

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Ipercolesterolemia familiare e difetti del gene
del recettore delle lipoproteine a bassa densità:
mutazioni italiane e loro analisi**

A cura di
Alfredo Cantafora, Francesca Prestinaci e Ida Blotta

Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN
06/23

Istituto Superiore di Sanità

Ipercolesterolemia familiare e difetti nel gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità. Mutazioni italiane e loro analisi.

A cura di Alfredo Cantafora, Francesca Prestinaci e Ida Blotta

2006, ii, 90 p. Rapporti ISTISAN 06/23

Il gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità (*Low-Density Lipoprotein Receptor*, LDLR) può andare incontro ad un gran numero di mutazioni, sia piccole sia grossolane, che danno luogo, nei portatori omo- ed eterozigoti, alla ipercolesterolemia familiare. Nonostante i grandi progressi nello sviluppo delle tecniche diagnostiche genetico-molecolari, l'ampio spettro di mutazioni che coinvolgono questo gene ha impedito lo sviluppo di sistemi diagnostici commerciali in grado di soddisfare le esigenze di un Paese geneticamente eterogeneo come l'Italia. Il presente volume vuole offrire ai laboratori impegnati nella diagnostica clinica delle dislipidemie tutte le informazioni sulle caratteristiche delle mutazioni di rilievo patologico del gene LDLR e sulla loro distribuzione territoriale nel nostro Paese. Sono inoltre descritte alcune semplici metodiche analitiche, basate sulla PCR e l'uso di enzimi di restrizione, alla portata di qualsiasi laboratorio di diagnostica molecolare per poter eseguire, in campioni di DNA genomico, la ricerca di 23 tra le più comuni mutazioni individuate in Italia.

Parole chiave: Genetica, Ipercolesterolemia familiare, Diagnostica molecolare

Istituto Superiore di Sanità

Familial hypercholesterolemia due to defects in the gene encoding the LDL receptor. Mutations occurring in Italy and their analysis.

Edited by Alfredo Cantafora, Francesca Prestinaci and Ida Blotta

2006, ii, 90 p. Rapporti ISTISAN 06/23 (in Italian)

Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) gene undergoes a great number of either small or gross mutations that cause in their homozygote and heterozygote carriers the classical familial hypercholesterolemia. In spite of the great advances in the development of efficient techniques for mutation detection, the wide spectrum of mutations that may affect this gene prevented the introduction of commercial diagnostics kits capable to satisfy the needs that derive from a genetically heterogeneous Country such as Italy. This volume is aimed at offering, to laboratories involved in the clinical diagnostics of human dyslipidemias, all available information about pathological LDLR mutations in our Country, as well as their areas of distributions. Besides, the volume describes some simple analytical techniques based on PCR and enzyme restrictions that may be easily performed by every diagnostic laboratory for the detection of 23 among the most common mutations found in our Country.

Key words: Genetics, Familial hypercholesterolemia, Molecular diagnostics

Per informazioni su questo documento scrivere a: alfredo.cantafora@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2006

INDICE

Introduzione	1
Recettore delle lipoproteine a bassa densità e ipercolesterolemia familiare	2
Il recettore delle lipoproteine a bassa densità	2
Ipercolesterolemia familiare e mutazioni del gene LDLR	5
Mutazioni puntiformi	7
Mutazioni grossolane e sequenze Alu	8
Polimorfismi del Gene LDLR	8
Bibliografia	9
Diagnosi clinica e criteri diagnostici della ipercolesterolemia familiare	11
Bibliografia	13
Mutazioni del gene LDLR individuate in Italia	14
Bibliografia	18
Metodiche analitiche per lo studio delle mutazioni genetiche	20
Metodi basati sulla PCR per la rivelazione di piccole mutazioni note.....	20
Metodi basati sulle dimensioni del prodotto d'amplificazione.....	20
Metodi basati su trattamenti post-PCR con endonucleasi di restrizione	20
Metodi basati sull'amplificazione con primers mutagenici e trattamenti post-PCR con endonucleasi di restrizione	21
Metodi basati sull'amplificazione PCR allele-specifica (PASA).....	21
Metodi per l'individuazione di mutazioni incognite.....	22
Tecnica d'analisi SSCP	22
Tecnica d'analisi degli eteroduplici (Heteroduplex Analysis o HA).....	23
Bibliografia	23
Metodi per lo screening delle principali mutazioni italiane	25
Materiali e procedure comuni ai vari metodi.....	25
Procedura d'estrazione rapida del DNA da sangue	25
Procedura d'estrazione da sangue congelato con kit commerciale Purgene	26
Procedura d'estrazione da sangue fresco o congelato mediante salting-out.....	27
Metodi di analisi delle mutazioni	
FH-Catanzaro	28
FH-Rapone	29
FH-Foggia-2 (amplificazione allele-specifica).....	31
FH-Alessandria (amplificazione allele-specifica)	32
FH-Lucca (amplificazione allele-specifica)	34
FH Padova-1	36
FH-Modena	38
FH-Reggio Emilia-2	39
FH-Milano-2	41
FH-Perugia-2.....	42
FH-Trieste	43
FH-Avellino-1 (amplificazione allele-specifica).....	45
FH-Chieti-2	46
FH-Palermo-2 (amplificazione allele-specifica)	48

FH-Napoli-1 (amplificazione allele-specifica).....	49
FH-Savona	51
FH-Reggio Emilia-1	52
FH-Bari-2	54
FH-Palermo-1 (amplificazione allele-specifica)	56
FH-Napoli-4	58
FH-Frosinone-1	59
FH-Mondovi.....	60
FH-Benevento	61
 Appendice A	
Sequenza del gene LDLR dedotta dal confronto BLAT tra la sequenza del cromosoma 19 (Assembly May 2004) e la sequenza del messaggero NM 000527	64
 Appendice B	
Sequenza codificante e traduzione del gene LDLR (mRNA NM 000527).....	79
 Appendice C	
Gel elettroforesi capillare su microchip	82
 Appendice D	
Elenco aggiornato al 2006 delle mutazioni FH trovate in Italia	84
 Appendice E	
Citazioni bibliografiche di rilievo per le mutazioni FH trovate in Italia.....	88
 Appendice F	
Elenco dei polimorfismi interni al gene LDLR.....	90

INTRODUZIONE

L'ipercolesterolemia familiare è una patologia a base genetica relativamente frequente: i portatori di varianti geniche che danno luogo a manifestazioni cliniche della malattia sono presenti in proporzione di circa 1:500 in quasi tutte le popolazioni. La malattia ha spesso manifestazioni cliniche poco evidenti nell'infanzia, ma è implicata nella predisposizione alle malattie cardiovascolari nell'adulto. Sono disponibili, attualmente, farmaci capaci di curare efficacemente l'ipercolesterolemia familiare e di prevenire, nel lungo termine, le sequele cardocircolatorie ad essa associate. È però necessario che la malattia sia correttamente diagnosticata quanto prima possibile. La presenza di livelli molto elevati di colesterolo circolante è una condizione necessaria, ma non sufficiente, per la diagnosi della malattia. Infatti la latitudine di variazioni del parametro patognomonico è ampia perché influenzata da altri fattori individuali e ambientali. Inoltre esistono altre forme d'ipercolesterolemia e l'aumento di colesterolo può essere secondario ad altre malattie. È perciò importante poter effettuare la diagnosi genetico-molecolare della malattia che offre la possibilità di una diagnosi certa e precoce, anche in fase pre-natale.

Questo volume aggiorna e amplia i contenuti di un volume stampato dallo stesso Istituto Superiore di Sanità nel 1998, il Rapporto ISTISAN 98/19 (Cantafora A, Blotta I, Mercuri E (Ed.). *Metodi per l'analisi di mutazione nel gene del recettore LDL ricorrenti in Italia*) con le informazioni di base sulla Ipercolesterolemia Familiare e sul gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità dalle cui alterazioni origina la patologia. Inoltre descrive la situazione delle mutazioni genetiche, causa della patologia, che riguardano il nostro paese e rivede e aggiorna le metodologie per l'analisi di routine delle principali varianti genetiche trovate in Italia. Tali metodiche possono essere eseguite con apparecchiature aggiornate così come descritto oppure essere eseguite secondo modalità tradizionali, accessibili a qualsiasi laboratorio di diagnostica molecolare.

RECETTORE DELLE LIPOPROTEINE A BASSA DENSITÀ E IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

Alfredo Cantafora, Francesca Prestinaci, Rocco Careri, Ida Blotta

Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il recettore delle lipoproteine a bassa densità

Il gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) è localizzato, nel genoma umano, sul braccio corto del cromosoma 19 (locus 19p13.1–13.3), (1). Si estende per circa 45 kbasi ed è strutturato in 18 esoni e 17 introni (2). L'appendice A riporta l'intera sequenza del gene. L'appendice B riportata la sola sequenza codificante (cui si fa riferimento per indicare le mutazioni geniche) e la relativa traduzione. La Figura 1 riassume le caratteristiche strutturali del gene.

Il prodotto genico maturo è una glicoproteina transmembrana di 839 aminoacidi (aa), la proteina tradotta ha però un peptide segnale di 21 aa che, dopo il trasporto al Golgi, è immediatamente rimosso. La proteina LDLR è un mosaico di sequenze peptidiche, o domini funzionali, ad elevata omologia con sequenze presenti in altre proteine: ben 13 dei 18 esoni del gene LDLR codificano, infatti, sequenze amino-acidiche omologhe a quelle d'altre proteine. In particolare, si riscontrano omologie con una sequenza di 40 aa della regione centrale del componente C9 del complemento, con una sequenza ripetuta nel precursore del fattore di crescita dell'epidermide (EFG) e con tre proteine del sistema di coagulazione del sangue (fattore IX, fattore X e proteina C).

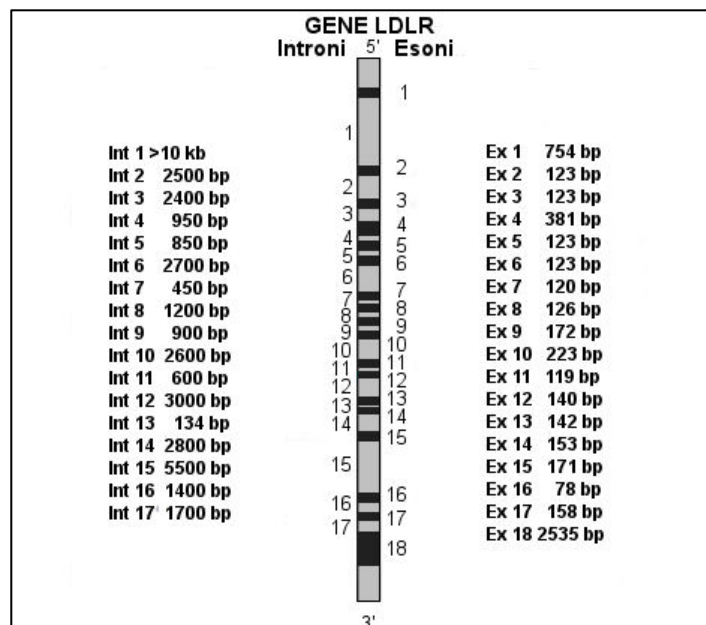


Figura 1. Struttura del gene LDLR

La Figura 2 mostra la struttura della proteina LDLR, ne evidenzia i domini strutturali e la corrispondenza tra la sequenza della proteina e del gene.

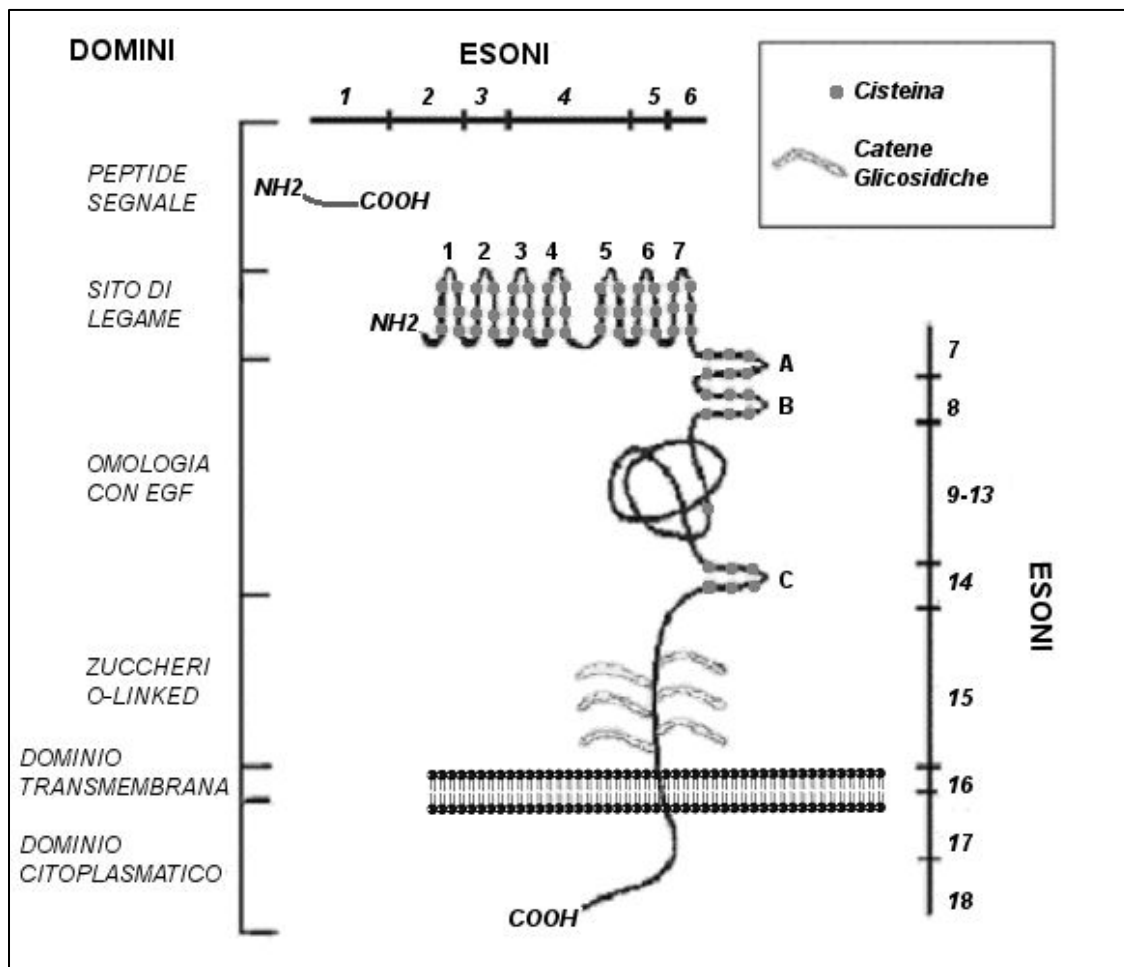


Figura 2. Domini strutturali della proteina LDLR e loro corrispondenza con la sequenza genica

L'esone 1 (70 bp) codifica il peptide segnale che è tagliato dalla proteina durante la traslocazione nel reticolo endoplasmatico.

Gli esoni 2-6 codificano il primo dominio, comprendente sette sequenze di 40 aa, tra loro poco differenti, contenenti ciascuna sei residui di cisteina. Queste sequenze ripetute (*repeats*) sono necessarie all'interazione con il ligando che è l'apolipoproteina B-100 (ApoB-100) o l'apolipoproteina E (ApoE) (3). Ciascuna di queste sequenze ripetitive è codificata da un singolo esone eccetto i *repeats* 3, 4 e 5, tutti codificati dall'esone 4. Le sequenze aminoacidiche di ciascun repeat sono omologhe ad una sequenza di 40 aa della regione centrale del componente C9 del complemento, una proteina coinvolta nella cascata del complemento (4).

Gli esoni 7-14 codificano un dominio di 400 aa necessario alla dissociazione delle lipoproteine dal recettore una volta che il complesso recettore-lipoproteina è trasferito all'interno della cellula come endosoma. Ciò consente il ritorno del recettore sulla membrana plasmatica e quindi il suo riciclo (5). Questo dominio mostra il 33% di identità con una porzione

del precursore del fattore di crescita umano dell'epidermide (EGF: epidermal growth factor) (6). È stato ipotizzato perciò che, nel corso dell'evoluzione, gli esoni che codificano questo dominio siano stati trasferiti da un qualche gene ancestrale al gene LDLR e al gene del precursore di EGF (7).

Gli esoni 7, 8, e 14 codificano per tre *repeats* di 40 aa (definiti A, B e C), ricchi in cisteina, le cui sequenze presentano omologie con alcune proteine coinvolte nella coagulazione del sangue (8). Pertanto anche in questo caso è stata ipotizzata una condivisione di sequenze codificanti tra il gene LDLR e membri di altre famiglie geniche.

L'esone 15 codifica il terzo dominio formato da 58 aa. Questo dominio è ricco di residui di serina e treonina che costituiscono i siti di legame per le catene glicosidiche O-legate.

Il quarto dominio è codificato dall'esone 16 e da una parte dell'esone 17 (estremità 5' dell'esone), include 22 aa idrofobici che costituiscono il dominio transmembrana.

Infine, la parte restante dell'esone 17 (estremità 3' dell'esone) e l'esone 18 codificano il quinto dominio, formato da 50 aa. Questo dominio rappresenta la coda citoplasmatica della proteina che consente la formazione di assemblaggi (*clusters*) recettoriali nelle fossette rivestite (*coated pits*) e l'endocitosi stessa del recettore.

Oltre alla sequenza nucleotidica che codifica la proteina, il gene include anche gli elementi che ne regolano la trascrizione (Figura 3). La regione che regola la trascrizione del gene è localizzata circa 250 bp a monte del codone di inizio ATG, fiancheggia l'estremità 5' e contiene 3 *repeats* da 16 paia di basi e una TATA box. I *repeats* 1, 2 e 3 formano una sequenza denominata SRE (*Sterol Regulatory Element*).

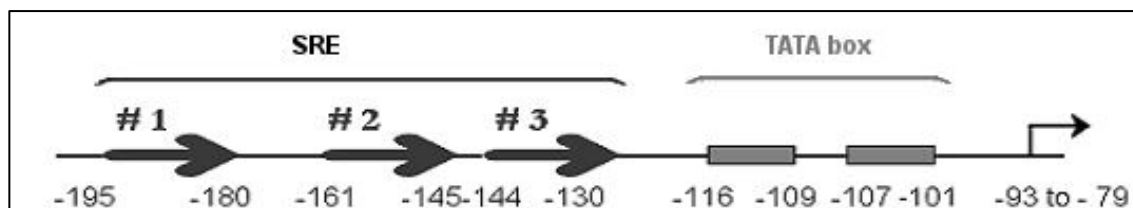


Figura 3. Elementi regolatori nel promotore del gene LDLR

I *repeats* 1 e 3 sono responsabili del livello basale di trascrizione del gene. Il repeat 2 contiene invece una sequenza di 8 basi, denominata SRE-1, che media la regolazione a feedback della trascrizione del gene da parte degli steroli, attraverso il legame con le proteine SREBPs (*Sterol Regulatory Elements Binding Proteins*).

Le SREBPs sono proteine delle membrane intracellulari, hanno la capacità di interagire con le sequenze di regolazione SRE a monte del gene LDLR e d'altri geni coinvolti nel metabolismo cellulare del colesterolo, come la idrossimetil-glutaril-coenzima A reduttasi (HMGCR), l'enzima che catalizza la tappa metabolica che limita la sintesi del colesterolo.

Quando la concentrazione di steroli nella cellula è normale la SREBP è legata alle membrane del reticolo endoplasmatico o alla membrana nucleare e assume una conformazione a forcina che lascia sporgere i domini amino- e carbossi-terminali nel citosol. In condizioni di deficit di steroli, SREBP è traslocata dal reticolo endoplasmatico (RE) all'apparato di Golgi per mezzo della proteina attivatrice SCAP o SREBP Activating Protein; dopo la traslocazione sul Golgi si attivano due enzimi proteolitici (S1P, Site One Protease e S2P-Site Two Protease) che tagliano sequenzialmente il dominio amino-terminale, quello che interagisce con le sequenze di regolazione (Figura 4).

Il peptide generato dalla seconda proteolisi penetra all'interno del nucleo e interagisce con le sequenze di regolazione aumentando la trascrizione e, di conseguenza, l'espressione genica.

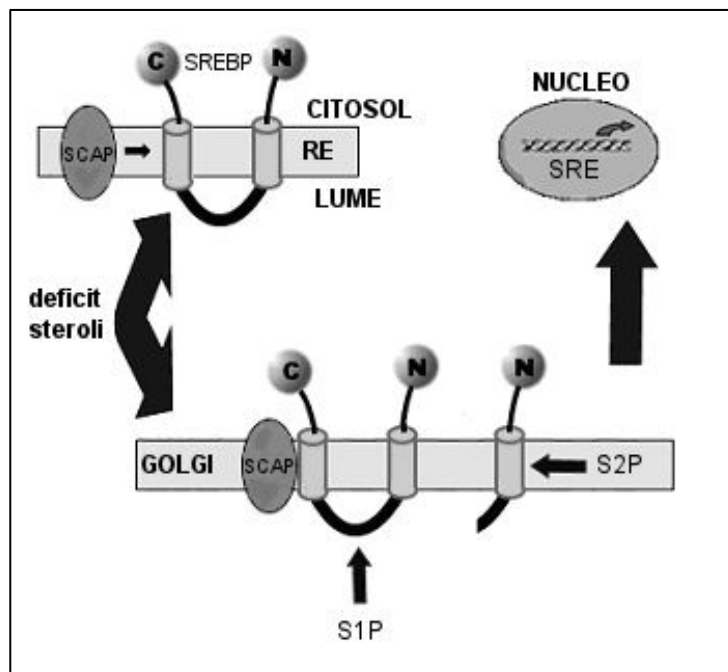


Figura 4. Regolazione della trascrizione del gene LDLR

Ipercolesterolemia familiare e mutazioni del gene LDLR

L'ipercolesterolemia familiare, FH (*Familial Hypercholesterolemia*) secondo la corrente terminologia anglosassone, è una malattia ereditaria, trasmessa con tratto autosomico dominante, caratterizzata da alti livelli ematici di colesterolo totale (TC) e colesterolo LDL (LDL-C), ma non di trigliceridi (TG).

La malattia nella forma omozigote ha manifestazioni cliniche severe (xantomi tendinei e arco corneale, valori di TC compresi tra 600 e 1200 mg/dL) che compaiono già in età infantile. I soggetti eterozigoti, grazie alla presenza nel loro genoma di un allele normale, hanno manifestazioni più lievi, spesso poco evidenti in età infantile. Le sequele cardiovascolari della malattia si verificano, nel maschio, verso i 35-40 anni, verso i 45-55 anni nella femmina.

La malattia è comunemente determinata da un difetto del gene LDLR (9, 10 e 11) che impedisce o altera il legame con la lipoproteina LDL o, comunque, con frazioni lipoproteiche contenenti ApoB-100 o ApoE. Si conoscono forme analoghe di ipercolesterolemia familiare dovute a rari difetti nel gene che codifica per l'apolipoproteina B (APOB) e per la proproteina convertasi subtilisina/kexina, tipo 9 (PCSK9) (12-13). Le mutazioni in questi ultimi geni danno luogo, rispettivamente, all'ipercolesterolemia familiare da difetto di apoB100 (o FDB = *Familial Defective ApoB*) e all'ipercolesterolemia autosomica dominante tipo 3 (FH3 o ADH3). Queste presentano qualche lieve differenza nell'espressione fenotipica rispetto alla classica FH da mutazioni nel gene LDLR e non sono prese in considerazione in questo lavoro.

