coon Cat. Hugo Human Genome Meeting HGM 2007, Montreal, Canada, 2007; 199 [poster abstract].
21. den Dunnen JT, Antonarakis E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109:121–124.
22. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596–1599.
23. Mary J, Chetboul V, Sampedrano CC, et al. Prevalence of the MYBPC3-A31P mutation in a large European feline population and association with hypertrophic cardiomyopathy in the Maine Coon breed. *J Vet Cardiol* 2010;12:155–61.
24. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234:779–815.
25. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, et al. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 1993;26:283–291.
26. Sippl M. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins* 1993;17:355–362.
27. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 1983;22:2577–2637.
28. Hubbard SJ, Campbell SF, Thornton JM. Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and

- serine proteinase protein inhibitors. *J Mol Biol* 1991;220:507–530.
29. McDonald IK, Thornton JM. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J Mol Biol* 1994;238:777–793.
30. Kumar S, Nussinov R. Salt bridge stability in monomeric proteins. *J Mol Biol* 1999;293:1241–1255.
31. Gillis D, Rooman M. PoPMuSiC, an algorithm for predicting protein mutant stability changes: Application to prion proteins. *Protein Eng* 2000;13:849–856.
32. Facchiano A, Marabotti A. Analysis of galactosemia-linked mutations of GALT enzyme using a computational biology approach. *PEDS* 2010;23:103–113.
33. Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, et al. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 1993;7:247–252.
34. Marabotti A, Facchiano A. Critical assessment of side chain conformation prediction in modelling of single point amino acid mutation. *Adv Exp Med Biol* 2010a;680:283–289.
35. Tardiff JC. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: Linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail Rev* 2005;10:237–24.
36. Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 2008;77:659–666.
37. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998;338:1248–57.
38. Seidman C. Hypertrophic cardiomyopathy: From man to mouse. *J Clin Invest* 2000;106:S9–13.
39. Oakley CE, Hambly BD, Curmi PMG, et al. Myosin binding protein C: Structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell Res* 2004;14:95–110.
40. McKusick VA. *Medical Genetics: An Annotated Review*. Symposium Publications Division, 1961.
41. Wilkie AO. The molecular basis of genetic dominance. *J Med Genet* 1994;31:89–98.