I difetti nel gene LDLR possono essere di tipo puntiforme (mutazioni missenso o nonsense), piccole (piccole delezioni o inserzioni, con o senza perdita della trama di lettura) e grossolane (riarrangiamenti che comportano la perdita o la duplicazione di intere sezioni del gene). Queste ultime mutazioni sono causate dalla presenza nel genoma umano di un alto numero di sequenze ripetitive, distribuite in modo non uniforme, note come “short interspersed sequences” (SINEs o sequenze Alu), la cui propagazione ha dato luogo ad una varietà di “subfamiglie Alu”. Di fatto, queste sequenze si comportano come elementi mobili del genoma, causando rotture e ricombinazioni, inserzioni e delezioni, conversione genica e alterazione nell’espressione dei geni. In particolare, il gene LDLR, con i 12 punti di rottura e ricombinazione riportati nel database dei punti di rottura e riarrangiamento *The Gross Rearrangement Breakpoint Database (GraBD)* <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/ns/7/119362.html> è considerato fra i più suscettibili a riarrangiamenti genici grossolani che determinano forme gravi di FH riscontrate in varie popolazioni di tutto il mondo.

I soggetti affetti da FH in condizioni di omozigosi, rappresentano un modello sperimentale prezioso per lo studio della funzionalità del gene, in quanto permettono di analizzare le alterazioni a carico del recettore LDLR, causate dall’allele mutante, in assenza completa degli effetti di fondo prodotti dall’allele normale. Questi studi sono effettuati mediante un modello in vitro nel quale si valuta l’interazione tra fibroblasti in coltura (ottenuti da biopsie cutanee di soggetti omozigoti per mutazioni perfettamente caratterizzate dal punto di vista molecolare) e LDL marcate. Si è così stabilito che esistono 5 diverse classi di fenotipi difettivi, secondo la fase del meccanismo di funzionamento del recettore LDLR che è compromessa (Figura 5).

Precisamente:

- Classe 1: fenotipo “allele nullo”
- Classe 2: fenotipo “trasporto difettivo”
- Classe 3: fenotipo “legame difettivo”
- Classe 4: fenotipo “internalizzazione difettiva”
- Classe 5: fenotipo “riciclo difettivo”

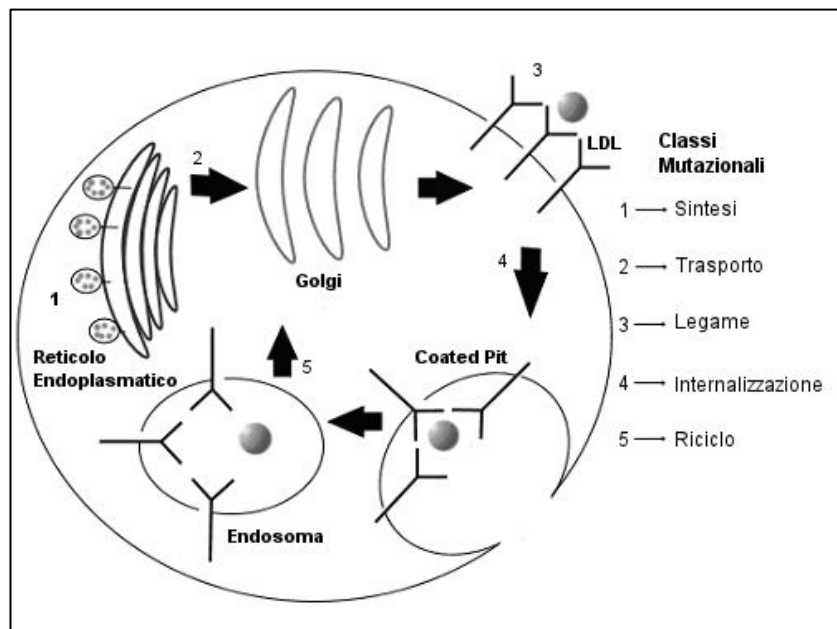


Figura 5. Classi mutazionali del gene LDLR

La classe con fenotipo “allele nullo”, che include il maggior numero di mutazioni note, è provocata da mutazioni che causano l’assenza o la presenza in tracce della proteina LDLR, che non è dosabile per immuno-precipitazione.

Questa classe può essere divisa ulteriormente in due sottoclassi in base al seguente criterio: (1A) mancanza della proteina immuno-precipitabile, unitamente a quella del suo mRNA; (1B) mancanza della proteina immuno-precipitabile, in presenza però del suo mRNA.

La seconda classe comprende mutazioni che provocano la sintesi di una proteina parzialmente (sottocasse 2A), o totalmente (sottoclasse 2B) incapace di essere trasferita dal reticolo endoplasmatico rugoso al complesso del Golgi. Di conseguenza il recettore, pur essendo sintetizzato correttamente, subisce una incompleta N- e O-linked glicosilazione da cui consegue il blocco del trasferimento del recettore alla membrana plasmatica (14- 15).

La terza classe comprende le mutazioni che provocano un’anomala interazione recettore-ligando. Anche questa classe può presentare una varietà di sfumature. La definizione di legame difettivo per il fenotipo di questa classe è sempre valida quando il ligando è la singola molecola di ApoB100, presente in una particella LDL. Considerano invece come ligandi le IDL, che interagiscono con il recettore attraverso le 4 copie di ApoE in esse contenute, si può osservare una serie di differenti comportamenti che vanno da una totale conservazione del legame ad una drastica riduzione.

È stata esaminata l’importanza di ciascuno dei 7 *repeats* del dominio di legame e dei 3 *repeats* del dominio di omologia con il precursore di EGF, in rapporto al legame del recettore con i ligandi ApoE e ApoB100. A tale scopo sono stati valutati gli effetti indotti da sostituzioni di amminoacidi a livello di residui altamente conservati nelle sequenze ripetitive e da delezioni di singoli *repeats*. Da questi studi è emerso che la rimozione del primo repeat del dominio di legame della proteina, ha scarse conseguenze sul legame del recettore sia con le LDL che con le IDL, il cui ligando è ApoE (16). La delezione del repeat 2 riduce fortemente il legame con le LDL, mentre ha un effetto di scarso rilievo sul legame con le IDL. La presenza di tutti gli altri 5 *repeats* del dominio di legame è assolutamente necessaria per il legame con le LDL, mentre il legame con le IDL è compromesso del 60% dalla rimozione del repeat 5 e da mutazioni a livello di certi amminoacidi. Infine, il repeat A della regione di omologia con il precursore di EGF è necessario al legame con le LDL ma non con le IDL.

La quarta classe comprende le mutazioni che producono una proteina in grado di trasferirsi sulla superficie cellulare e di reagire regolarmente con il ligando, ma incapace di aggregarsi nelle fossette rivestite: di conseguenza questo recettore mutante non internalizza regolarmente il ligando. Anche in questo caso esiste una sottoclassificazione in due gruppi: mutazioni che alterano solo il dominio citoplasmatico della proteina e si manifestano come deficit recettoriale (classe 4A) e altre che alterano sia il dominio citoplasmatico che transmembrana e si manifestano come assenza del recettore (classe 4B).

Alla quinta classe appartengono le mutazioni che impediscono il riciclo del recettore. In questo caso la proteina non è rilasciata regolarmente nell’endosoma e compromette così il suo ritorno sulla membrana cellulare. Questo difetto dipende da anomalie a carico del dominio omologo al precursore di EGF, in particolare in alcuni dei *repeats* ad alto contenuto di cisteina.

Mutazioni puntiformi

La correlazione genotipo-fenotipo del gene LDLR è ancora oggetto d’indagine perché ciascuna mutazione presenta un ampio spettro di variabilità fenotipica inter-individuale che rende difficoltoso lo studio di correlazione.

Sebbene le mutazioni puntiformi siano distribuite sull'intero gene, vi è in eccesso di mutazioni sull'esone 4 ($P = 0.001$), che codifica per i tre *repeats* centrali del dominio di legame, e sull'esone 9 ($P = 0.01$) che codifica per l'estremità amino-terminale della regione centrale del dominio di omologia con il precursore EGF. Sono invece rare le mutazioni nell'esone 13 ($P=0.001$), che codifica per l'estremità carbossi-terminale della regione centrale del dominio di omologia con il precursore EGF, e nell'esone 15 ($P=0.001$) che codifica per il dominio in cui si legano le catene di zuccheri O-linked. L'analisi della distribuzione delle mutazioni, dopo l'allineamento dei 7 *repeats*, mostra che il 74% delle mutazioni nel dominio dei siti di legame cade su aa conservati, principalmente localizzati nella regione C-terminale dei *repeats*.

Mutazioni grossolane e sequenze Alu

I riarrangiamenti nel gene LDLR sono una delle tante cause della FH e mostrano, da un punto di vista molecolare, un'ampia eterogeneità per lunghezza, tipo e localizzazione (17). Si tratta prevalentemente di delezioni, di preferenza localizzate nella parte del gene che comprende gli esoni 1-8 e 13-18 (18, 19). Questa particolare localizzazione in alcune parti del gene si pensa sia dovuta alla presenza delle sequenze ripetitive Alu, tipo molto frequente di sequenze SINEs (*Short Interspersed Elements*).

Gli elementi Alu sono presenti, comunemente, negli introni, nelle regioni 3' UTR dei geni e nelle regioni intergeniche del genoma. Recentemente un'analisi dettagliata della sequenza del genoma umano ha dimostrato che le SINEs, con più di un milione di copie, sono i più abbondanti elementi mobili del genoma umano. Mediamente la lunghezza di una sequenza Alu è circa 300 bp, in dipendenza, soprattutto, dalla lunghezza della coda oligonucleotidica ricca di adenina all'estremità 3' in cui solo raramente vi si trovano altre basi.

La regione centrale della sequenza Alu, anch'essa ricca di adenina, contiene un promotore per la RNA-polimerasi III. L'amplificazione degli elementi Alu avviene attraverso la trascrizione inversa di un Alu-RNA trascritto dalla RNA-polimerasi III nel processo chiamato retrotrasposizione. Non essendoci un segnale di terminazione per la RNA-polimerasi III, il trascritto si estenderà fino a raggiungere un tipico segnale di terminazione sul filamento senso del DNA, quale una serie di 4 o più molecole di timina.

Gli elementi Alu, non avendo un open reading frame, attingono i fattori necessari per la loro amplificazione dalle LINES. Questi elementi codificano una trascrittasi inversa funzionale che ha anche un dominio endonucleasico L1, e forniscono le funzioni enzimatiche necessarie agli elementi Alu per la loro amplificazione.

Le sequenze ripetitive nel DNA possono avere una profonda influenza sulla stabilità di un determinato gene: l'instabilità intrinseca nelle sequenze Alu introniche del gene LDLR sembra essere un fattore molto importante nei grossi riarrangiamenti, inoltre, è stato osservato che la possibile formazione di particolari strutture secondarie, dovute all'appaiamento intramolecolare di queste sequenze Alu, potrebbe predisporre il genoma umano a grosse delezioni;

Polimorfismi del Gene LDLR

Sono riportati in letteratura numerosi polimorfismi del gene dovuti a cambiamenti di una singola base (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), sia in sezioni codificanti, sia in sezioni non codificanti del gene, che non manifestano effetti clinicamente rilevanti sulla funzionalità del recettore.

Un elenco dei più comuni polimorfismi presenti nel gene è riportata in Appendice E.

Bibliografia

1. Francke U, Brown MS and Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: Synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2826-30.
2. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS and Russel DW. A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985;228:815-22.
3. Brown MS and Goldstein JL. A receptor mediated pathway that controls the cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
4. Stanley KK, KOcher HP, Luzio JP, Jakson P and Tschopp J. The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO J* 1985;4:375-82.
5. Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RGW, Russel DW and Brown MS. Acid-dependent ligand association and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987;326:760-5.
6. Russel DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS and GOLDSTEIN JL. Domain map of the LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell* 1984;37:577-85.
7. Sudhof TC, Russel DW, Goldstein JL, Brown MS Sanchez-Pescado R and Bell GI. Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 1985;228:893-5.
8. Dolittle RF. The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem Sci* 1985;10:223-37.
9. Goldstein JL, Hobbs HH and Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, (Ed.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, McGraw-Hill: New York; 2001. pp. 2863-2913.
10. Hobbs HH, Brown MS and Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
11. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.
12. Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder Familial Defective Apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001;276:9214-8.
13. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villeger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf K, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-6.
14. Schneider WJ, Brown MS and Goldstein JL. Kinetic defects in the processing of the LDL receptor in fibroblasts from WHHL rabbits and a family with familial hypercholesterolemia. *Mol Biol Med* 1983;1:353-67.
15. Tolleshaug H, Hobgood KK, Brown MS and Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Multiple mutations disrupting the transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 1983;32:941-51.
16. Esser V, Limbird LE, Brown MS Goldstein JL and Russel DW. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1988;263:13282-90.
17. Amsellem S, Briffaut D, Carrie A, Rabes JP, Girardet JP, Fredenrich A, Moulin P, Krempf M, Reznik B, Vialettes B, De Gennes JL, Bruckert E, Benlian P. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 2002;111:501-10.

18. Horsthemke B, Beisiegel U, Dunning A, Havinga JR, Williamson R, Humphries S. Unequal crossing-over between two alu-repetitive DNA sequences in the low density-lipoprotein-receptor gene. A possible mechanism for the defect in a patient with familial hypercholesterolemia. *Eur J Biochem* 1987;164:77-81.
19. Lehrman MA, Goldstein JL, Russel DW and Brown MS. Duplications of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell* 1987;48:827-35.

DIAGNOSI CLINICA E CRITERI DIAGNOSTICI DELLA IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE

Stefano Bertolini, Livia Pisciotta
Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Genova

Come suggerisce il nome stesso della malattia, la manifestazione clinica più rilevante della ipercolesterolemia familiare (FH) è il forte aumento della concentrazione ematica di colesterolo totale che deriva, a sua volta, da un innalzamento quasi esclusivo della concentrazione della frazione LDL. Il valore della colesterolemia, pur rappresentando il fattore patognomonico della malattia, non è sufficiente però a formulare una diagnosi di FH. Il dato di laboratorio va riferito alle caratteristiche individuali del paziente, alle sue abitudini di vita, alla concomitanza con altre malattie, alla presenza d'altri segni clinici e all'anamnesi familiare. Ciò, almeno, limita il rischio di confondere forme secondarie d'ipercolesterolemia o la più comune ipercolesterolemia poligenica, o altre rare dislipidemie con la FH.

La corretta diagnosi clinica della FH non è scevra quindi da difficoltà e perciò vari gruppi di esperti hanno formulato propri criteri diagnostici, più o meno stringenti, che portano a fare una diagnosi di FH con diverso grado di probabilità. I criteri diagnostici più noti a livello internazionale sono stati sviluppati dall'US MedPed Program (*Make early diagnosis, Prevent early dead*) (1), dal *Simon Broome Register Group* nel Regno Unito (2) e dal *Dutch Lipid Clinic Network* in Olanda (3).

Il criterio dell'US MedPed Program è basato, sostanzialmente, sulla valutazione della colesterolemia in rapporto all'età del soggetto e al grado di parentela con altri familiari nei quali è stata già diagnosticata la FH. In mancanza di dati familiari si adotta un livello di cut-off del colesterolo totale che tiene conto della distribuzione della colesterolemia nella popolazione generale. In Tabella 1 sono riportati i valori delle concentrazioni di colesterolo totale alle diverse età che permettono di formulare la diagnosi di FH con un 98% di specificità. È quindi un criterio diagnostico molto semplice e immediato perché basato unicamente sul dato biochimico utile, soprattutto, ad identificare i soggetti affetti da FH in famiglie in cui è documentata una storia di FH.

Tabella 1. Criteri per la diagnosi della FH adottati dall'US MedPed Program

Età (anni)	Valore limite del colesterolo totale (mmol/L)			
	Parentela			Popolazione generale
	I grado	II grado	III grado	
<20	5.7	5.9	6.2	7.0
20-29	6.2	6.5	6.7	7.5
30-39	7.0	7.2	7.5	8.8
> 39	7.5	7.8	8.0	9.3

Questo criterio ha però anche gravi inconvenienti: l'imprecisione del dato analitico porta ad erronee valutazioni e, ancor di più, questo criterio soffre di una bassa sensibilità

nell'individuazione dei soggetti affetti, specie nella popolazione generale. Da una valutazione effettuata su una grossa famiglia dello Utah, dagli stessi proponenti del criterio diagnostico, risultava che la sua adozione non confermava la diagnosi di FH nel 12% dei parenti di primo grado di un soggetto affetto e nel 46% dei casi tratti dalla popolazione generale (1).

Il criterio stabilito dal *Simon Broome Register Group* è articolato e tiene conto oltre che dei livelli di colesterolo totale (CT) e LDL (LDL-C) in relazione all'età del paziente, anche di altre manifestazioni cliniche della malattia (xantomi tendinei), dell'anamnesi familiare e della diagnostica molecolare (Tabella 2).

Tabella 2. Criteri per la diagnosi della FH secondo il Simon Broome FH Register

Criterio	Descrizione
A	CT > 7.5 mmol/L negli adulti o > 6.7 mmol/L in soggetti <16 anni, ovvero LDL-C > 4.9 mmol/L negli adulti o >4.0 mmol/L in soggetti <16 anni
B	Xantomi tendinei nel probando o parenti di I grado
C	Analisi molecolare di una mutazione nel gene LDLR o APOB
D	Storia familiare d'infarto del miocardio prima dei 50 anni in parente di II grado, ovvero prima dei 60 in un parente di I grado
E	Storia familiare di livelli del CT sopra i 7.5 mmol/L in parenti di I o II grado
Diagnosi	"Definita" se sono contemporaneamente verificati i criteri A&B oppure A&C "Probabile" se sono contemporaneamente verificati i criteri A&D oppure A&E

Sinteticamente la diagnosi è considerata "definita" quando si superano certi limiti di concentrazione di colesterolo totale (CT) e colesterolo LDL (LDL-C) e in concomitanza si osserva, nel paziente o in un consanguineo di primo grado, la presenza di xantomi tendinei oppure è stato determinato con la diagnostica molecolare il difetto genetico sottostante. La diagnosi è invece considerata "probabile" quando oltre al superamento dei limiti di CT e LDL-C si ha una storia familiare di infarti prematuri del miocardio o di alterazioni patologiche della colesterolemia.

Il criterio diagnostico del *Dutch Lipid Clinic Network* (Tabella 3) attribuisce invece un punteggio compreso tra 1 e 8 a ciascun parametro di rilievo clinico per la patologia e quindi considera la diagnosi "definita" se il punteggio totale è superiore ad 8, "probabile" se il punteggio totale è compreso tra 6 ed 8 e "possibile" se il punteggio totale è tra 3 e 5.

In Italia un gruppo d'esperti appartenenti alla SISA (Società Italiana per lo Studio dell'Arteriosclerosi) (www.sisa.it) ha adottato un criterio diagnostico simile a quello in uso nel Regno Unito (4).

In pratica la diagnosi è definita "certa" quando sono presenti valori del colesterolo totale o LDL superiori al 95° percentile, e quindi valori del CT superiori a 260 mg/dL (in età < 16 anni) o a 290 mg/dL (in età > 16 anni) o di LDL-C > 190 mg/dL, associati alla presenza di xantomi tendinei (per lo più al dorso delle mani o al tendine di Achille) nello stesso paziente o nei parenti di I e II grado. La diagnosi è definita invece "possibile" quando agli stessi valori di colesterolo si associa una anamnesi familiare d'infarto del miocardio in età <50 anni o il reperto dei valori di colesterolo sopra ricordati in parenti di I e II grado del probando.

È diagnosticata la FH se viene superato uno di questi valori in un soggetti di cui è nota la relazione di parentela con un soggetto FH. In mancanza di questo dato si adotta come criterio di selezione il valore relativo alla popolazione generale.

Tabella 3. Criteri per la diagnosi della FH secondo il Dutch Lipid Clinic Network

Criterio	Punti
Parente di primo grado con infarto prematuro (<55 anni maschi, <60 femmine) o con affezioni vascolari o con valori di LDL-C sopra il 95° percentile	1
Parente di primo grado con xantomi tendinei o arco corneale o con valori di LDL-C sopra il 95° percentile in soggetti inferiori ai 18 anni	2
Probando con malattia coronaria prematura (<55 anni maschi, <60 femmine)	2
Probando con vasculopatia cerebrale o periferica prematura (<55 anni maschi, <60 femmine)	1
Probando con xantomi tendinei	6
Probando con arcus cornealis prima dei 45 anni	4
Livelli di LDL-C > 8.4 mmol/L	8
“ “ 6.5 – 8.4	5
“ “ 5.0 – 6.4	3
“ “ 4.0 – 4.9	1
Accertamento molecolare di una mutazione funzionale nel gene LDLR	8
Diagnosi	“Definita” se la somma dei punti è superiore ad 8 “Probabile” se la somma dei punti è compresa tra 6 e 8 “Possibile” se la somma dei punti è compresa tra 3 e 5

Bibliografia

1. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC *et al.* Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993;72:171-6.
2. Scientific Steering Committee On Behalf Of The Simon Broome Register Group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis* 1999;142:105-12.
3. World Health Organization. Familial hypercholesterolemia – report on a second WHO Consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1999 (WHO publication no. WHO/HGN/FH/CONS/ 99.2).
4. Società Italiana per lo Studio dell'Arteriosclerosi. *Linee Guida SISA relative all'identificazione e al trattamento delle dislipidemie nella prevenzione delle malattie cardiovascolari*. Disponibile all'indirizzo: http://www.sisa.it/filez/_DOWNLOAD_%20-%204%20-%20download.pdf; ultima consultazione 7/9/2006.

MUTAZIONI DEL GENE LDLR INDIVIDUATE IN ITALIA

Stefano Bertolini (a), Alfredo Cantafora (b), Sebastiano Calandra (c)

(a) *Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Genova*

(b) *Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia*

L'identificazione di mutazioni che causano patologie gravi e relativamente frequenti, quale la FH, dovrebbe agevolare la diagnostica prenatale e precoce della malattia e permettere interventi terapeutici mirati e tempestivi. La FH infatti è una delle poche malattie monogeniche che può essere trattata efficacemente, specie nei soggetti eterozigoti. Bisogna però riconoscere che l'approccio genetico-molecolare alla diagnostica di questa patologia non è scevro di difficoltà e ciò è dovuto all'eterogeneità della popolazione italiana, alla sua apertura ad influssi esterni, alla natura stessa del gene che è ricco di mutazioni ad alta specificità etnica e a bassa frequenza nella popolazione, tranne che in comunità caratterizzate dall'effetto "fondatore".

Le prime informazioni sulle mutazioni italiane sono venute, paradossalmente, da studi condotti negli USA su soggetti delle diverse etnie presenti in quel paese. Così in una rassegna che risale agli inizi degli anni novanta venivano menzionate 14 mutazioni presenti in discendenti di nostri emigranti (1). Nove di queste sono state specificamente attribuite all'etnia italiana.

Sono seguiti altri lavori, condotti in Italia e all'estero, su specifiche mutazioni presenti in famiglie italiane (2, 3, 4). Ciò nonostante, ancora nel 1998 la situazione era poco cambiata: un database delle mutazioni censiva nel mondo 210 mutazioni identificandone solo 18 in probandi italiani (5, 6). Si era evidentemente ancora in presenza di informazioni frammentarie e lontane dalla realtà. Per questo motivo veniva avviato uno studio, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, che coinvolgeva i principali gruppi italiani interessati, in quel momento, alla problematica (7) per procedere simultaneamente all'esame di una casistica di 2000 soggetti affetti da FH e appartenenti a 725 famiglie italiane senza evidenti legami di parentela. Questa patologia ha la frequenza di 1/500 in eterozigosi e di 1/1.000.000 in omozigosi; ciò significa che nei 57 milioni di abitanti dell'Italia dovrebbero esservi circa 114.000 eterozigoti e 57 omozigoti (veri o doppi eterozigoti). Il risultato più evidente dello studio nazionale è il numero e la varietà delle mutazioni finora individuate in Italia: fra esse si riscontrano mutazioni presenti nel bacino del Mediterraneo e nel Nord Europa, e altre ancora nuove, non riportate in altre popolazioni (8).

Un punto di notevole interesse pratico emerso dallo studio, è che le mutazioni hanno, se rapportate alla reale origine delle famiglie studiate, un ambito di diffusione piuttosto limitato. Le incongruenze, quando osservate, erano riconducibili a migrazioni avvenute nei passati decenni. Perciò mutazioni con frequenze di poco superiori all'1% in ambito nazionale, potevano rappresentare fino al 20% delle cause di FH nelle aree in cui la mutazione si era sviluppata e diffusa (8,9). Di conseguenza, l'individuazione dell'origine di una famiglia affetta è utile perché suggerisce la ricerca di certe mutazioni e l'esclusione di altre e fa aumentare notevolmente la probabilità d'identificare il difetto molecolare all'origine della dislipidemia.

Nello studio multicentrico sopra menzionato tutti i soggetti venivano sottoposti a prelievo di sangue a digiuno prima dell'inizio o durante una sospensione, del trattamento farmacologico con statine. Nel plasma venivano determinati: colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo HDL, utilizzando kit enzimatici commerciali (Roche Diagnostics, Milano) e un analizzatore automatico multicanale (Hitachi- mod. 704). Il livello del LDL-C veniva calcolato da questi parametri analitici con la formula di Friedewald (10). In tutte le famiglie affette nelle quali s'individua l'esistenza del fenotipo omozigote, si procedeva, ove possibile, alla valutazione in vitro

dell'attività del recettore LDLR in fibroblasti dermici di soggetti omozigoti ed eterozigoti della stessa famiglia, con metodiche precedentemente descritte in letteratura (11). Nell'ambito della collaborazione multicentrica, i dosaggi in vitro dell'attività del LDLR in fibroblasti dermici sono stati seguiti presso l'Istituto di Scienze Biomediche della Università di Modena e Reggio Emilia.

La Tabella 1 riporta la descrizione di 39 mutazioni puntiformi, di 16 piccole delezioni o inserzioni e mutazioni nei siti di splicing individuate nel gene LDLR. Complessivamente, nel corso di questo studio venivano individuate 55 mutazioni piccole o puntiformi, causa d'ipercolesterolemia familiare, in 246 famiglie, pari al 34% dei casi esaminati. Altri studi condotti in parallelo su famiglie che facevano parte di questa casistica, ma non considerati in questo contesto perché eseguiti con approccio del tutto diverso, evidenziano l'esistenza di 16 mutazioni dovute a grosse duplicazioni o delezioni del gene LDLR. Questa ulteriore aggiunta portava le mutazioni caratterizzate in soggetti italiani ad un totale di 71. La proporzione dei casi indice con mutazione accertata arrivava così al 39% circa.

Dalla tabella si può osservare che ciascuna delle mutazioni riportate veniva individuata, generalmente in pochissime famiglie perché, verosimilmente, piuttosto rara. In tutti i casi è stata accertata la relazione tra la presenza della mutazione e la presenza del fenotipo FH e viceversa, attraverso l'analisi della segregazione familiare. Le mutazioni più rare, per alcune delle quali veniva riscontrato un solo soggetto affetto nell'ambito di una data famiglia, sono state ricercate in campionature casuali di soggetti sani o affetti da FH, in modo da poter escludere che il difetto molecolare fosse in realtà un polimorfismo raro.

Buona parte di queste mutazioni aveva una frequenza, rapportata al totale dei probandi esaminati, inferiore all'1% e veniva trovata in 2-3 famiglie. Sono state invece individuate 13 mutazioni relativamente più frequenti, presenti in più famiglie e in un ambito territoriale abbastanza esteso. Ciascuna di esse, quando rapportata alla zona di maggior diffusione, poteva arrivare a giustificare quasi il 40% dei casi di FH presenti in quell'area. In ogni caso, anche le mutazioni più rare erano confinate geograficamente. Non essendo ragionevolmente ipotizzabile di poter testare ogni soggetto affetto da FH con il sistematico sequenziamento del gene LDLR e in considerazione della complessità e del costo elevato delle tecniche usate per il saggio di funzionalità del recettore LDLR, che si presentano maggiormente a studi con finalità di ricerca, l'affinamento della mappa etnico-geografica delle mutazioni, effettuato in questo studio, fornisce un valido contributo alle possibilità e alle prospettive di applicazione delle tecniche semplici di screening messe a punto. Infatti, il confinamento delle mutazioni entro ambiti territoriali ristretti, è una circostanza favorevole alla diagnostica genetico-molecolare della patologia, perché suggerisce quali mutazioni cercare e quali escludere in una data zona e fa aumentare la probabilità di riconoscere rapidamente il difetto molecolare alla base della patologia.

Lo studio di correlazione genotipo-fenotipo evidenziava l'ampio spettro di variabilità fenotipica inter-individuale di ciascuna mutazione. Si poteva comunque osservare che le mutazioni che danno luogo ad un difetto limitato ad una piccola zona della proteina del recettore erano caratterizzate da un fenotipo più lieve (FH Padova; FH Bari-2; FH Frosinone) rispetto a mutazioni dovute a forme tronche o grossolane alterazioni della proteina codificata (FH Savona; FH Palermo). Per i due gruppi viene confrontata l'incidenza di Xantomati Tendinei (TX), di eventi coronarici (CAD), entrambi più frequenti nei soggetti con mutazioni che causano difetti gravi sulla proteina e dei livelli di LDL-C, più alti sempre in questi soggetti.

La correlazione genotipo-fenotipo suggerisce che una delle principali implicazioni della individuazione del difetto molecolare nell'ambito di una data famiglia affetta da FH è un più preciso orientamento clinico per la prevenzione delle sequele cardiovascolari. Se si riconosce infatti che la famiglia è contraddistinta da un grave difetto molecolare (mutazioni grossolane o espressione di forme troncate della proteina) sarà possibile effettuare i test genetici e avviare nei soggetti affetti, un percorso terapeutico quanto più precocemente possibile. Nelle famiglie affette

da difetti molecolari più lievi (mutazioni puntiformi missenso), si potrà procedere con più gradualità e con terapie meno aggressive.

La Figura 1 mostra la distribuzione geografica delle mutazioni che superavano, singolarmente, la soglia dell'1% della casistica. La mutazione FH Padova-1 (D200G) è la mutazione maggiormente riscontrata, con una prevalenza del 6%, seguita dalla FH Savona (1418-1419 ins 4nt) e dalla FH Palermo-1 (G528D), rispettivamente con il 4,276 % e il 4 %; le mutazioni FH Bari-2 (V502M), FH Casale Monferrato (D558Y), FH Frosinone-1 (P664L) e FH-Sassari-1 (nt 1778 del G) superavano di poco la soglia dell'1%. L'interesse sollevato da queste mutazioni deriva dal fatto che la loro frequenza risultava decisamente alta, non solo in relazione alle altre mutazioni individuate nelle famiglie del campione, ma anche, e in misura consistente, nell'ambito della zona geografica ove erano più diffuse.

Dopo il completamento del primo screening sulla popolazione di etnia italiana, i cui risultati sono schematizzati nella Tabella 1 (8), è proseguita, da parte nostra e di altri autori, l'individuazione di altre mutazioni causa di FH nel nostro paese. Il numero delle mutazioni ad oggi identificate è di 133, che sono integralmente riportate nell'Appendice D. Nonostante questo numero appaia molto alto, è destinato ad aumentare nel tempo perché nelle casistiche studiate la percentuale di identificazione delle mutazioni non supera, nel migliore dei casi il 75%.

Tabella 1. Mutazioni del gene LDLR causa di FH trovate nello screening nazionale

Riarrangiamenti	Fam ^a	Ho ^b	Che ^c	He ^d	Proteina LDLR	Nome Allele
Esone (Ex) delezione (kb)						
Promotore + Ex 1, 2 (20)	1			12	Non prodotta	FH Siracusa
Promotore + Ex 1-6 (>25)	2			4	Non prodotta	FH Bologna-1
Promotore + Ex 1-6 (24)	1			3	Non prodotta	FH Bari-3
Ex 2-12 (24)	10	2		61	Non prodotta	FH Pavia
Ex 3-10 (12)	1			6	(1) Troncata (2) Inframe delet.	FH Massa
Ex 11, 12	2			6	Troncata	FH Genova-1
Ex 13, 14 (3.7)	5			21	Troncata	FH Chieti-1
Ex 13, 14 (4.7)	1			2	Troncata	FH Roma
Ex 13-15 (4.5)	1			4	(1) Troncata (2) Inframe delet.	FH Potenza-1
Ex 13-15 (5)	1		2	4	Troncata	FH Palermo-3
Ex 13-18 (>25)	2	1		5	Troncata	FH Catania
Ex 16 (2)	1			4	Inframe delet.	FH Padova-2
Esone (Ex) duplicazioni (kb)						
Ex 3-6 (8)	1			9	Inframe insert.	FH Caltanissetta
Ex 9-14 (10)	2			3	Inframe insert.	FH Salerno
Ex 13-15 (7)	1			3	Troncata	FH Bologna-2
Ex 16, 17 (5.5)	2	1		4	Inframe insert.	FH Viterbo
Nonsense (cDNA)						
97C→T (Ex 2)	2	1		2	Q12X	FH Milano-4
103C→T (Ex 2)	1		1	2	Q14X	FH Milano-3
301G→T (Ex 3)	1			2	E80X	FH Imperia
304C→T (Ex 3)	3			12	Q81X	FH Rapone
373C→T (Ex 4)	3	1		5	Q104X	FH Foggia-2
418G→T (Ex 4)	2			6	E119X	FH Campobasso
865G→T (Ex 6)	2		1	8	E267X	FH Milano-2
2311C→T (Ex 15)	2			8	Q749X	FH Mondovì
Missenso (cDNA)						
28T→A (Ex 1)	1			1	W-12R	FH Enna
265T→C (Ex 3)	1		1	8	C68R	FH Catanzaro
346T→C (Ex 4)	1			6	C95R	FH Alghero

segue

continua

Riarrangiamenti	Fam ^a	Ho ^b	Che ^c	He ^d	Proteina LDLR	Nome Allele
352G→T (Ex 4)	2		1	4	D97Y	FH Naples-3
401G→T (Ex 4)	1			1	C113F	FH Alessandria
402C→G (Ex 4)	1			5	C113W	FH Lucca
415G→A (Ex 4)	2			4	D118N	FH Sassari-2
662A→G (Ex 4)	48	4		135	D200G	FH Padova-1
665G→A (Ex 4)	4			10	C201Y	FH Genova-2
682G→A (Ex 4)	7			16	E207K	FH Modena
761A→C (Ex 5)	1			2	Q233P	FH Reggio Emilia-2
826T→C (Ex 6)	3			6	C255R	FH Ceva
828C→G (Ex 6)	1			3	C255W	FH Sassari-3
829G→A (Ex 6)	1			1	E256K	FH Genova-3
952T→C (Ex 7)	1			3	C297R	FH Perugia
953G→T (Ex 7)	3			16	C297F	FH Trieste
1056C→G (Ex 7)	2	1		7	C331W	FH Avellino-1
1090T→C (Ex 8)	2			7	C343R	FH Palermo-2
1109A→C (Ex 8)	2	1		4	N349T	FH Reggio Calabria
1118G→A (Ex 8)	3	2		13	G352D	FH Potenza-2
1135T→C (Ex 8)	7	5	1	12	C358R	FH Napoli-1
1195G→A (Ex 9)	2	1		3	A378T	FH Nuoro
1244A→G (Ex 9)	1			5	D394G	FH Padova-3
1301C→G (Ex 9)	1			1	T413R	FH Sassari-4
1454A→G (Ex 10)	1		1	2	H464R	FH Milano-1
1463T→A (Ex 10)	1			3	I467N	FH Piacenza
1567G→A (Ex 10)	13	3	2	48	V502M	FH Bari-2
1646G→A (Ex 11)	29	3	2	127	G528D	FH Palermo-1
1735G→T (Ex 12)	10			45	D558Y	FH Casale Monferrato
1775G→A (Ex 12)	7		2	19	G571E	FH Foggia-1
2054C→T (Ex 14)	10	5	1	37	P664L	FH Frosinone-1
Frameshift (FS), delezione (del), inserzione (ins) (cDNA)						
623–644del (Ex 4)	1			2	FS187Term236	FH Asti
682–684del, 681–685 ins 6 (Ex 4)	1			8	E207del, CK206–208ins	FH Chieti-3
681–682ins 18 (Ex 4)	1			9	CKDKSD206–207 ins	FH Padova-4
1067delA (Ex 8)	1			4	FS335Term348	FH Cuneo
1068T→A, 1068–1069 ins 18 (Ex 8)	1			3	D335E, ECQDPD 335–336ins	FH Chieti-2
1122–1123insTGGC (Ex 8)	1			1	FS354Term360	FH Pisa
1374–1375delAG (Ex 10)	1			2	FS437Term444	FH Ancona
1418–1419insACAT (Ex 10)	31			151	FS453Term515	FH Savona
1439–1449del (Ex 10)	1			10	FS459Term510	FH Reggio Emilia-1
1478–1479delCT (Ex 10)	2		1	8	FS472Term513	FH Frosinone-2
1778delG (Ex 12)	8			40	FS572Term643	FH Sassari-1
Splicing						
IVS3 313+1 g→a	7			20	Inframe delet.	FH Olbia
IVS10 1586+1 g→a	2	1		5	(1) Inframe delet. (2) Inframe insert.	FH Agrigento
IVS12 1846-1 g→a	2	1		3	(1) Troncata (2) Inframe delet.	FH Avellino-2
IVS15 2311+1 g→a	2	1		4	(1) Troncata (2) Inframe insert.	FH Benevento
IVS16 2389+1 g→a	1		1	1	Inframe delet.	FH Monfalcone

^aNumero di famiglie affette; ^bNumero di soggetti omozigoti; ^cNumero di doppi eterozigoti; ^dNumero di eterozigoti

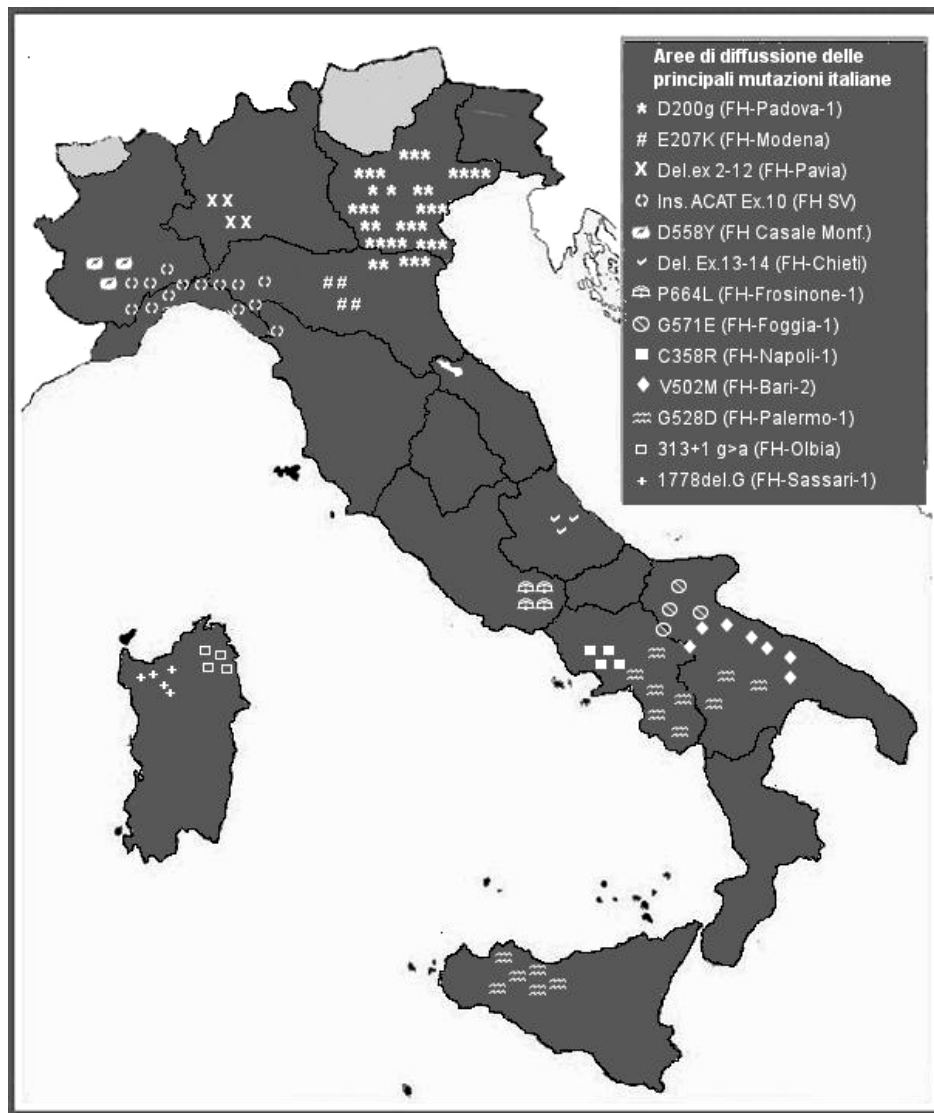


Figura 1. Aree di diffusione delle principali mutazioni del gene LDLR presenti in Italia

Bibliografia

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Fascetti V, Rolleri M, Guido V, Trovatiello G, Masturzo P, Garuti R, Motti C, Cortese C, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. FH clusters in southern Italy. *Atherosclerosis* 1997;135(Suppl 1):S12.
3. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Use of Allele-Specific polymerase chain reaction for detecting point mutations in LDL-receptor gene common in southern Italy. *Atti del 70th European Atherosclerosis Society Congress*, Geneva, Switzerland, 6-9 September 1998. pag 69.
4. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E. *Metodi per l'analisi di mutazioni nel gene del recettore LDL ricorrenti in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. (Rapporti ISTISAN 98/19).

5. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C, Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.
6. Varret M, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Baron H, Cenarro A, Descamps O, Ebhardt M, Hondeljin JC, Kostner GM, Miyake Y, Pocovi M, Schmidt H, Schuster H, Yamaura T, Junien C, Beroud C, Boileau C. LDLR Database (second edition): new addition to the database and the software, and results of the first molecular analysis. *Nucleic Acids Res* 1998;26:248-52.
7. Cantafora A, Bertolini S, Calandra S. Ipercolesterolemia familiare e mutazioni nel gene del recettore delle lipoproteine a bassa densità in Italia. *Ann Ist Super Sanità* 1999;35:177-84.
8. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotto L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.
9. Deiana L, Garuti R, Pes GM, Carru C, Errigo A, Rolleri M, Pisciotto L, Masturzo P, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. Influence of beta-thalassemia on the phenotypic expression of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:236-43.
10. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of a preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
11. Goldstein JL, Basu SK, Vroman MS. Receptor mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98:241-60.

METODICHE ANALITICHE PER LO STUDIO DELLE MUTAZIONI GENETICHE

Alfredo Cantafora, Ida Blotta, Francesca Prestinaci

Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Roma

I metodi da noi utilizzati per rivelare le piccole mutazioni del gene LDLR possono essere divisi in due gruppi:

1. Metodi per individuare mutazioni di cui si conoscono caratteristiche e localizzazione nel gene (mutazioni note), generalmente utilizzate a fini di diagnosi e di screening.
2. Metodi per localizzare e caratterizzare mutazioni ancora sconosciute nel gene (mutazioni ignote), generalmente utilizzati a fini d'indagine e di screening di mutazioni incognite.

Metodi basati sulla PCR per la rivelazione di piccole mutazioni note

La PCR permette di selezionare una specifica sezione del genoma e di amplificarla esponenzialmente. Alcune mutazioni possono essere evidenziate direttamente dal prodotto d'amplificazione, altre richiedono trattamenti post-PCR, altre ancora prevedono particolari tipi d'amplificazione ed eventualmente anche trattamenti post-PCR.

Metodi basati sulle dimensioni del prodotto d'amplificazione

In linea di principio, l'analisi elettroforetica dell'amplificato del campione in esame può rivelare delezioni o inserzioni come bande di lunghezza anomala rispetto a quelle osservate con l'amplificato di un allele normale. In pratica, ciò dipende molto dalle condizioni elettroforetiche utilizzate. Impiegando l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) con lastre di piccole dimensioni (8x10 cm), si possono agevolmente evidenziare delezioni o inserzioni superiori alle 10 basi in amplificati di lunghezza inferiore alle 200 paia di basi. Ciò è evidente nei risultati riportati dai protocolli per le mutazioni FH-Chieti-2 e FH-Reggio Emilia-1. Per delezioni/mutazioni più piccole, come ad esempio la FH-Savona (inserzione di 4 basi), la differenza tra amplificato dell'allele normale e mutato può essere impercettibile, salvo che non si adottino condizioni elettroforetiche particolari (analisi degli eteroduplici) o si faccia uso di lastre di lunghezza superiore ai 10 cm o, più semplicemente, si ricorra a trattamenti post-PCR, come appunto descritto nel protocollo per la FH Savona.

Metodi basati su trattamenti post-PCR con endonucleasi di restrizione

Le sequenze amplificate, sia normali sia mutate, possiedono sempre un certo numero di siti di restrizione rispetto alle varie endonucleasi di restrizione disponibili in commercio. Ora, quando accade che la mutazione in esame introduce o elimina, un sito di restrizione rispetto all'allele normale, basterà analizzare il pattern di restrizione dell'amplificato in confronto ad un DNA normale e ad un positivo per la mutazione, e, si potrà esprimere un parere sul risultato

analitico. In pratica vi sono però limitazioni e difficoltà all'applicazione di questo semplice approccio. In primo luogo, non è raro il caso di mutazioni che non alterano il pattern di restrizione; in secondo luogo la modifica di alcuni siti di restrizione può rivelarsi di scarsa utilità pratica o perché l'amplificato ha una molteplicità di siti di restrizione per l'enzima utilizzato (e quindi può risultare difficile valutare differenze rispetto ad un solo sito influenzato dalla mutazione), o perché l'enzima manifesta una scarsa attività nei confronti di quel dato sito (e ciò si traduce in ambiguità analitiche, specie nei casi in cui si valuta l'eliminazione di un sito di restrizione), o più banalmente perché l'enzima non è facilmente reperibile o è costoso. In tutti questi casi bisognerà ricorrere ad un approccio alternativo, come quelli indicati di seguito.

Metodi basati sull'amplificazione con *primers* mutagenici e trattamenti post-PCR con endonucleasi di restrizione

Si è accennato in precedenza alla possibilità che il prodotto di amplificazione dell'allele mutato non differisca, nel pattern di restrizione, dall'allele normale. Si può ovviare a quest'inconveniente utilizzando l'amplificazione con un *primer* mutagenico o *mismatch*. Vale a dire con un *primer* che pur avendo un errore d'appaiamento in prossimità dell'estremità 3' riesce ugualmente ad appaiarsi al template e dare un amplificato con un'ulteriore mutazione artificialmente introdotta dalla base non correttamente appaiata. Nel caso che il *mismatch* è abbastanza vicino alla mutazione naturale c'è la possibilità, in alcuni casi, che la combinazione delle due mutazioni crei un sito di restrizione che distingue l'allele mutato da quello *wild*. Nei protocolli riportati di seguito il problema della mancanza di un sito di restrizione indotto dalla mutazione è stato soddisfacentemente risolto con quest'approccio per le mutazioni FH Rapone, Modena, Avellino e Napoli-4 grazie all'uso di *primers mismatch* disegnati dal gruppo del prof. Claudio Cortese.

Metodi basati sull'amplificazione PCR allele-specifica (PASA)

L'elettroforesi convenzionale non è sensibile al punto da discriminare singole sostituzioni di basi di un amplificato PCR. Si possono in ogni modo disegnare *primers* in grado di appaiarsi correttamente con l'allele mutato ma non con l'allele normale o affetto da altre mutazioni, che daranno luogo, pertanto, ad un prodotto d'amplificazione solo con l'allele mutato. Questa possibilità si basa sul fatto che alcuni errori d'appaiamento o *mismatches* sull'estremità 3' del *primer* possono compromettere totalmente l'appaiamento (pairing, mentre altri sono tollerati. Per realizzare un *primer* allele-specifico bisogna quindi far sì che l'estremità 3' del *primer* coincida con la mutazione e che in corrispondenza della mutazione vi sia un *mismatch* non tollerato con l'allele normale e tollerato (o, se possibile, un "pairing" perfetto) con l'allele mutante. L'altro *primer* della coppia non deve avere alcuna specificità, ma deve ben abbinarsi al *primer* allele-specifico. Il sistema è da considerarsi perfettamente funzionante se dalla PCR viene una banda della lunghezza attesa con un campione positivo per la mutazione in esame, mentre non si avrà alcuna amplificazione con un campione *wild*. In realtà, si può anche accettare che i campioni negativi diano bande d'amplificazione evanescenti, a patto che i campioni positivi si distinguano senza dubbio dai negativi. Questo approccio, è stato utilizzato in modo soddisfacente per la mutazione FH Palermo-1 e si presta a variazioni e miglioramenti. Si può ad esempio mettere nella miscela di amplificazione oltre alla coppia allele-specifica di *primers* una coppia non allele-specifica che amplifichi una zona di DNA che includa quella specifica. Si avrà così una sola banda, corrispondente all'amplificazione dell'allele *wild*, in un campione normale o affetto da altre mutazioni, una sola banda, corrispondente all'amplificazione dell'allele mutante, in un campione omozigote mutante; due diverse bande in un soggetto eterozigote per

la mutazione data. Ancora, si può disegnare il *primer* allele specifico in modo che l'amplificato specifico sia caratterizzato da un sito di restrizione che contraddistingua l'amplificato normale da ogni altro amplificato spurio.

Infine, l'amplificazione allele-specifica si presta bene a distinguere il genotipo di un campione mediante la quantificazione dell'amplificato con l'impiego della *real-time* PCR. È quindi probabile che il suo uso divenga sempre più esteso.

Metodi per l'individuazione di mutazioni incognite

Esistono molte tecniche di screening per individuare mutazioni incognite ma quelle più conosciute e adottate sono le tecniche di SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e HA (Heteroduplex Analysis).

La tecnica SSCP, facilmente applicabile all'indagine di mutazioni puntiformi non conosciute, si basa sulla capacità delle mutazioni di alterare la mobilità di piccoli frammenti di DNA a singolo filamento (ssDNA, *Single Strand* DNA) in una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti. L'utilità della tecnica si deve al fatto che il "setaccio" molecolare costituito dai pori del gel permette la separazione di filamenti singoli di DNA che differiscono anche per la sostituzione di una sola base (1,2). La mobilità elettroforetica che contraddistingue i diversi frammenti di DNA a singolo filamento, dipende strettamente dalla loro carica, dimensione e forma. La carica negativa è uguale in frammenti di pari lunghezza, ma è molto più importante, in relazione alla mobilità elettroforetica, la configurazione che può assumere un frammento di DNA.

Originariamente i frammenti erano visualizzati per mezzo di radioisotopi e autoradiografie (3); oggi questo metodo è stato superato da una varietà di metodi non isotopici che includono la colorazione con Silver Stain, etidio bromuro e altri coloranti fluorescenti (4-6).

In condizioni ideali, i metodi SSCP e HA sono capaci di scoprire fino 90% delle mutazioni, ma nessuno dei due dà indicazioni sulla posizione della mutazione (7,8). Dato che entrambe le tecniche utilizzano un gel elettroforetico nativo si può, con opportuni accorgimenti, combinare le due analisi in un'unica corsa.

Tecnica d'analisi SSCP

La tecnica SSCP si basa sulla capacità delle mutazioni di alterare la mobilità di piccoli frammenti di DNA a singolo filamento, in una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti (9).

La mobilità elettroforetica dei singoli filamenti di DNA in condizioni non denaturanti dipende da diversi fattori includenti la carica che rimane costante nelle molecole delle stesse dimensioni e la configurazione adottata dai singoli filamenti di DNA. Nella matrice del gel di poliacrilammide, in condizioni non denaturanti, il DNA a singolo filamento va incontro a modificazioni della struttura molecolare che danno luogo alla formazione di strutture steriche secondarie. In altri termini mentre alcuni frammenti a singolo filamento si riappaiono con i filamenti complementari formando DNA a doppio filamento, altri vanno incontro ad appaiamenti intramolecolari (struttura secondaria), in corrispondenza di tratti di sequenza complementari, all'interno dello stesso filamento. Sia la configurazione adottata dal DNA che la mobilità elettroforetica sono molto variabili e dipendenti dalla sequenza di basi. Pertanto una mutazione, anche puntiforme (3), modificando la sequenza può provocare un cambiamento della struttura molecolare del DNA a singolo filamento, rispetto al normale, modificandone la mobilità elettroforetica e permettendone la separazione.

Un parametro molto importante da considerare in un'analisi sperimentale è la dimensione dei frammenti di DNA. Il massimo della sensibilità si ottiene con piccoli frammenti di circa 150 bp. La mutazione di una singola base in frammenti di grosse dimensioni può portare ad uno shift di mobilità così piccolo da non essere osservato. Tuttavia i frammenti grandi possono essere analizzati senza la perdita troppo grande in sensibilità ottimizzando altri parametri: tagliando larghi frammenti PCR in siti interni di restrizione¹⁰ e combinando l'analisi SSCP con HA.¹¹

Tecnica d'analisi degli eteroduplici (*Heteroduplex Analysis* o HA)

L'amplificazione PCR di sezioni di DNA che includono una piccola mutazione in eterozigosi, genera singoli filamenti di DNA tra loro diversi che possono appaiarsi, durante i cicli termici, anche in modo non esattamente complementare. Queste strutture a doppio filamento sono detti eteroduplici e derivano, ad esempio, dall'appaiamento di un filamento senso *wild* con un filamento antisenso mutante o viceversa. Il DNA eteroduplice che deriva dall'appaiamento di un filamento *wild* con un filamento affetto da una mutazione puntiforme, avrà tutti gli appaiamenti regolari tranne uno, in corrispondenza della mutazione. L'eteroduplice avrà, per quest'alterazione strutturale, un maggior ingombro sterico rispetto ad un DNA in cui l'appaiamento dei due strand è perfetto (omoduplice). Ciò provoca una piccola riduzione della mobilità elettroforetica dell'eteroduplice rispetto all'omoduplice che si evidenzia come sdoppiamento di banda in una corsa elettroforetica ad alta risoluzione su gel di poliacrilammide non denaturante.

Dato che la vera omozigosi di una mutazione dà necessariamente luogo alla formazione di strutture omoduplici, così come accade in campioni omozigoti *wild*, si preferisce mescolare in parti uguali l'amplificato del campione in esame con l'amplificato di un campione *wild* ed effettuare un ciclo termico di denaturazione e rinaturazione per favorire la formazione di eteroduplici. In tal modo sia le mutazioni in omozigosi che in eterozigosi produrranno un eteroduplice e la relativa banda.

L'aggiunta del 10% di urea (12) o di etandiol o del 15% di formamide al gel elettroforetico (8) crea condizioni di lieve denaturazione che migliorano la risoluzione omoduplice-eteroduplice. Questi additivi riducono però la capacità di risoluzione di frammenti a singolo filamento e non sono perciò raccomandabili se si vuole ottenere attraverso un'unica corsa elettroforetica l'analisi SSCP e HA.

È stato determinato che la dimensione ottimale di un frammento di DNA per HA è tra 250 e 500 bp e che si ottiene una migliore risoluzione tra omoduplice ed eteroduplice quando la mutazione non interessa una delle estremità dell'amplificato ma la sua zona centrale.

Bibliografia

1. Lerman LS, Frisch HL. Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers* 1982;21:995-7.
2. Lumpkin OJ, Dejjardin P, Zimm BH. Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers* 1985;24:1573-93.
3. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid, sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.
4. Yap EPH, Mcgee JO'D. Nonisotopic discontinuous phase single strand conformation polymorphism (DP-SSCP): genetic profiling of D-Loop Of Human Mitochondrial (MT) DNA. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4155.

5. Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter MMB. Diagnostic single strand conformation polymorphism, (SSCP): a simplified nonradioisotopic method as applied to a Tays-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res* 1991;19:405-6.
6. Ellison J, Dean M, Goldman D. Efficacy of fluorescence-based PCR-SSCP for detection of point mutations. *Biotechniques* 1993;15:684-91.
7. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993;16:325-32.
8. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10325-9.
9. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-70.
10. Lee H-H, Lo W-J, Choo K-B. Mutational analysis by a combined application of the multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism and the direct linear amplification DNA sequencing protocols. *Anal Biochem* 1992;205:289-93.
11. Wallace AJ. Combined Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. In: Taylor GR. (Ed.). *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*. Boca Raton (Florida) USA: CRC Press; 1998. p. 79-92.
12. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Briens SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992;12:301-6.

METODI PER LO SCREENING DELLE PRINCIPALI MUTAZIONI ITALIANE

Alfredo Cantafora (a), Ida Blotta (a), Francesca Prestinaci (a), Stefano Bertolini (b), Livia Pisciotto (b), Claudio Cortese (c), Corradino Motti (c), Sebastiano Calandra (d)

(a) *Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova*

(c) *Dipartimento di Medicina Interna, Università di Roma "Tor Vergata"*

(d) *Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia*

Sono riportate di seguito le metodiche di screening utilizzate presso i nostri laboratori per l'analisi di 23 tra le più comuni piccole mutazioni individuate in Italia.

Le metodiche sono basate sull'amplificazione PCR della sezione del gene interessata dalla mutazione seguita dalla digestione del prodotto di amplificazione con un opportuno enzima di restrizione in modo da ottenere un pattern di digestione diverso dall'allele normale e da quello mutato.

Nei casi in cui la mutazione non consentiva di distinguere, in base a differenze del pattern di restrizione, l'allele normale da quello mutato, l'amplificazione veniva effettuata con un *primer* mutagenico che creava, con l'allele normale o con quello mutato, un sito di restrizione artificiale su uno dei due alleli. In alternativa siamo ricorsi all'uso dell'amplificazione allele-specifica, utilizzando un *primer* in grado di amplificare l'allele mutato ma non quello normale.

I metodi qui riportati sono semplici e possono essere riprodotti in qualsiasi laboratorio di diagnostica molecolare ricorrendo ai classici sistemi di frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilammide o di agarosio invece che alla separazione con la microelettroforesi capillare su microchip che viene da noi suggerita per la semplicità, rapidità e affidabilità nella routine di laboratorio (Appendice C).

I metodi sono preceduti dalla indicazione dei materiali e delle procedure comuni ai vari metodi, come le procedure di estrazione del DNA genomico dal sangue e la preparazione dei tamponi e dei reattivi utilizzati.

Si fa presente che sono disponibili sul mercato tanti kit e reattivi, prodotti da case diverse, per queste applicazioni basilari della diagnostica molecolare che si sono dimostrati, nella nostra esperienza, tra loro equivalenti. Riteniamo quindi che tutte le procedure descritte possano essere eseguite con i prodotti usati di routine dai vari laboratori.

Materiali e procedure comuni ai vari metodi

Procedura d'estrazione rapida del DNA da sangue

- Il sangue va prelevato con EDTA e conservato a 4° C, se utilizzato nei due giorni successivi al prelievo. In caso contrario è preferibile conservare il campione -20° C.
- Pipettare 500 µl di sangue in provetta Eppendorf e quindi 500 µl di Lysis buffer.
- Mescolare accuratamente invertendo la provetta per cinque volte.
- Centrifugare a 13.000 x g per 30".
- Eliminare il surnatante.
- Ripetere 1-2 volte i lavaggi col Lysis buffer fino allo schiarimento del supernatante.

- Eliminare il supernatante e aggiungere al pellet 500 µL di PCR buffer con Proteinasi K.
- Incubare 1 h a 60° C per far agire l'enzima, poi tenere 10 minuti a 95° C per denaturarlo.
- Utilizzare un'aliquota da 5 µL di questa preparazione in ogni amplificazione PCR.
- L'estratto si conserva alcuni mesi a 4° C.

Lysis buffer

0,32 M saccarosio
10 mM Tris-HCl (pH 8.3)
2,5 mM MgCl₂
1 % Triton X-100
È da preparare al momento dell'uso.

PCR buffer con Proteinasi K

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl (pH 8.3)
2,5 mM MgCl₂
0,1 mg/mL di gelatina
0,45 % NP40
0,45 % Tween 20

Si consiglia di dividere la preparazione del PCR buffer in aliquote da 500 µL che andranno autoclavate e congelate. Al momento dell'uso scongelare un'aliquota e aggiungere 3,0 µL di una soluzione da 10 mg/mL di proteinasi K.

Procedura d'estrazione da sangue congelato con kit commerciale Purgene

- Scongelare il campione di sangue rapidamente tenendolo a 37° C
- Prelevare 3 mL di sangue liquido e unirlo a 9 mL di RBC Lysis Solution contenute in una provetta da centrifuga di 15 mL (tipo Falcon).
- Mescolare con ripetute inversioni del tubo e lasciare incubare 10' a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 2000 x g per 10' (temperatura ambiente).
- Rimuovere il surnatante lasciando il pellet di globuli bianchi con circa 100 µL di liquido.
- Vortexare in modo di disperdere completamente il residuo nel liquido.
- Aggiungere 3 mL di Cell Lysis Solution e pipettare varie volte su e giù per lisare le cellule. Se si notano agglomerati incubare a 37° C fino ad ottenere una soluzione omogenea. In questa soluzione il DNA è stabile per almeno 18 mesi a temperatura ambiente.

Trattamento con RNasi (opzionale)

Aggiungere 15 µL di RNasi A Solution, mescolare per inversione del tubo 25 volte e lasciare incubare a 37° C per 30'.

Precipitazione delle proteine

- Portare il campione a temperatura ambiente.
- Aggiungere 1 mL di Protein Precipitation Solution.
- Vortexare ad alta velocità per 20" e assicurarsi che il mescolamento sia completo.

- Centrifugare a 2000 x g per 10'.

Le proteine dovrebbero formare un precipitato marrone scuro compatto. Se il precipitato non è compatto mescolare e ricentrifugare dopo aver tenuto su ghiaccio per 5'.

Precipitazione del DNA

Versare il surnatante (che contiene il DNA) in una provetta pulita da 15 mL che contiene 15 mL di Isopropanolo.

Mescolare delicatamente invertendo il tubo 50 volte finchè siano visibili i filamenti bianchi di DNA.

Centrifugare a 200 x g per 3'. Il DNA forma un piccolo pellet bianco.

Eliminare con cautela il surnatante su carta assorbente pulita.

Aggiungere 3 mL di Etanolo al 70% e invertire il tubo varie volte per lavare il pellet.

Centrifugare a 299x g per 1'. Eliminare cautamente il liquido di lavaggio.

Poggiare il tubo su carta assorbente e lasciare asciugare all'aria per 10'-15'.

Idratazione del DNA

Aggiungere 250 µL di DNA Hydration Solution e lasciare incubare a 65° C per 1 h oppure overnight a temperatura ambiente. Smuovere delicatamente di tanto in tanto per aiutare la solubilizzazione.

Procedura d'estrazione da sangue fresco o congelato mediante *salting-out*

- Prelevare 10 mL del campione di sangue e unirlo a 10mM EDTA, pH 8.
- Trasferire in due provette Falcon da 50 mL.
- Aggiungere 90 mL di Lysis buffer conservato a 4° C.
- Mescolare gentilmente e lasciare su ghiaccio per 10'-15'.
- Centrifugare a 1000 x g per 15' a 4° C. È visibile un pellet chiaro.
- Lavare il pellet con Fisio buffer.
- Dopo il lavaggio centrifugare a 1000 x g per 15' a 4° C.
- Dopo 4-5 lavaggi il pellet è praticamente bianco.
- Risospendere il pellet in 3 mL di Buffer A.
- Aggiungere 100 µL di SDS al 20% e dopo aggiungere 50 µL di Proteinasi K e incubare a 37° C
- Aggiungere 1 mL di soluzione satura di NaCl (6 M) e mescolare con forza per 15''
- Centrifugare a 2600 rpm per 15'. Le proteine dovrebbero formare un precipitato bianco.
- Trasferire il supernatante in una provetta da 15 mL facendo attenzione a non trasferire anche il precipitato.
- Ricentrifugare a 2600 rpm.
- Versare il surnatante in un'altra provetta pulita da 15 mL e aggiungere esattamente 1 volume di Isopropanolo (temperatura ambiente).
- Rimuovere il DNA precipitato e immergere in 1 mL di Etanolo al 70% per 30 secondi.
- Risospendere il DNA in 500 µL di TE sotto delicata agitazione.

Lysis buffer

0,32 M saccarosio

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

5 mM MgCl₂

1 % Triton X-100
(autoclavare e conservare a 4° C).

Fisio buffer

0,075 M NaCl
0.025M EDTA (pH 8)
(autoclavare e conservare a 4° C)

Buffer A

10 mM Tris HCl (pH 8)
400 mM NaCl
2 mM EDTA
(autoclavato e conservato a 4° C)

Proteinasi K

Soluzione da 1 mg/mL in acqua preparata al momento dell'uso

Metodi di analisi delle mutazioni

FH-Catanzaro

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 3 (Repeat 2), 265 T>C
- Mutazione aminoacido (codone): C68R, Cys68Arg (TGC->CGC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Calabria)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 176 bp che include l'esone 3 con la seguente coppia di *primer*:

5'-TGACAGTTCAATCCTGTCTCTTCTG-3' Senso-25nt (1)
5'-ATAGCAAAGGCAGGGCCACACTTAC-3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, introduce un sito di restrizione Cfo I (GCG/C) che dà luogo nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 105 e 71 bp evidenziabili mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 176 bp che include l'esone 3 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Cfo I, di 0.8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 176 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 105 e 71bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
4. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Rapone

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 3, (Repeat 2), 304 C>T
- Mutazione aminoacido (codone): G81Stop, Gln81Stop (CAA>TAA)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 1
- Frazione di attività recettoriale residua (1): <2% (omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Abruzzo, Molise)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Statunitense
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 167 bp che include l'esone 3 con la seguente coppia di *primer* mutagenici :

5'- TGACAGTTCAATCCTGTCTCTTCTG - 3' Senso-25nt (1)

5'- GCAGGGCCACACTTACGACAGCCGT- 3' Antisenso-25nt (4)

La mutazione, se presente, unitamente al *mismatch* introdotto dal *primer* senso, crea un sito di restrizione Rsa I (GT/AC) che dà luogo, nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 142 e 25 bp evidenziabili mediante elettroforesi. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 167 bp che include l'esone 3 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Rsa I, di 0,8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 176 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 142 e 25bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C, Beroud C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1998;26:248-52.
4. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.

5. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Foggia-2 (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 4, (Repeat 3), 373 C>T
- Mutazione aminoacido (codone): Q104X, Arg104Stop (CAG>TAG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale.
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Puglia-Campania)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificato selettivamente, dall'allele mutato, mediante PCR allele-specifica (PASA), una zona di 134 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello senso non ha alcuna specificità. Il *primer* antisenso, invece, (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* C/C con l'allele normale e un regolare appaiamento C/G con l'allele mutato. Ciò consente l'appaiamento e l'estensione solo della sequenza mutata. L'allele normale o con diversa mutazione non dà, invece, alcuna amplificazione.

I *primers* utilizzati sono i seguenti:

5' - GTTGGGAGACTTCACACGGTGATGG - 3' Senso - 25 nt (1)

5' - CCCGGTCTGAGTCACAGACGAAGTC - 3' Antisenso allele-specifico - 25 nt (2)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 134 bp.

Procedura analitica

La miscela per la amplificazione specifica di un frammento di 134 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 µL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 134 bp che contraddistingue l'allele mutato.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Use of Allele-Specific polymerase chain reaction for detecting point mutations in LDL-receptor gene common in southern Italy. *Atti del 70th European Atherosclerosis Society Congress*, Geneva, Switzerland, 6-9 September 1998. pag 69.
3. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotto L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Alessandria (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 4, (Repeat 3-5), 401 G>T
- Mutazione aminoacido (codone): C113F, Cys113Phe (TGC->TTC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord (Piemonte)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificato selettivamente, dall'allele mutato, mediante PCR allele-specifica (PASA) una zona di 162 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello antisenso (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* A/G con l'allele normale e il normale appaiamento A/T con l'allele mutato. Il *primer* senso, invece, non ha alcuna specificità. Ciò consente l'*annealing* e l'estensione solo della sequenza mutata. L'allele normale o con diversa mutazione non dà alcuna amplificazione.

I *primers* utilizzati sono i seguenti:

5' - GTTGGGAGACTTCACACGGTGATGG - 3' Senso - 25 nt (1)

5' - GAGGCCTCGTCTGAGCCGTCCAAGA - 3' Antisenso allele-specifico- 25 nt (2)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 162 bp.

Procedura analitica

La miscela per l'amplificazione specifica di un frammento di 162 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 μL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 μL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 μL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 μL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 μL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 μL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 μL di una soluzione 25 mM di MgCl_2 tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 μL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 μL .

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 μL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 (Figura 1) del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 162 bp che contraddistingue l'allele mutato.

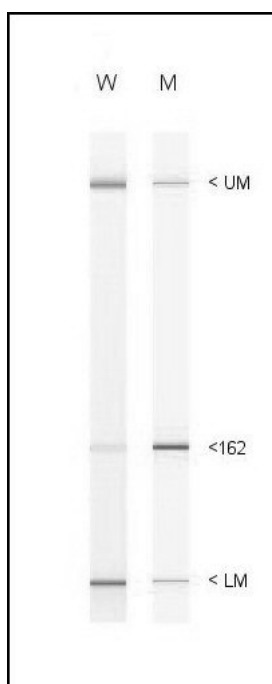


Figura 1. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo, nell'allele mutato ad un prodotto di 162 bp. Nell'allele normale (corsia W) non si osserva alcun prodotto

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
3. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Lucca (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 4, (Repeat 3-5), 402 C>G
- Mutazione aminoacido (codone): C113W, Cys113Trp (TGC->TGG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Centro (Toscana)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificato selettivamente, dall'allele mutato mediante PCR allele-specifica (PASA), una zona di 241 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello senso (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* A/G con l'allele normale e un *mismatch* A/C con l'allele mutato. Il *primer* antisenso, invece, non ha alcuna specificità. Ciò consente l'*annealing* e l'estensione solo della sequenza mutata. L'allele normale o con diversa mutazione non dà, invece alcuna amplificazione.

I *primers* da 25 basi utilizzati sono i seguenti:

5' - CGTCTGTGACTCAGACCGGGACTGA - 3' Senso allele-specifico - 25 nt (2)

5' - ACTTAGGCAGTGGAACTCGAAGGCC - 3' Antisenso - 25 nt (1)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 241 bp.

Procedura analitica

La miscela per l'amplificazione specifica di un frammento di 241 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione

finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 μ L di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 μ L.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 μ L del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 241 bp che contraddistingue l'allele mutato e dall'assenza di bande per l'allele normale (Figura 2).

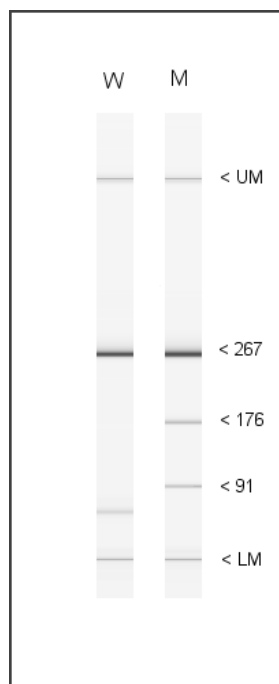


Figura 2. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo, nell'allele mutato ad un prodotto di 241 bp. Nell'allele normale (corsia W) non si osserva alcun prodotto

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
3. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbon, I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH Padova-1

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 4, (Repeat 5), 662 A>G
- Mutazione aminoacido (codone): D200G, Asp200Gly (GAC->GGC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2B
- Frazione di attività recettoriale residua (1): <2% (eterozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord-Est (Veneto, Emilia-Romagna)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Statunitensi, Svedesi, Norvegesi, Tedeschi, Austriaci, Francesi, Spagnoli, N.Irlandesi
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 267 bp che include la seconda parte dell'esone 4 con la seguente coppia di *primer*:

5'-CCCCAGCTGTGGGCCTGCGACAACG -3' Senso-25nt (1)

5'-GGGGGAGCCCAGGGACAGGTGATAG -3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, introduce un sito di restrizione Msp I (C/CGG) che dà luogo nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 176 e 91 bp evidenziabili mediante elettroforesi (Figura 3). L'allele *wild*, invece non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 267 bp comprendente l'esone 4 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Msp I, di 0.8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 267 bp e l'allele mutante da una banda di circa 176 e 91 bp (Figura 3)

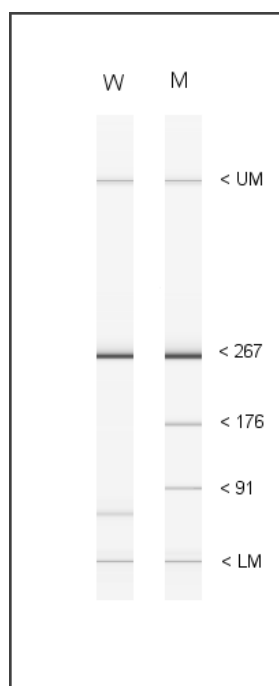


Figura 3. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo ad un prodotto di 267 bp che, nell'allele normale (Corsia W) non si scinde per effetto dell'enzima di restrizione Msp I. Nell'allele mutato, invece, tale sequenza si scinde in due bande di 176 e 91 bp

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Gudnason V, Mak YT, Betteridge J, Mc Carthy SN, Humphries S. Use of the single-strand conformational polymorphism method to detect recurrent and a novel mutations in the low-density lipoprotein receptor gene. *Clin Investig* 1993;71:331-7.
3. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
4. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.
5. Leren TP, Tonstad S, Gundersen KE, Bakken KS, Rodningen OK, Sundvold H, Ose L, Berg K. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Norway. *J Intern Med* 1997;241:185-94.
6. Cenarro A, Jensen HK, Casao E, Civeira F, Gonzalez-Bonillo J, Rodriguez-Rey JC, Gregersen N, Pocovi M. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia. Mutations in brief no. 135. Online. *Hum Mutat* 1998;11(5):413.
7. Graham CA, McClean E, Ward AJ, Beattie ED, Martin S, O'cane M, Young IS, Nicholls DP. Mutation screening and genotype: phenotype correlation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999;147:309-16.

8. Schmidt H, Kostner GM. Familial hypercholesterolemia in Austria reflects the multi-ethnic origin of our country. *Atherosclerosis* 2000;148:431-2.
9. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotto L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbon, I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Modena

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 4, (Repeat 5), 682 G>A
- Mutazione aminoacido (codone): E207K, Glu207Lys (GAG>AAG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2B
- Frazione di attività recettoriale residua (1): <2% (omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord (Emilia-Romagna)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Franco-Canadesi, Messicani,
- Olandesi, Cinesi.
- Altre denominazioni dell'allele: FH-French-Canadian-3, FH-Mexico

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 94 bp che include parte dell'esone 4 con la seguente coppia di *primer mismatch*:

5'- CCCCCTGCAAGGACAAATCTGCC - 3' Senso-25nt

5'- GGGGGAGCCCAGGGACAGGTGATAG - 3' Antisenso-25nt (2)

La mutazione, se presente, unitamente al *mismatch* introdotto dal *primer* senso, crea un sito di restrizione Sty I (C/CWWGG) che dà luogo, nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 70 e 24 bp evidenziabili mediante elettroforesi. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 94 bp che include la seconda parte dell'esone 4 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Sty I, di 0.8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 94 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 70 e 24 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Lettersdor FE, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH. Common low-density lipoprotein receptor mutation in the French Canadian population. *J Clin Invest* 1990;85:1014-23.
2. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
3. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
4. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C, Beroud C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1998;26:248-52.
5. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
6. Kotze MJ, Loubser O, Thiar TR, De Villiers JN, Langenhoven E, Theart L, Steyn K, Marais AD, Raal FJ. CpG hotspot mutations at the LDL receptor locus are a frequent cause of familial hypercholesterolaemia among South African Indians. *Clin Genet* 1997;51:394-8.
7. Loubser O, Marais AD, Kotze MJ, Godenir N, Thiar R, Scholtz CL, De Villiers JN, Hillerman R, Firth JC, Wich HF, Maritz F, Jones S, Van Der Westhuyzen DR. Founder mutations in the ldl receptor gene contribute significantly to the familial hypercholesterolaemia phenotype in the indigenous South African population of mixed ancestry. *Clin Genet* 1999;55:340-5.
8. Pimstone SN, Sun XM, Du Soiuch C, Frohlich JJ, Hayden MR, Soutar AK. Phenotypic variation in yeterozigous familial hypercholesterolaemia; a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:309-15.
9. Mak YT, Pang CP, Tomlinson B, Zhang J, Chan YS, Mak TW, Masarei JR. Mutation in the low density lipoprotein receptor gene in Chinese familial hypercholesterolaemia patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1600-5.

FH-Reggio Emilia-2

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 5, Repeat 6, 761 A>C
- Mutazione aminoacido (codone): Q233P, Gln233Pro (CAG->CCG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord (Emilia Romagna)

- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 173 bp che include l'esone 5 con la seguente coppia di *primers*:

5'-CAACACACTCTGTCCTGTTTTCCAG -3' Senso-25nt (1)
5'-GGAAAACCAGATGGCCAGCGCTCAC -3' Antisense-25nt (1)

La mutazione, se presente, introduce un sito di restrizione Ecl XI (o Xma III) (C/GGCCG) che dà luogo nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 88 e 85 bp evidenziabili mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 173 bp che include l'esone 5 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL di tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito tampone 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Ecl XI, di 0,8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 173 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 88 e 85 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.

4. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Milano-2

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 6, (Repeat 7), 862
- Mutazione aminoacido (codone): E267Stop, Glu267Stop (GAA->TAA)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord (Lombardia)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 173 bp che include l'esone 6 con la seguente coppia di *primer*:

5'-TCCTTCCTCTCTCTGGCTCTCACAG -3' Senso-25nt (1)
5'-GCAAGCCGCCTGCACCGAGACTCAC -3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, elimina un sito di restrizione Bsm I (GAATGCN/N) che dà luogo nell'allele *wild*, alla formazione di due frammenti di 76 e 97 bp evidenziabili mediante elettroforesi. In definitiva si avrà: allele *wild*>97+76 bp e allele mutante >173 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 173 bp che include l'esone 6 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Bsm I, di 0,8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata

fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da due bande di circa 76 e 79 bp e quella dell'allele mutante da una banda di circa 173 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
4. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotto L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Perugia-2

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 7, Repeat A, 952 T>C
- Mutazione aminoacido (codone): C297R, Cys297Arg (TGC->CGC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2A
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Centro (Umbria)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 169 bp che include l'esone 7 con la seguente coppia di primer:

5'-AGTCTGCATCCCTGGCCCTGCGCAG -3' Senso-25nt (1)
5'-AGGGCTCAGTCCACCGGGGAATCAC -3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, elimina un sito di restrizione Bsm I (GAATGCN/N) che dà luogo nell'allele *wild*, alla formazione di due frammenti di 41 e 128 bp evidenziabili mediante elettroforesi. In definitiva si avrà: allele *wild*>41+128 bp e allele mutante >169 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 169 bp che include l'esone 7 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei primers, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10

mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C. L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Bsm I, di 0,8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 169 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 41 e 128 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
3. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Trieste

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 7, (Repeat A), 953 G>T
- Mutazione aminoacido (codone): C297F, Cys297Phe (TGC->TTC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2A
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord-Est (Friuli)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 169 bp che include l'esone 7 con la seguente coppia di *primer*:

5'-AGTCTGCATCCCTGGCCCTGCGCAG - 3' Senso-25nt (1)
5'-AGGGCTCAGTCCACCGGGGAATCAC - 3' Antisense-25nt (1)

La mutazione, se presente, introduce un sito di restrizione EcoR I (G/AATTC) che dà luogo nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 35 e 134 bp evidenziabili mediante elettroforesi (Figura 4). L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 169 bp che include l'esone 7 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL. Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione EcoR I, di 0,8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 169 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 134 e 35 bp (Figura 4).

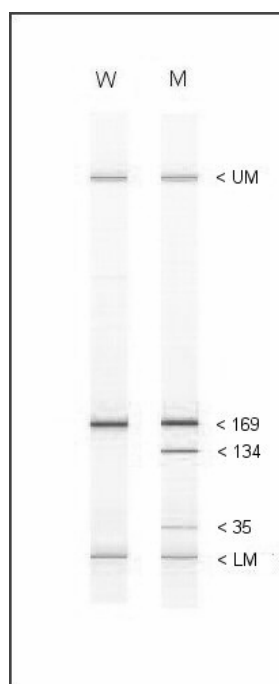


Figura 4. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo ad un prodotto di 169 bp che, nell'allele normale (corsia W) non si scinde per effetto dell'enzima di restrizione EcoR I. Nell'allele mutato, invece, tale sequenza si scinde in due bande di 134 e 35 bp

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Lelli N, Garuti R, Pedrazzi P, Ghisellini M, Simone ML, Tiozzo R, Cattin L, Valenti M, Rolleri M, Bertolini S, *et al.* A new missense mutation (Cys297-->Phe) of the low density lipoprotein receptor in Italian patients with familial hypercholesterolemia (FHTrieste). *Hum Genet* 1994;93(5):538-40.
4. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.
5. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
6. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabboni I. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-52.

FH-Avellino-1 (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 7, (Repeat A), 1056 C>G
- Mutazione aminoacido (codone): C331W, Cys331Trp (TGC->TGG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale.
- Classe funzionale della mutazione (1): 2B, 5
- Frazione di attività recettoriale residua (1): 9% (in omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Campania
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Olandese
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata selettivamente mediante PCR allele-specifica (PASA) una zona di 165 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello senso non ha alcuna specificità. Il *primer* antisenso, invece, (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* C/C con l'allele normale e un appaiamento normale C/G con l'allele mutato. Ciò consente l'appaiamento e l'estensione solo della sequenza mutata. L'allele normale o con una diversa mutazione non dà, invece, alcuna amplificazione.

I *primers* utilizzati sono i seguenti:

5' - AGT CTG CAT CCC TGG CCC TGC GCA G - 3' Senso - 25 nt (1)

5' - GTC CAC CAC CGG GGA TTC ACC TTC C - 3' Antisenso allele-specifico - 25 nt (5)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 165 bp.

Procedura analitica

La miscela per la amplificazione specifica di un frammento di 165 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA

genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 µL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 165 bp che contraddistingue l'allele mutato.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
3. Lombardi, M.P, Defesche, J.C, Kamerling, S.W.A, Redeker, E, Kastelein, J.J.P, Havekes, L.M, Novel mutations in the LDL receptor gene of Dutch familial hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 1997;130 Suppl.:S14.
4. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C, Beroud C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1998;26:248-52.
5. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Cortese C, Motti C, Rampa P, Calandra S, Bertolini S. Characterization and screening of a point mutation in LDL receptor gene found in Southern Italy (Fh-Avellino). *Ann Ist Super Sanità*. 2000;36:459-64.
6. Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rolleri M, Masturzo P, Calandra S. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999;19:408-18.

FH-Chieti-2

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 8, (Repeat B), 1068 A>T
- Mutazioneaminoacido(codone): Asp335Glu+ins Glu,Cys,Gln,Asp,Pro,Asp.
- (GAT>GAA+1068-1069 ins GAGTGTCTCAGGATCCCGAC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Centro Sud (Abruzzo)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 176 bp che include l'esone 8 con la seguente coppia di *primer*:

5'-CCAAGCCTCTTTCTCTCTCTTCCAG - 3' Senso-25nt (1)
 5'-CCACCCGCCGCCTTCCCGTGCTCAC - 3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, dà luogo all'amplificazione di un frammento di maggiore lunghezza (194 bp) evidenziabile mediante elettroforesi (Figura 5). In definitiva si avrà: allele *wild* > 176 bp e allele mutante > 194 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 176 bp che include l'esone 8 viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 µL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer e procedendo come descritto nel paragrafo Materiali e Metodi dalla presenza di una banda di circa 176 bp per l'allele normale e 194 bp per l'allele mutante (Figura 5).

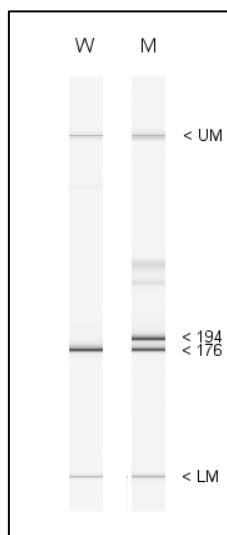


Figura 5. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo a due prodotti da 176 bp e 194 bp corrispondenti, rispettivamente, agli amplificati dell'allele normale (corsia W) e dell'allele mutato, di maggiore lunghezza per l'inserimento di 18 paia di basi

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Patel, D.D, Lelli, N, Garuti, R, Li Volti, S, Bertolini, S, Knight, B.L, Calandra, S. Analysis of two duplications of the LDL receptor gene affecting intracellular transport, catabolism, and surface binding of the LDL receptor. *J Lipid Res.* 1998, 39:1466-75.

FH-Palermo-2 (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 8, (Repeat B), 1090 T>C
- Mutazione aminoacido (codone): C343R, Cys343Arg (TGC->CGC)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2B,5
- Frazione di attività recettoriale residua (1): 15-30 % (in eterozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Isole (Sicilia)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Messicani
- Altre denominazioni dell'allele: FH-Mexico-3

Principio del metodo

Viene amplificata selettivamente, dall'allele mutato, mediante PCR allele-specifica (PASA), una zona di 145 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello senso (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* G/A con l'allele normale e un *mismatch* tollerato, G/G, con l'allele mutato. Il *primer* antisenso, invece, non ha alcuna specificità. Ciò consente l'annealing e l'estensione solo della sequenza mutata. L'allele normale o con una diversa mutazione non dà, invece alcuna amplificazione.

I *primers* utilizzati sono i seguenti:

5'-GATGAGTGTTCAGGATCCCGACACCG -3' Senso allele-specifico-25nt (3)
5'- CCACCCGCCGCTTCCCGTGCTCAC -3' Antisenso-25nt (1)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 145 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione specifica di un frammento di 145 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL del suo specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida

centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 µL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 145 bp che contraddistingue l'allele mutante (Figura 6).

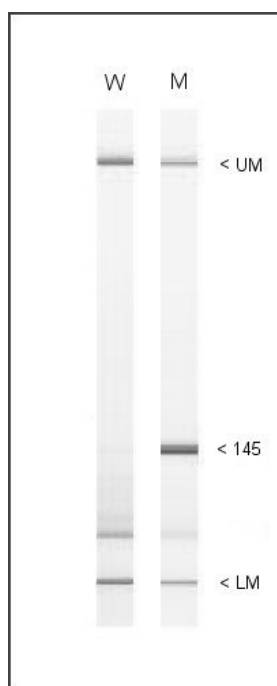


Figura 6. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo, nell'allele mutato ad un prodotto di 145 bp. Nell'allele normale (corsia W) non si osserva alcun prodotto

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
3. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Use of Allele-Specific polymerase chain reaction for detecting point mutations in LDL-receptor gene common in southern Italy. *Atti del 70th European Atherosclerosis Society Congress*, Geneva, Switzerland, 6-9 September 1998. p. 69.

FH-Napoli-1 (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 8, (Repeat B), 1135 T>C
- Mutazione aminoacido (codone): C358R, Cys358Arg (TGT->CGT)

- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 5
- Frazione di attività recettoriale residua (1): <15-30% (omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Campania)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata selettivamente, dall'allele mutato, mediante PCR allele-specifica (PASA) una zona di 102 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello senso (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* G/A con l'allele normale e un *mismatch* tollerato, G/G, con l'allele mutato. Il *primer* antisenso, invece, non ha alcuna specificità. Ciò consente l'annealing e l'estensione solo della sequenza mutata. Se l'allele è normale o ha una diversa mutazione non si ha, invece alcuna amplificazione.

I *primers* utilizzati sono i seguenti:

5'-CTGGAGGGTGGCTACAAGTGCCAGG-3'	Senso allele-specifico-25nt (4)
5'-CCACCCGCCGCCTTCCCGTGCTCAC-3'	Antisenso-25nt (1)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 102 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione specifica di un frammento di 102 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL di tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 µL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 102 bp che contraddistingue l'allele mutante.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.

3. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C, Beroud C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1998;26:248-52.
4. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Use of Allele-Specific polymerase chain reaction for detecting point mutations in LDL-receptor gene common in southern Italy. *Atti del 70th European Atherosclerosis Society Congress*, Geneva, Switzerland, 6-9 September 1998. p. 69.

FH-Savona

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 10, EGF spacer, 1417 ins 4
- Mutazione aminoacido (codone): I452 ins Thr+Fs 62aa.Stop
- (1418-1421 ins ACAT)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord-Ovest (Liguria, Piemonte, Emilia)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Inglese
- Altre denominazioni dell'allele: FH-Parma

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 122 bp (126 bp nell'allele mutato) che include parte dell'esone 10 con la seguente coppia di *primer mismatch*:

5'-ATGACACCGTCATCAGCAGGGACGT - 3' Senso-25nt
5'-GCCCTTGGTATCCGCAACAGAGACA - 3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, unitamente al *mismatch* introdotto dal *primer* senso, crea un sito di restrizione Rsa I (GT/AC) che dà luogo, alla formazione di due frammenti di 101 e 25 bp evidenziabili mediante elettroforesi. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione specifica di un frammento di 122 bp (126 bp nell'allele mutato) viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,3 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Rsa I, di 0.7 µL dello specifico tampone 10x. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 122 bp e quella dell'allele mutante dalla banda di 101 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. De Mattei S, Rolleri M, Masturzo P, Fascetti V, Elicio N, Motti C, Cortese C, Calandra S, Bertolini S. A founder-related LDL-receptor gene mutation in the Liguria region of Italy. *Atherosclerosis* 1997;134:66.
3. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
4. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3092-101.
5. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group. *Atherosclerosis* 1998;136:175-85.

FH-Reggio Emilia-1

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 10, (EGF spacer), 1439 del 11 bp:
- Mutazione aminoacido (codone): L459-51aa>Stop
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord(Emilia-Romagna)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una parte dell'esone 10 che dà luogo, in un soggetto eterozigote, ad un prodotto di 202 bp (allele normale) e ad un altro di 191 bp (allele mutato). A tal fine, si utilizza la seguente coppia di *primer*:

5'-AGATGAGGGCTCCTGGTGCGATGCC - 3' Senso-25nt (1)

5'-GCCCTTGGTATCCGCAACAGAGACA - 3' Antisenso-25nt (1)

La conferma della mutazione può essere effettuata mediante digestione dei prodotti di amplificazione con l'enzima di restrizione Bam HI (G/GATCC) che dà luogo, nel gene normale e in quello mutante, a frammenti di differente lunghezza, evidenziabili mediante elettroforesi. In definitiva si avrà: allele *wild* > 135+67 bp e allele mutante >124+67 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 202 bp includente la prima parte dell'esone 10 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,3 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione BamHI, di 0,7 µL dello specifico tampone 10x. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 135 bp e quella dell'allele mutante da una banda di 124 bp (Figura 7).

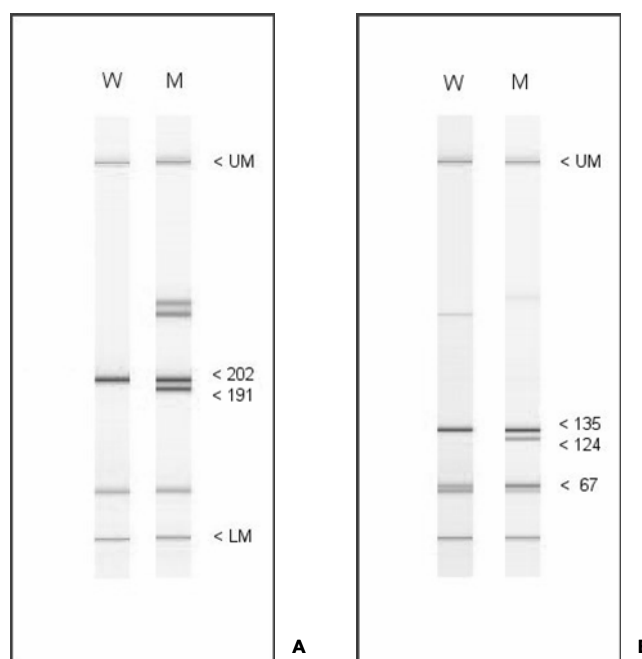


Figura 7. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). A) L'amplificazione PCR dà luogo a due prodotti di 202 e 191 bp corrispondenti, rispettivamente, all'allele normale e a quello mutato per la delezione di 11 paia di basi (corsia M). B) La digestione di questo amplificato con l'enzima BamHI dà luogo a due frammenti di 135 e 124 bp per lo spostamento del sito di restrizione, rispettivamente, nell'allele normale (corsa W) e in quello mutato (corsia M)

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.

FH-Bari-2

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 10, (EGF spacer), 1567 G>A
- Mutazione aminoacido (codone): V502M, Val502Met (GTG->ATG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2A
- Frazione di attività recettoriale residua (1): 15-30% (omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Puglia)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Kuwaitiani, Olandesi, Coreani.
- Altre denominazioni dell'allele: FH-Kuwait

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 162 bp che include la seconda parte dell'esone 10 con la seguente coppia di *primer*:

5'-GATCCACAGCAACATCTACTGGACC - 3' Senso-25nt (1)

5'-AGCCCTCAGCGTCGTGGATACGCAC - 3' Antisense-25nt (1)

La mutazione, se presente, introduce un ulteriore sito di restrizione Nla III (CATG/) rispetto a quello normalmente presente nell'allele normale. Ciò dà luogo, nell'allele mutante, alla formazione di tre frammenti di 120, 16 e 26 bp evidenziabili mediante elettroforesi (Figura 8). In definitiva si avrà: allele *wild* >136+26 bp e allele mutante > 120+16+26 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 162 bp comprendente la seconda parte dell'esone 10 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 μ L del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 μ L dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 μ L) dell'enzima di restrizione Nla III, di 0.8 μ L dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 μ L. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 μ L di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da due bande di circa 136 e 126 bp e quella dell'allele mutante da tre bande di circa 16, 26 e 120 bp (Figura 8).

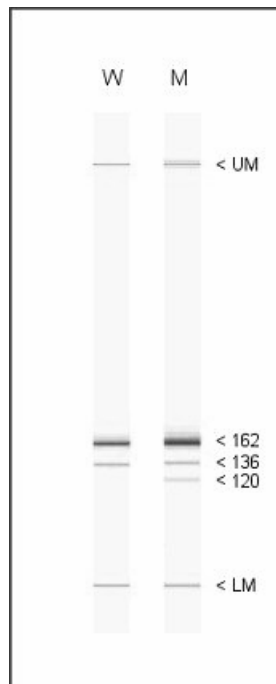


Figura 8. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo ad un prodotto di 162 bp che, nell'allele normale (corsia W), si scinde per effetto dell'enzima di restrizione Nla III in due frammenti di 136 e 26 bp. Nell'allele mutato (corsia M), invece, per la presenza di un ulteriore sito di restrizione si osservano tre bande di 162, 136 e 120 bp

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Russel DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Ann Rev Genet* 1990;24:133-70.
2. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
3. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
4. Lombardi P, Sijbrands EJ, Van De Giessen K, Smelt AH, Kastelein JJ, Frants RR, Havekes LM. Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. *J Lipid Res* 1995;36:860-7.

5. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.
6. Fascetti V, Roller M, Guido V, Trovatiello G, Masturzo P, Garuti R, Motti C, Cortese C, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. FH clusters in southern Italy. *Atherosclerosis* 1997;135(Suppl 1):S12.

FH-Palermo-1 (amplificazione allele-specifica)

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 11, (EGF spacer),1646 G>A
- Mutazione aminoacido (codone): G528D, Gly528Asp (GGT->GAT)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2A
- Frazione di attività recettoriale residua (1): <2% (in omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Campania, Sicilia (2)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Greci (3)
- Altre denominazioni dell'allele: FH-Genoa (1,3)

Principio del metodo

Viene amplificata selettivamente, dall'allele mutato, mediante PCR allele-specifica (PASA) una zona di 109 bp. A tal fine, si utilizza una coppia di *primer* in cui quello senso (allele specifico), ha all'estremità 3' un *mismatch* C/C con l'allele normale e un *mismatch* C/T con l'allele mutato. Il *primer* antisenso, invece, non ha alcuna specificità. Ciò consente l'annealing e l'estensione della sequenza mutata. Se l'allele è normale o ha una diversa mutazione non si ha, invece alcuna amplificazione.

I *primers* utilizzati sono i seguenti:

5'-AGATCAAGAAAGGGGGCCTGAATGC -3' Senso-25nt (6)

5'-TGGGACGGCTGTCCTGCGAACATAC -3' Antisenso-25nt (1)

L'amplificazione allele-specifica viene evidenziata mediante elettroforesi osservando: allele *wild* => nessun amplificato, allele mutante (omo- o eterozigote) => amplificato di 109 bp.

Procedura analitica

La miscela per l'amplificazione specifica di un frammento di 109 bp dell'allele mutato viene eseguita in una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

La mutazione può essere evidenziata applicando direttamente 1 µL del prodotto di amplificazione PCR su un LabChip DNA500 del Bioanalyzer (Appendice C) dalla banda di circa 109 bp per l'allele mutato (Figura 9).

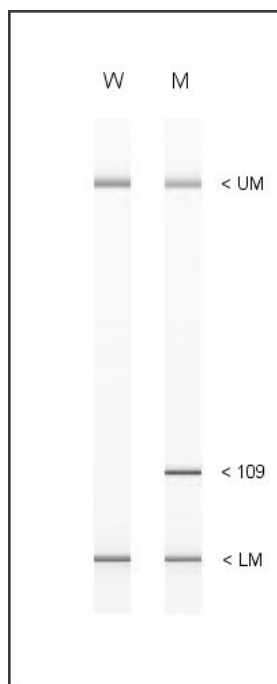


Figura 9. Applicazione della procedura descritta ad un campione di DNA estratto dal sangue di un soggetto eterozigote per la mutazione in esame (corsia M). L'amplificazione PCR dà luogo, nell'allele mutato ad un prodotto di 109 bp che non viene osservato nel campione normale (corsia W)

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Russel DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Ann Rev Genet* 1990;24:133-70.
2. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
3. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
4. Traeger-Synodinos J, Mavroidis N, Kanavakis E, Drogari E, Humphries SE, Day IN, Kattamis C, Matsaniotis N. Analysis of low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek FH heterozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands. *Hum Genet* 1998;102(3):343-7.
5. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.

6. Fascetti V, Rolleri M, Guido V, Trovatiello G, Masturzo P, Garuti R, Motti C, Cortese C, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. FH clusters in southern Italy. *Atherosclerosis* 1997;135(Suppl 1):S12.
7. Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Simple detection of a point mutation in LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in southern Italy by allele-specific polymerase chain reaction. *Journal of Lipid Research* 1998;39:1101-5.

FH-Napoli-4

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 12, EGF spacer, 1775 G>A
- Mutazione aminoacido (codone): G571E, Gly571Glu (GGG->GAG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 5
- Frazione di attività recettoriale residua (1): 5-15% (eterozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Basilicata, Campania, Puglia)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: Tedeschi, Austriaci, Belgi.
- Altre denominazioni dell'allele: FH-Sicily; FH-Foggia

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 130 bp che include parte dell'esone 12 con la seguente coppia di *primer mismatch*:

5'-GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT - 3' Senso-25nt (1)

5'-CTCCAAGATGGTCTTCCGGTAGGCC - 3' Antisenso-25nt

La mutazione, se presente, unitamente al *mismatch* introdotto dal *primer* antisenso, crea un sito di restrizione Stu I (AGG/CCT) che dà luogo, nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 107 e 23 bp evidenziabili mediante elettroforesi. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 130 bp che include parte dell'esone 12 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 pmoli di ciascuno dei *primers*, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,3 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Stu I, di 0.7 µL dello specifico tampone 10x. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 130 e quella dell'allele mutante da due bande di circa 107 e 23 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
3. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.
4. Fascetti V, Roller M, Guido V, Trovatiello G, Masturzo P, Garuti R, Motti C, Cortese C, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. FH clusters in southern Italy. *Atherosclerosis* 1997;135(Suppl 1):S12.

FH-Frosinone-1

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 14, Repeat C, 2054 C>T
- Mutazione aminoacido (codone): P664L,Pro664Leu (CCG->CTG)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): 2B
- Frazione di attività recettoriale residua (1): 5-30% (omozigote)
- Area italiana a maggiore diffusione : Centro (Lazio)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: diffusa in tutto il
- Altre denominazioni dell'allele: FH-Gujerat

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 203 bp che include l'esone 14 con la seguente coppia di *primer*:

5'-CCTGACTCCGCTTCTTCTGCCCCAG - 3' Senso-25nt (3)

5'-CGCAGAAACAAGGCGTGTGCCACAC - 3' Antisenso-25nt (3)

La mutazione, se presente, introduce un sito di restrizione Pst I (CTGCA/C) che dà luogo nell'allele mutante, alla formazione di due frammenti di 108 e 95 bp evidenziabili mediante elettroforesi su gel. L'allele *wild*, invece, non dà luogo a prodotti di restrizione.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 203 bp che include l'esone 14 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano

concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Pst I, di 0.8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da una banda di circa 203 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 108 e 95 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Soutar AK, Knight BL, Pate DD. Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein-receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia that affect ligand binding and intracellular movement of receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4166-70.
2. King Underwood L, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Identification of the 664 proline to leucine mutation in the low density lipoprotein receptor in four unrelated patients with familial hypercholesterolemia in the UK. *Clin Genet* 1991;40:17-28.
3. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
4. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.
5. Varret M, Rabes JP, Collod-Beroud G, Junien C, Boileau C and Beroud C. Software and databases for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;25:172-80.

FH-Mondovì

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: esone 15, OLS, 2308 C>T
- Mutazione aminoacido (codone): G749Stop,Gly749Stop (CAA->TAA)
- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Nord
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 246 bp che include l'esone 15 con la seguente coppia di *primer*:

5'-GAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACT - 3' Senso-25nt (1)

5'-GTGTGGTGGCGGGCCCAGTCTTTAC - 3' Antisenso-25nt (1)

La mutazione, se presente, introduce un sito di restrizione Dde I (C/TNAG) che si aggiunge a quello già presente nell'allele *wild*. Ciò dà luogo alla formazione di 3 frammenti di 29, 54 e 163 bp evidenziabili mediante elettroforesi.

In definitiva si avrà: allele *wild* > 192+54 bp e allele mutante > 163+54+29bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 246 bp che include l'esone 15 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg^{++} viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di $MgCl_2$ tale da portare la concentrazione finale di Mg^{++} ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Dde I, di 0.8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da due bande di circa 192 e 54 bp e Quella dell'allele mutante da tre bande di circa 163, 54 e 29 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.

FH-Benevento

Informazioni sulla mutazione

- Sito della mutazione nel gene LDLR: introne 15, OLS, 2311+1 G>A
- Mutazione aminoacido (codone): Introne 15 (G>A)

- Effetto funzionale della mutazione: riduzione attività recettoriale
- Classe funzionale della mutazione (1): non determinata
- Frazione di attività recettoriale residua (1): non determinata
- Area italiana a maggiore diffusione : Sud (Campania, Puglia)
- Altre popolazioni in cui la mutazione è stata riscontrata: nessuna
- Altre denominazioni dell'allele: nessuna

Principio del metodo

Viene amplificata mediante PCR una zona di 334 bp che include parte dell'esone 15 con la seguente coppia di *primer*:

5'-CGTAAGGACACAGCACACAAC - 3' Senso-21nt (3)
5'-GGACCTGGCCCCTCATATGAT - 3' Antisenso-21nt (3)

La mutazione, se presente, elimina uno dei due siti di restrizione Sty I (C/CWWGG) che danno luogo, nell'allele *wild*, alla formazione di 3 frammenti di 217, 105 e 22 bp evidenziabili mediante elettroforesi.

In definitiva si avrà: allele *wild* => 217+105+22 bp e allele mutante => 217+127 bp.

Procedura analitica

L'amplificazione di un frammento di 334 bp che include parte dell'esone 15 si ottiene preparando una miscela del volume totale di 12,5 µL contenente 125 ng di DNA genomico, 2,5 nmoli di ciascuno dei nucleotidi trifosfati, 1 U di Taq polimerasi e 1,25 µL dello specifico tampone 10x. La concentrazione finale di Mg⁺⁺ viene portata a 1,5 mM.

In pratica, si pipetta nella provetta di amplificazione, nell'ordine: 9,05 µL di acqua bidistillata (tale volume va modificato nel caso che reattivi o campioni impiegati abbiano concentrazioni diverse da quelle indicate di seguito), 0,25 µL di una mix dei dNTP (conc. 10 mM) 0,5 µL di una mix dei *primers* sopra indicati, 1,25 µL dell'apposito buffer 10x per la Taq polimerasi in uso, 0,75 µL di una soluzione 25 mM di MgCl₂ tale da portare la concentrazione finale di Mg⁺⁺ ad un valore di 1,5 mM. Si miscela vigorosamente su vortex e, dopo una rapida centrifugata, si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi (corrispondente ad 1 U di enzima). Si mescola delicatamente e si aggiungono 125 ng di DNA genomico in un volume di 0,5 µL.

Si effettua l'amplificazione mediante il seguente programma al Thermal Cycler: denaturazione di 5' a 94 °C seguita da 30 cicli (94 °C per 30''/58 °C per 30''/72 °C per 1') e da un'estensione finale di 7' a 72 °C.

L'amplificazione viene controllata al BioAnalyzer caricando 1 µL del prodotto di amplificazione su chip DNA-500 (Appendice C).

Un'aliquota di 5,4 µL dell'amplificato è posta in una provetta Eppendorf, addizionata di 2 U (1 µL) dell'enzima di restrizione Sty I, di 0,8 µL dello specifico tampone 10x e acqua distillata fino a portare il volume a 8 µL. La miscela è incubata per due ore a 37°C. Successivamente si applica 1 µL di prodotto di digestione sul Bioanalyzer, come previsto per i prodotti di amplificazione. La presenza dell'allele normale è evidenziata da tre bande di circa 217, 105 e 22 bp e quella dell'allele mutante da due bande di circa 217 e 127 bp.

Riferimenti bibliografici sulla mutazione

1. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
2. Bertolini S, Calandra S. Mutazioni del gene del recettore LDL responsabili di ipercolesterolemia familiare in Italia. *Arteriosclerosi News* 1994;1:11.

3. Lelli N, Garuti R, Ghisellini M, Tiozzo R, Rolleri M, Aimale V, Ginocchio E, Naselli A, Bertolini S, Calandra S. Occurrence of multiple aberrantly spliced mRNA of LDL-receptor gene upon a donor splice site mutation that causes familial hypercholesterolemia (FH Benevento). *J Lipid Res* 1995;36:1315-24.
4. Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:67.
5. Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rolleri M, Masturzo P, Calandra S. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999;19:408-18.

APPENDICE A

**Sequenza del gene LDLR dedotta dal confronto BLAT
(<http://www.UCSC.edu>) tra la sequenza del cromosoma 19
(Assembly May 2004) e la sequenza del messaggero NM 000527
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)**

Cromosoma 19: dal nucleotide 11061132 al 11105490

ctcctcctct	tgcagtgagg	tgaagacatt	tgaaaatcac	cccactgcaa	11061081	
actcctcccc	ctgctagaaa	cctcacattg	aaatgctgta	aatgacgtgg	11061131	ESONE
GCCCCGAGTG	CAATCGCGGG	AAGCCAGGGT	TTCCAGCTAG	GACACAGCAG	11061181	1
GTCGTGATCC	GGGTCGGGAC	ACTGCCCTGGC	AGAGGCTGCG	AGCATGGGGC	11061231	Start
CCTGGGGCTG	GAAATTGCGC	TGGACCGTCG	CCTTGCTCCT	CGCCGCGGCG	11061281	Codon
GGGACTGCAG	gtaaggcttg	ctccaggcgc	cagaataggt	tgagagggag	11061331	Intr.
cccccggggg	gcccttggga	atztattttt	ttgggtacaa	ataatcactc	11061381	1
catccctggg	agacttgtgg	ggtaatggca	cggggtcctt	cccaaacggc	11061431	
tggagggggc	gctggagggg	ggcgctgagg	ggagcgcgag	ggtcgggagg	11061481	
agtctgaggg	atttaaggga	aacggggcac	cgctgtcccc	caagtctcca	11061531	
cagggtgagg	gaccgcatct	tctttgagac	ggagtctagc	tctgtcgccc	11061581	
aggatggagt	gcagtggcac	gatctcagct	cactgcaacc	tccgcctccc	11061631	
gggtttaagc	gagtctctct	tctcagcctc	ccgaatagct	gggattacag	11061681	
gcgcccacc	accacgccc	cctaattttt	gtatttttag	tagagacggg	11061731	
ttttcaccat	tttgccagg	ctggtctcga	accccgacct	caggtgatct	11061781	
gccccaaagt	gctgggatta	caggcgtcag	ccaccgcgcc	cggccggggac	11061831	
cctctcttct	aactcggagc	tgggtgtggg	gacctccagt	cctaaaacaa	11061881	
gggatcactc	ccacccccgc	cttaagtcct	tctgggggcg	agggcgactg	11061931	
gagacccgga	tgtccagcct	ggaggtcacc	gcgggctcag	gggtcccgat	11061981	
ccgcttttgc	cgaccccagg	gcgccactgc	catcctgagt	tgggtgcagt	11062031	
cccgggattc	cgccgcgtgc	tccgggacgg	gggccacccc	ctcccgcgcc	11062081	
tgcccccgcc	cctttggccc	gccccccgaa	ttccattggg	tgtagtccaa	11062131	
caggccaccc	tgcagccact	ccccttgtcc	aatgtgaggc	ggtggaggcg	11062181	
gaggcgggcg	tgggaggac	ggggcttgtg	tacgagcggg	gcggggctgg	11062231	
cgcggaagtc	tgagcctcac	cttgtccggg	gcgaggcgga	tgcaggggag	11062281	
gcctggcggt	cctccgcggt	tccgtgcaca	aaggcgacga	caagtcccgg	11062331	
gtccccggag	cgccctccgc	gacatacacg	agtcgcctct	cgttatcctg	11062381	
ggccctcctg	gcgaagtcct	cggtttccgc	tgtgctctgt	ggcgacacct	11062431	
ccgtccccac	cttgtcctgg	ggggcgccct	cgccccacca	gccccgatca	11062481	
agttcacaga	ggggcccccg	gccaccctca	aggcctcggt	tccttacgag	11062531	
gttgaaacgt	tgcctcagaa	tctccccgcc	cctccttggg	ctgcagccga	11062581	
gatcttcagc	cacggtgggg	cagctatccc	ccgggaccga	ccccctgggg	11062631	
tggcctcgct	tcttcagagg	ctgtgaatgg	cttcggttca	gctgtccaag	11062681	
cggcgatttt	tcccttgggt	gaaatggatt	agatttttaga	ttccacaag	11062731	
aggctgggta	gtgcatgata	ctgagttaga	gcttttttagg	tggctttaaa	11062781	
ttagttgcag	agagacagcc	tgcctctaga	caacagctac	atggcccttt	11062831	
ccctcctgag	aaccagccta	gcctagaaaa	ggattgggat	tgcctgatga	11062881	
acacaaggat	tgcaggaaac	ttttttttta	attggcaagg	gggttggctt	11062931	
tgactggatg	gagagctttg	aactgccttg	aaattcacgc	tgtactaac	11062981	
accagagttt	cctctgggag	gccagagagg	gagggagggt	gtaatgaaat	11063031	
acggatgatt	gttcttttat	ttttatttac	ttattttatt	tttaactttt	11063081	
tgtagagatg	aggctctcgt	tgggttgcct	ggctgggtct	gaactcctgg	11063131	
cctcaagcga	tcctcctacc	tcagcctccc	aaagtgttgg	gattacagga	11063181	
gtgagccacc	gcgccccacc	ggggatgatg	atgattgcaa	acattctgcc	11063231	
actcagtttt	acaaaagaaa	gagaggcact	ggattaatgt	gtatctcact	11063281	
caccaatcaa	cctcttcctt	aagagaaaat	gttaagggaag	tcttaggcaa	11063331	
ggccttgttt	gttcatcact	ttagtttctc	tctcccgga	tggctgagaa	11063381	

tgtgatgttt	cctctgttgt	caaggagact	acaccctga	tgttttcctc	11063431
cagacttctg	agagctggtg	tgtgtttcta	gcactttcta	gctgcaccac	11063481
ctcacgctgt	agctggcttc	aaggcatac	cagggggag	tttcttgtcc	11063531
atttccttta	caaagggag	ttgttggaat	ctgaaccgca	agccttcaat	11063581
tagacaaaa	tcaggcaaca	gcggtgagcg	cagctccaaa	cgtgtcaatg	11063631
actcacccaa	atttgagtaa	gggagttggc	tgctttaacg	agccgcaggg	11063681
tgattccctt	gtcatttccg	gaaataccta	tcttccaggg	aacactggga	11063731
aaaaacaggg	agacctttgt	tgagacagaa	aacctgtagg	ggaattctgt	11063781
tcctcattcc	tgctcttata	tgtagacttc	ctccctgata	agatccaatt	11063831
ctagatgggt	cggttgctcc	ttgctttgat	gggtgctttg	atgggcttta	11063881
ttattattat	tattattatt	attattattt	tgatgggctt	tttgatgtcc	11063931
cttttccttc	ccactctgtg	cccaactgtc	aagcaaatag	ccttttgttg	11063981
ctaagagact	gcagatgtaa	ccgaccagca	gcaaacagtg	agtcaggctc	11064031
tctcttccgg	aagcaaaatc	aattgctgag	atcactctgg	ggaaaatacc	11064081
caccttattt	ggaaagaagc	actgatcaat	tgatgtctat	tttttttttt	11064131
tttgagttgg	agtctcgccc	tgtcacccag	gctggagtgc	aatggcataa	11064181
tctcgctca	ctgcaatccc	cgcctcccgg	gttccagcaa	ttctcctgcc	11064231
tcagcctcct	gagtagctgg	aattataggc	gcctgccaca	acaccggct	11064281
aatttttgta	tttgtagtag	agatgggggt	tcaccacgtt	ggccaggctg	11064331
gtctcgaact	cctgacctcg	tgatccaccc	gcctcagcct	cccaaagtcc	11064381
aaggattgca	ggcgtgacct	actgtgccag	ccaatcaatt	gattttctcat	11064431
tcattttcag	ctggctctgt	tcccttaagc	caggggattt	tcgtttgttt	11064481
gtttcccttt	caaggaaatg	attctagcta	cagttttgat	ttccttgtac	11064531
aactgttttc	agtagcacag	ggaaagaaaa	catcgaaagc	attcaccacc	11064581
tcattttgtg	gctgggggaa	aaagcagaaa	tgtgtattct	ctttttttgt	11064631
ttcgatgacc	ttgttcctga	cttgttactc	gtgacttgag	agatcagagg	11064681
gctagaggac	tagaatttat	agaggtgttt	tttttgtttg	tttatttttg	11064731
ttcgagttgc	ccaggctgga	gtgcagtggc	gcaatctcgg	ctcactgcaa	11064781
cctctgcctc	ccaggttcaa	gcgattcttc	ggcctcagcc	tcctgagtag	11064831
ctggaactac	aggcgcccgc	caccacaccc	agctaatttt	tgtatttttc	11064881
agtagagatg	ggatttcacc	atatttgtca	agctggcctc	gaactcctga	11064931
cctcgtgatc	caccgcgctc	agtttcccaa	agtgtcggga	gtacaggcgt	11064981
gagccgccgt	gcccggcctt	tttgtgtttt	tgtgtttttg	agaggagctc	11065031
attgcttttt	aggcttccct	agcgtgagaa	aatctgggga	tccatgctct	11065081
agtttacttc	cttttttttt	ttttttttga	gatggagtct	cgcttagatt	11065131
gcctaattct	agctcattgc	aacttctgcc	tccgggggtc	aagggtattct	11065181
cgtgtctcag	cctcctgggt	agctaggata	cgggcacccg	ctaccatgcc	11065231
tggctaattt	tgtactttta	gtagagacag	ggtttcgcc	cgttgccag	11065281
gctggctctg	aactcctgac	ctcagggtgag	ccgcctgcct	tggcctccca	11065331
aagtgtcag	attacaggcg	tgagccaccc	cgcttgccct	aatttgcttt	11065381
tcctgaaatt	caaatggtct	aatatgaaaa	acgccaacct	tgcttgaaag	11065431
aataagaaa	aggtgcggtt	tcgttgggcc	gttgatgttt	ggaacaggac	11065481
tggttttgtc	cccttgctcg	gaaagggcag	caactgtgag	gacagctccc	11065531
tgacgtgctc	tactcagca	ctgttccgtt	cctgagcact	gtccccacta	11065581
gctaggccaa	gggagctcat	ttggcaggca	actgctgtct	ggctgcgcct	11065631
gtggcagtaa	aatctgcctt	tattttttgg	aggcagggtc	ttgccctgtc	11065681
gctcaggctg	aagtgtgcag	ttatagctca	ctgcagcctc	cagcttctgt	11065731
actcaactga	tcctcctctc	tcagcctcct	gagtagctgg	gactatacgc	11065781
acgtgttacc	actcccacct	cagtttgttt	gtttatttat	ttattttatt	11065831
atttattgag	atggagtttt	gctcttgctg	cccaggctgg	agtgcaatgg	11065881
cgcgatctcg	gctcaccgca	acctccacct	cctgggtcaa	gcgattctct	11065931
tgccatcagc	tcctgagtag	ctgggattac	aggcatgcac	caccacgccc	11065981
ggctaatttt	gtatttttctg	tagagatggg	gtttctccac	attggttcag	11066031
gctgttctcg	aactcccaac	ctcagggtgat	ccaccgcct	cagcctccca	11066081
aagtgtcggg	attataggcg	tgagcccccg	aaccgcgcca	ctcccagcta	11066131
agtttaaat	ttttgtttgt	ttgttcgttt	gtttttattt	tttgagacag	11066181
agtcctccgc	ccaggctgga	gcgcagatca	ctgcctcctt	gacctccag	11066231
gcttaaggca	tcctcccaac	tcagcctccc	aagtagctgg	gattacaggt	11066281
gtgtgccact	atgcttggct	aagttgtgta	ttttttgtag	agatgggggt	11066331
caagggatcc	tcgctttgtt	gcctcggttg	gtctcaaaact	cctgggctca	11066381
agcagtcctc	cctcctcagc	ctcccaaggt	gctggggaaa	tccacttttg	11066431

aaacattgtc	tggagagttg	cccaggtggt	agatcacaga	aataggtcac	11066481
cgtgggggtc	ttcccatggg	tgcagtcttg	agccacctgt	ggccagcaaa	11066531
tatttggaga	ataatagtca	ggggagagct	tgagggtccag	ggaaaggttt	11066581
tgtttttctt	cagggaaagg	tttttattgt	tctttatccc	tccttaaagg	11066631
accttcaggt	gttactgaca	ttcccgtctt	acccagtggc	acatttagtt	11066681
tgtaagctgg	gccctcgtag	agaggtaggg	aggtgagagc	attggattag	11066731
tggtcaccaa	agctgcggtc	acctagtggg	gtgatcagag	gctcctccct	11066781
taagatcttg	attgccaacg	cctctggccc	aactttcctt	tttatttatc	11066831
gcaagcctcc	tggaaatctca	attgcttttt	gcccacccgg	tgtgtcagca	11066881
caagaaatga	gtcatttcct	cctttaagca	cagttgaaat	tgagctgtga	11066931
gtcagtggag	tgtgtacgat	attgtcaaag	cggggtgtgt	acagtattga	11066981
cagatctgtg	gttgggcaag	agaattatca	gagtttgtga	ccacagcaga	11067031
ttccaaagct	cgactcattt	tcttctctct	tccttccctt	ttttcttttc	11067081
tttttttttt	tttttttgac	agagtctcgc	tctgttgccc	aggctggagt	11067131
gcagtggcac	aatctgggct	cactgcagcc	cctgcctcct	gggttcaaag	11067181
gattctcatg	tttcagcctc	cagagttagc	gcaattacag	gcattcgggt	11067231
tcaagtgatt	ctcctgcctc	agccacctga	gcagctggga	ttacaggcgc	11067281
ccgccaccac	gcccggctaa	tttttgtatt	tttagtagag	acgggggttc	11067331
accatgttga	ccaggctggg	ctcgaactcc	tgaactcagg	tgatccgccc	11067381
acttcggcct	cccaaagtgc	tgagattaca	gacgtgagtc	accgcgccc	11067431
gcctgttctg	ttctttaatt	ctcaaaacac	cctctaggaa	gtagagactg	11067481
ccattctccc	ccattttaca	gatcaggaaa	ctgagtccca	gaaggattta	11067531
gtcagttacc	caagttgttc	tagttaaatg	gcctggaaaag	ccagtgaagc	11067581
ccaggattgt	ctatctaacc	cccttactac	tctaactttc	agggaatcca	11067631
catgaattgt	ctgggtcaac	catcaaagtt	gaaatggata	aagggggctg	11067681
gatgcggtgg	ctgatgcctg	taatcctagc	actttgggag	gccgagatgg	11067731
gtgggtggat	tgcttgagcc	caagagtttg	agaccagcct	gggcaacata	11067781
gtgagacacc	tgtctctgca	aaaaataaat	aaaaagttag	ctgagtgtga	11067831
tggtgcaccc	ctctagtac	agctgttgag	ttaggcttag	gcaggaggat	11067881
cgcataaacc	tgggaggtgg	aggcgccgct	gagcctcagt	catgccactg	11067931
cactccaacc	tgggcaacag	agtgaagcc	ggtgtccgaa	agagaaagaa	11067981
aaaaagacat	agatacatct	tttaaagtta	ggttgtagtg	taattaccta	11068031
caactcagtt	tcaactgtgc	ttaaaggagg	aatgactca	tttcttgcta	11068081
catatcaaag	tagcccaaaa	tgtagtggct	taaaacaaca	catttatgat	11068131
ttctcagttt	ttgcgtgtca	ggaatttgga	agcagcacag	ctagacggtt	11068181
ccagctcagg	gtctctcatg	aagttgcaat	caaaatattg	gcaggagaga	11068231
aaaacataat	ttcagaagct	gcaggcatag	gaagacttgg	ctgggggtga	11068281
aggatccact	tccaagatgg	cgcactcagt	ggctcttggc	tggaggcctc	11068331
agttccctgc	tccgtggagc	tctccctcca	gctgcttgag	tggactcatg	11068381
acatgcagct	ggcctccctc	ggagcagtcg	atccaacaat	gagcatggcc	11068431
atgaactagg	ctcagaagcc	actccctgtc	gtctctacat	tttcttatca	11068481
gaagcaagtc	attaaaagtc	cagtgccact	ccaggggaga	cgaattaggc	11068531
tctgccttct	gaaaggatta	tcacagaaga	tgcggtccta	tattcttttt	11068581
ttaaaattat	tctttttttt	atttttaga	gatggggtct	tggatatgtg	11068631
cctaggccaag	tctggaattc	ctgggctcaa	acaatcctgt	ctctgcctcc	11068681
caaagtgttg	ggattacagg	catgagccac	tgcacctggt	catgtggtca	11068731
tattttcttt	ttcttttttt	tttttttttg	agacagagtc	tctgtcgccc	11068781
aggctggagt	atggtggcgt	gatctcagtt	cactgcagcc	tccgcctccc	11068831
gggttcaagc	gattctcctg	cctcagcctc	ctgagttagc	gggattacag	11068881
gcgcccgcga	acatgccagc	ctaatttttt	tagtagagat	gggggtttcac	11068931
catgttagcc	aggatggtct	cgatctcctg	atttggtgat	ccgccacctc	11068981
tggcctccca	aagtttcaac	catcgatcag	aacttattga	tgtacttatg	11069031
tagctaggca	cgggtggcgc	tgctgtaat	cccagctact	tggagggttt	11069081
aaggcaggag	aatcgcttga	acctgggagg	cagaggttac	agttagtcaa	11069131
gatcatacca	ttgcaactca	gtctgggcaa	cagaatgaga	ctctgtctca	11069181
aaaacaaaaa	acaaaccctt	gtatgtgatt	ttcctggata	gcactctgtta	11069231
catcttcaca	aagataaaaa	gtcagacttg	gctgggcatg	gtggctcaca	11069281
cctgtaatcc	cagcactgag	aggctgaggg	aggcagatca	cttgaggtca	11069331
ggaatttgag	accaggctgg	gcagcatggt	gaaaccccg	ctctacaaaa	11069381
aatacaaaaa	ttagccgggt	gtggtgtcac	gcacctgtat	tccaagctca	11069431
ctcaggaagc	taaggcagga	gaatcacttg	aaccagagg	tggagggttt	11069481

cagtgagttg	agattgtgcc	attgcactcc	agcctgggcg	acagagtgag	11069531
actctgtgtc	aaaaataaaa	taaaataaaa	ttttaaaaaa	ggcagatttt	11069581
tttttcttct	tggtattgtt	accttattat	agtaataata	agtgcatagt	11069631
gcatgctgag	ataagcaatc	ataatttgtt	attgcggccg	ggcatggtgg	11069681
ctccagccta	taatcccagc	acttttggta	ggagttcaag	gccagcctgg	11069731
ccaatatagt	gaaactccat	ctctactaaa	atacaagaaa	ttacctgggc	11069781
atgggtggcag	ttgctggtga	tccccagcta	cttgggaggc	tgaggcagga	11069831
gaatcgcttg	aacctgggaa	gcagaggttg	cagtgagcca	agattgcacc	11069881
actgcactcc	agcctgggtg	acagagttag	actctgtctg	aaaataataa	11069931
taataataat	ttgttattgc	ttttattgcc	ttagtttaca	tagggaatca	11069981
aagttttatac	tttgatttat	aaaagttgct	ttgattctag	ttcacagaac	11070031
cagaatcttt	tataaaaagg	tatttagagg	ccagtggtgg	tggtctcatgc	11070081
ctgtaatccc	agcatattgg	gaggctgagg	agggaggatc	acttttaggag	11070131
tttgaggcca	gcctaggcaa	catagtgaga	ccttgtctct	acaaaaaatt	11070181
ccaacattag	ctgggcatgg	tggcatgtgc	ctgtagtccc	atatttttgg	11070231
ggggctgagg	caggaggatc	acttgagccc	acgaggttca	atccaggttg	11070281
cagtaagcca	tgatcctgcc	actgcactcc	agtttgggta	acagagcgaa	11070331
gctatgtctc	aaaaaaaaga	aaaaaaaagta	ttctaaatcc	aaattttaata	11070381
tataaaaacta	aatgcaggcc	aagtgtggtg	gcatatacct	ataatcacaa	11070431
cacttttggga	ggctgagggtg	ggaggattgc	ttgagcccaa	gagttcaaga	11070481
ccagcctagg	taacacagta	agaccccatc	tctacaaaaa	gtagaaaaat	11070531
tagcctggca	tggtggtgag	tgcttttaat	cccaactact	tagggggctg	11070581
agatgggaag	attgcttgag	cctcagagtt	tgaggctgca	gtgggccctg	11070631
atcgctccac	tgatcgctct	aaagttagac	cctgtctcaa	aaaaaaaaga	11070681
aatagaagaa	attcaataag	actttgatct	cttttccaag	11070731	
gtgtaaatat	attttgggaa	attttccagt	tactttgttc	tcatttttaat	11070781
gtaataatct	aagtcttggt	tttctaagga	aaagttttct	cttattatat	11070831
cttttgtaa	tgtttctctc	ccatttcttt	tgatctgatc	ttcagataca	11070881
tgattatctt	cactgctaaa	tttgtgttct	ctggcctcta	cattttataat	11070931
ttctcataat	tctttatcta	agtatttctt	ccctacctac	tgaagaaaac	11070981
tcaagttttc	ttccacctta	atgattatgc	tgtgtctgtg	agttttcttc	11071031
atgactcttt	acagtacaag	ttttttgttt	ttgttttttt	aatggtcaga	11071081
tggtatagaac	aacacagggtt	ttgtttgttt	tgtttttaact	tttaaaaaaa	11071131
ttataataga	taaaggggtct	cactacgttg	tccaggctga	tctcatactc	11071181
ctgggctcaa	gcaatccacc	cacctctgcc	tcccaaagtg	ctgggattac	11071231
agtcatgagc	caacatgcct	gggcagtaca	ggtttttttt	gagacggagt	11071281
tttgttcttg	ttgccgaggc	tggagtgcac	tggcacatc	ttggctcacc	11071331
acaaagtctg	ctcccagggt	tcaagtgatt	ctcctgcctc	agcctcctga	11071381
gtagctggga	ttacaggcat	gtgccaccac	gcccagctaa	ttttgtattt	11071431
ttagtagaga	cgggggtttca	ccatgttggc	caggctgggt	tccaactgct	11071481
gacctcaggt	gatctgcca	cctcggcctc	ccaaagtgct	gggattacag	11071531
gcatgagcca	ccatgccag	ctgtagtaca	ggtttttaata	tgctaaatac	11071581
tcttcctttc	tttattaatg	tgcattggaag	ttctaataat	tttttcccat	11071631
accccagaga	gtccatattt	tggaaatcac	aacactagcc	tttgttgaca	11071681
agtgtctctc	ttgggttcct	tctttgtgtc	ctccactgaa	ttttgggggt	11071731
cataaaattt	catttgttgt	gcttgcttaa	ttccctggga	atcagactgt	11071781
tcttgatcgg	atgacatttc	tggtaatttc	tttagttggc	aggaaataga	11071831
cacaggaaac	gtggtcagtt	tctgattctg	gcgttgagag	accctttctc	11071881
cttttctctc	ctctcagTGG	GCGACAGATG	cGAAAGAAAC	GAGTTCCAGT	11071931
GCCAAAGACGG	GAAATGCATC	TCCTACAAGT	GGGTCTGCGA	TGGCAGCGCT	11071981
GAGTGCCAGG	ATGGCTCTGA	TGAGTCCCAG	GAGACGTGCT	gtgagtcctc	11072031
tttgggcatg	atatgcattt	atttttgtaa	tagagacagg	gtctcgccat	11072081
gttggccagg	ctggctctga	atttctgggtc	tcaagtgatc	cgctggcctc	11072131
ggcctcccaa	agtgtctggga	ttacaggcac	cacgcctggc	ctgtgacacg	11072181
attcttaacc	cctttttgat	gatggcggct	ggaaaagtgg	ccagtggatt	11072231
ttgatgtatt	caatcatgaa	ttaggagggtg	gggagagaat	gaattatttg	11072281
agctttcctt	aaagccatta	aatggctcta	ttgttttttc	aattgatgtg	11072331
aatttcacat	aacatgaaat	taaccagctc	agtggcatta	atacatctgc	11072381
aatgctgtgt	ggccaccacc	tctatcttgt	tccaaaactt	tgcataacct	11072431
aatgtctttt	tttttttttt	tttttgagac	ggagtctcgt	tccatcaccc	11072481
aggctggagt	gcagtgggtg	gatctcagct	cactgcaacc	tccgcctccc	11072531

ESONE

2

Intr.

2

aggttcacgc	catcctcctg	cctcagcctc	ccgagtagct	gggactacag	11072581
gcaccctcca	ccacatccgg	ctaatttttt	gtatcttttag	tagagatggg	11072631
gtttcaccaat	gtagccggg	atggtctcga	tctcctgacc	tcgtgatcca	11072681
cctgcctccg	cctcccaaag	tgctggcatt	acaggcgtga	gccaccatgc	11072731
ccggcctatt	ttttttttta	agagatggag	tctaattctg	ttgccaggc	11072781
tggagtccag	tggtagcatc	atacttccact	gcagccttga	cctcttgggc	11072831
tcaagtgatt	ctcttgcttc	gaactcccaa	agtattggga	ttacagggtg	11072881
gagccaccgc	actcagccta	atgtccagtt	tttaacaagc	tccatttaaa	11072931
tgccctccgt	tttgaccat	aaaggggtag	gcttggccgg	gcacaatggc	11072981
ttgtgtctgt	agtcccagct	acttgggagg	ctgaggcaga	aaggcagaaa	11073031
gattgcttta	taaagcccag	gagtttgagg	gccacctggg	tggcatagct	11073081
agacctcatc	tctaaaaaat	aagtaataaa	taaataattg	tttttgtttt	11073131
tttctttttt	ttttcttttt	tttttttttt	tgagacggag	tcttgctctg	11073181
ttgccaggc	tggagtgcag	tggcgcgatc	tcagctcact	gcaagctgtg	11073231
cctcctgggt	tcatgccatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gtagctggga	11073281
ctacaggcgc	ccactaccac	gcccagctaa	ttttttgtat	ttttagtaga	11073331
gatgggggtt	caccacgtta	gccaggatgg	tctcaatctc	ctgacctcgt	11073381
gatccgcag	cctttggcctc	ccaaagtgtt	gggattacag	gcgtgagcca	11073431
ctgagcccg	cccatatgta	tgtatatata	tattttttta	aatgggaga	11073481
ccaggcatgg	tggctcatgc	ctagaatccc	agcacttttg	gaagctgagg	11073531
taggcggatc	acttgaggcc	atgagtttga	gaccagcctg	ctcaacatga	11073581
tgaacttct	atctctacta	aaaaaaaaag	tgggattagg	tcaggcacgg	11073631
tggctcacac	ctgtaatccc	agcactttca	gaggccgagg	caggaggatc	11073681
atgaggtcag	gagatcgaga	ccatcctggc	taacacgggt	aaaccccgtc	11073731
tctactaaaa	aaatacaaaa	aattagccag	gcgtggtggc	gggtgcctgt	11073781
agtcccagct	actcaggagg	ctgaggcagg	agaatggcgt	gaacccggga	11073831
ggcggagctt	gcagtgagcc	aagatcgtgc	cactgtactc	cagcctgggc	11073881
gacagagcaa	gactctgtct	caaaaaaaaa	aaaaaaagtg	ggattgacat	11073931
tctcttcaaa	gttctgggg	tttcctttgc	aaagacagga	ttggcaaggc	11073981
cagtgggtct	tttttgtgtg	tgtgtgtgtg	acggagtctc	actctgccac	11074031
ccaggctgga	gtgcaatggc	aggatctcgg	ctcacgcaa	cctcctcctc	11074081
ccaggttaaa	gtgatttccc	tgccctcagc	tcccagtag	ctgggactac	11074131
aggtgcccgc	caccacaccc	aactaatttt	tgtattttta	gtagagacag	11074181
ggtttacta	tattggccag	gctggctctg	aacccctgac	ctcacgtgat	11074231
ccacccgcct	tggcctccca	aagtgcctgg	attacaggcg	tgagccactg	11074281
tgctcggcct	cagtgggtct	ttccttttag	tgacagttca	atcctgtctc	11074331
ttctgtagTG	TCTGTACCT	GCAAATCCGG	GGACTTCAGC	TGTGGGGGCC	11074381 ESONE
GTGTCAACCG	CTGCATTCT	CAGTTCCTGA	GGTGCGTAGG	CCAAGTGGAC	11074431 3
TGCGACAACG	GCTCAGACGA	GCAAGGCTGT	Cgtaagtgtg	gccctgcctt	11074481
tgctattgag	cctatctgag	tcctggggag	tggtctgact	ttgtctctac	11074531 Intr.
ggggtcctgc	tcgagctgca	aggcagctgc	cccgaactgg	gctccatctc	11074581 3
ttgggggctc	ataccaagcc	tcttccgccc	ttcaaattccc	cccttgacca	11074631
ggaggcatta	caaagtgggg	atggtgctac	ctcttcgggt	ttgtcacgca	11074681
cagtcaaggga	ggctgtccct	gccgagggct	agccacctgg	cacacacact	11074731
ggcaagccgc	tgtgattccc	gctggtcgtg	atccccgtga	tcctgtgatc	11074781
ccgccccgt	gaggctgaac	acatagtga	gcttgctagc	caagcctcaa	11074831
tgacccacgt	aacatgaagg	gggaaaagcc	agaaagtctc	gccaaggagc	11074881
aaggccaaga	atcccgaagg	gaaatggact	ttgaagctgg	gcgtcttctt	11074931
ggctgtctta	atacaagtgg	cacatccaaa	tccaaaaccc	cgaatttcaa	11074981
agtcttgagc	acccgaaatt	ctgaaacgtc	ttgagcactg	accttttagaa	11075031
ggaaatgctt	attggagcat	tttgatttct	ggatttttct	caactgagtg	11075081
ggagtcctaa	ttaggaaaaa	aaccaggctg	accgaaccaa	aggaaaagcaa	11075131
taaaagaagg	cagatagggt	caggcacggg	ggctcacccc	tgtaatccca	11075181
gccttttgag	aggctgaggc	gggtggatca	cttgagggtc	ggagttcgag	11075231
agcagcctgg	ccaacacggg	gaaaccccat	ctctactgaa	aatacaaaaa	11075281
ctagccagggt	atggtggcgt	ctgcctgtaa	tcccagctac	tcgggaggct	11075331
gagacaggag	aatcacttga	acctgggagg	cagaggttgc	agtgaagcaa	11075381
tatcacgcca	ttgcactcca	gcctggggga	caagagcgaa	attctgtctc	11075431
aaaaaaaaag	aagaagaagg	ccgacaaaact	atgtaactct	gcctttctcc	11075481
atggtccaga	acacacagcc	ctcctgcgta	aataactcct	tatcttccctg	11075531
ctcccagcta	tcatcagaca	cctcggctga	tagaaaattg	caagttagct	11075581

cactgcaacc	tccggcattat	aagtactgca	caaagccctc	ttcagcgcac	11075631	
agcacaagca	ccattctata	aaatctccag	caagcggcca	ggtgcagtgg	11075681	
ctcatacctg	taatcccagc	attttgaggag	actgaggcgg	gcggatcacc	11075731	
tgaggtcagg	agtttgagac	cagcctggcc	aacatggtga	aaccccgctc	11075781	
ctattaaaaa	tacaaaaaaa	ttagccaggc	gtggtggcag	gtgcctgtaa	11075831	
tcccagctac	ttggaaggct	gaggcaggag	aatcgcttga	acccgggagg	11075881	
tggaagtgtc	agtgaagccg	gatcttgcca	tgcactcca	gcctggggga	11075931	
caagagttag	acttcgtctc	aaaaaaaaaa	aaaaaaattc	ccagcaagcc	11075981	
tttgtcttct	ggcagtcagc	tcctctcttg	ctgacctgct	cattgctttc	11076031	
ttgcaaggta	ttttcctacc	tactttctgg	aataaatctg	tctttctgta	11076081	
cttacaacta	ccttttttaa	aattttctttc	ttttttgaga	tggagtctca	11076131	
ctctgttttc	ccaggctgga	gttcagtggg	gcaatctcag	ctcactgcaa	11076181	
cctctactta	ctgggttcaa	gcgattctcc	tgcctcagct	tcccagtag	11076231	
ctgggattac	aggcgtgcac	cagcacgcag	gctaattttt	gtatttttag	11076281	
tagagacggg	gtttcaccat	gttggccaag	gtggtcttga	actcctgacc	11076331	
tcaagtgtat	ctcccacctc	agcctcccaa	agcgctagga	ttacggccat	11076381	
gagccactga	ggcgggctgc	acctacaact	gtcttgataa	attcttacct	11076431	
ccaccacct	ggtccagata	gtcagtgtc	accacaaca	ttaaggatat	11076481	
tccaaatttg	aaacattcca	aaatcagaaa	aatattccaa	ctctgaaaat	11076531	
attccaaaat	ccaaaaaaat	tcaaaatcca	aaacacttct	ggtcccaagc	11076581	
attttagaga	agggatactc	aacccaaaat	aaggacagca	attctataaa	11076631	
ttgtgctacc	atcttgacag	tctcagttta	acagctttac	acctattagc	11076681	
gcaccagtgc	tcatagcagt	gctgggaaat	gtgtacagat	gaggaaactg	11076731	
aggcaccgag	agggcagtgg	ttcagagtcc	atggccctcg	actgctcccc	11076781	
agcccgcctt	tcagggggcc	tggcctcact	gcggcagcgt	ccccggctat	11076831	
agaatgggct	ggtgtttggg	gacttcacac	ggtgatgggtg	gtctcggccc	11076881	
atccatccct	gcagCCCCCA	AGACGTGCTC	CCAGGACGAG	TTTCGCTGCC	11076931	ESONE
ACGATGGGAA	GTGCATCTCT	CGGCAGTTCG	TCTGTGACTC	AGACCGGGAC	11076981	4
TGCTTGGACG	GCTCAGACGA	GGCCTCCTGC	CCGGTGCTCA	CCTGTGGTCC	11077031	
CGCCAGCTTC	CAGTGCAACA	GCTCCACCTG	CATCCCCCAG	CTGTGGGCCCT	11077081	
CGCAACAAGA	CCCCGACTGC	GAAGATGGCT	CGGATGAGTG	GCCGCAGCGC	11077131	
TGTAGGGGTC	TTTACGTGTT	CCAAGGGGAC	AGTAGCCCCCT	GCTCGGCCTT	11077181	
CGAGTTCCAC	TGCCTAAGTG	GCGAGTGCAT	CCACTCCAGC	TGGCGCTGTG	11077231	
ATGGTGGCCC	CGACTGCAAG	GACAAATCTG	ACGAGGAAAA	CTGCGgtatg	11077281	
ggcggggcca	gggtgggggc	ggggcgctct	atcacctgtc	cctgggctcc	11077331	Intr.
cccagggtgtg	ggacatgcag	tgatttaggt	gccgaagtgg	atttccaaca	11077381	4
acatgccaaag	aaagtattcc	catttcatgt	ttgtttcttt	tttttctttt	11077431	
ctttctttat	tttgtttttg	agatggagtc	tcactctgtg	atttttttca	11077481	
tctctaaaat	tctacatcc	atatggccac	catgaggccc	caggctggcc	11077531	
gatggttgct	gttagcttat	tgggaaatca	ctgtttggaa	ggtgctggtt	11077581	
gttttttggt	gtttgttggt	tttgtttttg	tttttggttt	gagacggagt	11077631	
ctcgctctgt	cgccagggtg	gagtgcagtg	gcgcgatcag	ctcactgcaa	11077681	
cctccgcttc	ctgggttcaa	gccattctcc	tgcctcagcc	tcccaagtag	11077731	
cgcgattac	aggcatgtgc	caccacctcc	ggctattttt	ttttctattt	11077781	
agtagagatg	gggtttcacc	atgttagtca	ggctgggtcat	gaactcttga	11077831	
cctcagggtga	tccaccgcc	tggcctccc	aaagtgtctg	gattacaggc	11077881	
gtgcactgct	gcaccagcc	tttttttggt	tttttgagac	agggtcttgc	11077931	
tgtcaccag	gttgaagtaa	ggtggcacga	ttatggctca	ctgcggcctt	11077981	
gatctccttg	gctcaagcga	tcctctcact	tcagcctctc	aagcagttgg	11078031	
aaccacaggc	tgtaccacca	agcctggcca	atttttttgt	acagacacag	11078081	
cgtggtcttg	agctaccagg	ctcaagcaat	cctcctgcct	tggcctccca	11078131	
aagtgcctgg	attccaggca	tgagccgctg	caccgcgcaa	aaggccctgc	11078181	
ttctttttct	ctggttgtct	cttcttgaga	aaatcaacac	actctgtcct	11078231	
gttttccagc	TGTGGCCACC	TGTGCGCCTG	ACGAATTCCA	GTGCTCTGAT	11078281	ESONE
GGAAACTGCA	TCCATGGCAG	CCGGCAGTGT	GACCGGGAAT	ATGACTGCAA	11078331	5
GGACATGAGC	GATGAAGTTG	GCTGCGTTAA	TGgtgagcgc	tggccatctg	11078381	
gttttccatc	ccccattctc	tgtgccttgc	tgccttgcaa	tgatttgtga	11078431	Intr.
agccagaggg	cgcttccttg	gtcagctctg	caccagctgt	gcgtctgtgg	11078481	5
gcaagtgaact	tgaacttctca	gagcctcact	tccttttggt	ttgagacgga	11078531	
gtctcgctct	gacaccaggg	ctggagtgtc	gtggcacaa	cacagctcac	11078581	
ggcagcctct	gcctctgatg	tccagtgtat	ctcctgcctc	agcctcccga	11078631	

gtagctgaga	ttaaaggcgt	ataccaccac	gcccggctaa	ttttttgtat	11078681
ttttattaga	gacagggttt	ctccatgttg	gccaggctgg	tcttgaactc	11078731
ctggtctcag	gtgatccacc	cgccctcgcc	tcccaaagtg	ctaggattac	11078781
aggtgtgagc	cactgcgcca	ggcctaattt	ttttgtattt	ttagtagaga	11078831
tgcggttttg	ccatattgcc	caggctggtc	tcgaactcct	gggctcaagc	11078881
gatctgcctg	ccttggcctc	ccaaagtgtc	gggattacag	gcacaaacca	11078931
ccgtgcccga	cgcgttttct	taatgaatcc	atgtgcatgc	gttcttatgt	11078981
gaataaacta	ttatatgaat	gagtgccaa	caaactgagg	ctcagacaca	11079031
cctgaccttc	ctccttcttc	tctctggctc	tcacagTGAC	ACTCTGCGAG	11079081
GGACCCAACA	AGTTCAAGTG	TCACAGCGGC	GAATGCATCA	CCCTGGACAA	11079131
AGTCTGCAAC	ATGGCTAGAG	ACTGCCGGGA	CTGGTCAGAT	GAACCCATCA	11079181
AAGAGTCCGg	tgagtctcgg	tgcaggcgcc	ttgcagagtt	tgtggggagc	11079231
caggaaaggg	actgagacat	gagtgcgtga	gggttttggg	aactccactc	11079281
tgcccaccct	gtgcaaaggg	ctcctttttt	catttttgaga	cagtctcgca	11079331
cggtcgccca	ggctggagcg	caatggcgcg	atctcggttc	actgcaacct	11079381
ctgcctccca	ggttcaagtg	attctcctgc	ctcagcctcc	tgagtagctg	11079431
ggattacagg	cgcccaccac	caagcccggg	taattttttg	tatgtttagt	11079481
agagatgggg	tttccactatg	ttggccaggc	tggtgttgaa	ctcctgacct	11079531
catgatccgc	ccacttcggc	ctcccaaagt	gctgggatta	caggcgtgac	11079581
ccaccccatg	aaaaaaaaatt	aaaaaatgaa	gcgatgctgg	gcgcggtgga	11079631
tcacgcctgt	aatcccagca	ctttgggaag	ctgaggcagg	cagatcacga	11079681
gggcaggaga	ttgagaccat	cctggctaata	acggtgaaac	cccatctcta	11079731
ctaaaactac	aaaaaattag	ccgggtgtgg	tggcaggcac	ctgtgatccc	11079781
agctactcag	gaggctgagg	caggagaatc	gcttgaaccc	aggaggtgga	11079831
ggttgcagtg	agccgggatc	acaccattgc	actccagcct	gggtgacaga	11079881
gtgagactct	gtctcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaagcg	aattctgaaa	11079931
tacatgaatt	cttttcctta	gatgcctgct	tctgtcttga	ggtttgttgt	11079981
tgttatttct	aaacagagtc	ttgctctgtc	gctcaggctg	gagtgcagtg	11080031
gcatgatctt	ggctcaccac	aacctccggc	tcccaggttc	aagcgattct	11080081
tctgcctcag	cctcctgagt	agctgggatt	acagctgaat	gccaccttgc	11080131
tgggctaatt	tttgtatttt	tagtagagat	ggggtttcac	catgttggcc	11080181
aggctggcct	cgaactcctg	acctcgagtg	atctgcccg	ctcctgaagt	11080231
gctgggatta	caggcgtgag	ccacctcgtc	ctggtgaggg	tttttttttt	11080281
tccccaaccc	tctgtggtgg	atactgaaag	accatattag	gataactgta	11080331
cagtatagag	aaggcagtg	caagttttct	ctgtcatata	ccagagtggg	11080381
cttgggcatg	gtggcatact	cctgtagtct	cagctaata	ggaggctgag	11080431
gaaggaggat	cgcttggggc	caggagtgtg	agactgtagt	gagctgtgat	11080481
cacaccacca	cacttcaatc	tgggcaacag	agcaagagac	cctatctcta	11080531
aaaaaaagta	agtatttctg	acactgtggg	ccatacggtc	tctggtgcag	11080581
tttctcaaca	tggctgttgg	gtgaacacaa	ccacgcacag	aacgcaaacc	11080631
aatacacgtg	gctgtggggc	cagaaaatgt	tatttatgga	cacaaaaatt	11080681
ggaatttcat	ataactgttt	tgtgtcatga	aatgatttct	cctttttatt	11080731
tttatttttc	ttctcaagta	tttaaataatg	taaaagccat	ttttaggcct	11080781
ggcaggatgg	ttcacagctg	taatcccagc	actttgggag	gtcgaggcgg	11080831
gaggatcacg	aggtcaggag	atcgagacca	tctggcccaa	cacagtgaag	11080881
ccccgtctct	actaaaaata	caaaaaatta	accaggcttg	gtggcgcgcg	11080931
tctgtagtcc	cagctgctca	ggaggctgag	gcaggagaat	cgcttgaatg	11080981
caggaggcgg	aggttgtagt	gagccgaggt	tgcaccactg	cactccagcc	11081031
tgagcgacag	agtgagagtc	cgccctcaaac	aaaaaaatgt	ttgcccctgc	11081081
tggctctgaa	ctcctgggct	caagctatct	gcctgccttg	gtctcccaaa	11081131
gttctgggat	tacaggcatg	agctacagcg	cccgactttt	tgttgtttta	11081181
tatctatata	tctatataata	acttgtttta	tgtatatata	taacttgttt	11081231
tatatatata	cataaactgc	agtaaaaaac	atgtaacata	aaatttacct	11081281
tctcaaacct	tattaagtgc	acagttctgt	gccattagca	aattcacact	11081331
gttggtacaac	atcacaacca	ccatctccag	aacttttttt	ttttttttta	11081381
ttctttttga	gacagagtct	cactcgctcg	acgggctgga	gtgcagtggt	11081431
gcgatctcgg	ttcactgcaa	cctccacctc	ccaggttcaa	gcaattctcc	11081481
tgcctcagcc	ccctcagtgc	ctgggattac	aggtgcccgt	cctaccacgc	11081531
ccagctaatt	tttgtatttt	cagtagagac	tgactgggtt	tcaccatgtt	11081581
ggccaggctg	gtctcgaact	cctgacctca	agtgatcctc	ccacctcagc	11081631
ctcccaaagt	gctgggaata	caggcatgag	ccactgcg	cggccccaga	11081681

ESONE

Intr.

6

actcttttat	cttcccaaac	tgaagctctg	tcccatgaa	acactcactc	11081731		
tccatccctt	ccccaaactc	tggcaccac	cattctactt	tctgtcccta	11081781		
tgaatgtgat	ggctctaggg	acctcctctg	agtggaaatca	gacagcattt	11081831		
tccttttttg	actggcttat	ttcactgagc	caagtgcggg	ggcacacgcc	11081881		
tgtaatccca	aaacttttgg	agaccgaggc	gggcgcatca	cctgagggtca	11081931		
ggagttcgag	accagcccgg	ccaacatggt	gaaaccccat	ctctagtata	11081981		
aatacaaaaa	attagcctgt	catggctcgt	gggtgcctgta	atcccagcta	11082031		
agtgggaggg	tgaggcagga	gaatcgcttg	taccagaggag	gcggaggtcg	11082081		
cagtgcgagc	agatcgctgc	attacactcc	agcctgggca	acaagagtga	11082131		
aactccgtct	ctcctaaaaa	tacaaaaaaa	ttagctgggc	atgggtggcac	11082181		
atgcctgtag	tcccagctac	ttgggaggtc	gaggcaggag	aatcacttga	11082231		
acccgggagg	tggaggttgt	aatgagccaa	ggttggcgcc	gaagggatgg	11082281		
gtagggggcc	gagagtgcac	agtctgcctc	ccctggccct	gcgcagGGAC	11082331	ESONE	
CAACGAATGC	TTGGACAACA	ACGGCGGCTG	TTCCACGTC	TGCAATGACC	11082381	7	
TTAAGATCGG	CTACGAGTGC	CTGTGCCCCG	ACGGCTTCCA	GCTGGTGGCC	11082431		
CAGCGAAGAT	GCGAAG	gtga	tttccgggtg	ggactgagcc	ctgggcccc	11082481	Intr.
tctgcgcttc	ctgacatggc	aaccaaacc	ctcatgcctc	agtttcccca	11082531	7	
tctgttaagt	gtgcttgaaa	gcagtttaga	gggtttcatg	agattccacc	11082581		
tgcatggaaa	actatcattg	gctggccaga	gtttcttgcc	tctggggatt	11082631		
agtaattaag	aaatttcagg	ccgggtgcgt	aatccctgta	atcccaacac	11082681		
cttgggacgc	cgaggcgggc	agatcacctg	aggctcggag	ttccagacca	11082731		
gcctgacca	catggagaaa	ccccgtctct	actaaaaata	caaaattagc	11082781		
cgggcttggt	gggtgcctgc	tataatccca	gctactcagg	aggctgaggc	11082831		
aggagaatca	cttgaacctg	ggaggtggag	gttgtggtga	gccaagatcg	11082881		
tgccattgca	ctccagcctg	ggcaacaaga	gtgaaactcc	atccaaaaaa	11082931		
aaaagaaaaa	aaaagaaaaa	aaagaaaaa	aatttcagct	gacacagctt	11082981		
cacactcttg	gttgggttcc	cgtggtgaat	gatgaggtca	ggtgatgact	11083031		
ggggatgaca	cctggctgtt	tccttgatta	catctcccga	gaggctgggc	11083081		
tgtctcctgg	ctgccttcga	aggtgtgggt	tttggcctgg	gccccatcgc	11083131		
tccgtctcta	gccattgggg	aagagcctcc	ccaccaagcc	tctttctctc	11083181		
tcttccagAT	ATCGATGAGT	GTCAGGATCC	CGACACCTGC	AGCCAGCTCT	11083231	ESONE	
GCGTGAACCT	GGAGGGTGGC	TACAAGTGCC	AGTGTGAGGA	AGGCTTCCAG	11083281	8	
CTGGACCCCC	ACACGAAGGC	CTGCAAGGCT	GTGG	gtgagc	acgggaaggc	11083331	Intr.
ggcgggtggg	ggcgccctca	ccccttgacg	gcagcagtg	tgggggagtt	11083381	8	
tcactcctctg	aactttgcac	agactcatat	cccctgaccg	ggaggctgtt	11083431		
tgctcctgag	ggctctggca	ggggagctctg	ccgccctgtt	aggacttggg	11083481		
cttgccaggg	ggatgcctgc	atatgtccta	gtttttggga	atatccagtt	11083531		
aacggaacc	tcagccctac	tggtggaaca	ggaaccggct	ttcctttcag	11083581		
ggacaacctg	ggaggtgact	tcaaggggtt	aaagaaaaaa	aattagctgg	11083631		
gcattggtgcc	acacacctgt	gggtcccagct	actcagaagg	ctgaggcggg	11083681		
aggattgctt	gagggcagga	ggattggttg	atcctccac	ctcagcctcc	11083731		
ggagtagctg	ggacctcagg	tgcatgccac	tatgcctggc	taattttctt	11083781		
ttttcttttt	tttttttttt	cgagacggag	tctcgctctg	ttgcccaggc	11083831		
tggagtgcag	tggcaggatc	tcggctcact	gcaagctccg	cctcccgggt	11083881		
tcacgccatt	ctcctgcctc	agcctcccca	gtagctggga	ctacaggagc	11083931		
ccgccactgc	accaggccaa	tttttttgta	tttttagtag	agacgggggt	11083981		
tcactgtgtt	agccaggatg	gtctcgatct	cctgacttcg	tgatccgccc	11084031		
acctcggcct	tccaaagtgc	tcggattaca	ggcgtgagcc	actgcgccc	11084081		
gccgctaatt	ttcatatttt	tagtaaaaaa	agggtttcac	catgttggcc	11084131		
aggctagtct	tgaattcctg	aacccaagtg	atcctcctgc	cttggcctcc	11084181		
caaagtgtctg	ggattacaga	caccacacct	ggctattatt	attttttaga	11084231		
gacaggggtgc	tgctctatct	tccagcctgt	agtgcagtgc	agcctccatc	11084281		
atagctcgct	gcagccttga	cctcctgggt	tcacgtgatc	gtccgcctta	11084331		
agcctctgga	ggagctggga	gtactggcat	gtgccaccat	gcctgggtta	11084381		
tttttttttt	tttttttttg	agacagagtc	tcattctgtc	acccaggctg	11084431		
gagtgccgtg	gtgcgatctt	ggcttactga	aacctccacc	tcccagggtc	11084481		
cagcaattct	cctgcctcac	ccttctgagt	agctgggatt	acagggtccg	11084531		
gctaccaaac	ctggctagtt	tttgatgtt	tagtagagac	agggtttcac	11084581		
catgttggtg	aggctggtct	cgattctccc	gcctcagcct	cccaaagtgc	11084631		
tgggattaca	ggcttgagcc	accgtgcctg	gctttttttt	tttttttttt	11084681		
ttttgtggca	ataaggtctc	attgtcttgc	ccaggctagc	cttatgctcc	11084731		

tagcctcaag	tgatcctcct	ccctcagcct	cccaaagtgc	tgggattaca	11084781	
ggtgggcgcc	actgtgcctg	ttcccgttgg	gaggtctttt	ccaccctctt	11084831	
tttctgggtg	cctcctctgg	ctcagccgca	ccctgcagga	tgacacaagg	11084881	
ggatggggag	gcactcttgg	ttccatcgac	gggtcccttc	tgaccccttg	11084931	
acctcgctcc	ccggaccccc	agGCTCCATC	GCCTACCTCT	TCTTCACCAA	11084981	ESONE
CCGGCACGAG	GTCAGGAAGA	TGACGCTGGA	CCGGAGCGAG	TACACCAGCC	11085031	9
TCATCCCCAA	CCTGAGGAAC	GTGGTCGCTC	TGGACACGGA	GGTGGCCAGC	11085081	
AATAGAATCT	ACTGGTCTGA	CCTGTCCCAG	AGAATGATCT	GCAGgtgagc	11085131	Intr.
gtcgccctcg	cctgcagcct	tggcccgcag	gtgagatgag	ggctcctggc	11085181	9
gctgatgcc	ttctctcttc	ctgcctcagC	ACCCAGCTTG	ACAGAGCCCA	11085231	ESONE
CGGCGTCTCT	TCCTATGACA	CGTCTATCAG	CAGaGACATC	CAGGCCCCCG	11085281	10
ACGGGCTGGC	TGTGGACTGG	ATCCACAGCA	ACATCTACTG	GACCGACTCT	11085331	
GTCCTGGGCA	CTGTCTCTGT	TGCGGATACC	AAGGGCGTGA	AGAGGAAAAC	11085381	
GTTATTTCAGG	GAGAACGGCT	CCAAGCCAAG	GGCCATCGTG	GTGGATCCTG	11085431	
TTCATGGgtg	cgtatccacg	acgctgaggg	ctgcagaggg	aatggaggga	11085481	Intr.
gcaggaagga	gcttcaggaa	ctggttagtg	ggctgggcat	ggtggctcaa	11085531	10
agcacctgta	atcccagcac	tttgggaggg	caaggtgggt	ggatcatcaa	11085581	
gaccagcctg	accaacatgg	tgaacctcg	tctctactaa	aaatacaaaa	11085631	
attagccggg	tgtggtgggtg	ggcacctgta	atcccagctg	ctcgggaggg	11085681	
tgaggcagga	gaatcacttg	aacctgggag	atggaggttg	cagtgaacca	11085731	
agacagcccc	actgcactcc	agcctgggtg	acagagtga	actccgtctc	11085781	
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaacta	aacaaaaaac	tgggttagtg	ctagacaaca	11085831	
ggatggtatc	ttccaagccc	atggctgact	cagcagctcc	tgggtcaaga	11085881	
cactgtgacc	tgtgtccct	ggcaggaagc	atcgccctg	ccacctgccc	11085931	
ggtgtactct	gtactgtca	ggtgacatct	gctacctaag	cacgtgagag	11085981	
gtggcatttc	acagtttcag	tgtggtgctg	acaacccggg	acgcacactg	11086031	
tccttgacgc	tacaatcagg	aggtgaatgt	tgggtttcca	gcagagaaca	11086081	
ctggagaagg	cacacttggg	gtctggaagg	gaaaagcagg	gaagagagca	11086131	
tcacagatg	cctgcgggtg	aaggtgggcc	cgctatggcc	agcgtccctt	11086181	
tttattttta	tttattttatt	tatttgagat	ggaatctcgc	tctgtcgccc	11086231	
agactgtagt	gcagtgggtg	gatcacggct	cactgcaagc	tccgcctcac	11086281	
aggttcacgc	cattctcctg	cctcagcctc	ccgagttagt	gggactacag	11086331	
gcacccgcca	ccacgcccgg	ttaatttttt	gcatttttat	tagagacggg	11086381	
gtttcaccgc	gttagccagg	atggtctaaa	tctcctgacc	ctgtgatcca	11086431	
ccgcctcgg	cctccctaag	tgcttgatt	acaagcgtga	gccaccacgc	11086481	
ccggccccc	ttttattttt	tattttttga	gacggagtct	cgctctgtcg	11086531	
cccaggctag	attgcagtgg	cgtgatctcg	gctcactgca	gcctccgcct	11086581	
cccaggttca	agtgtattct	ctgcctcaac	ctcccaacta	attaggatta	11086631	
caagcatgta	ccaccattgc	tgactaattt	tttgtatttt	tagtagagac	11086681	
tgggtttcac	catgttggct	aggctgggtc	cgaaccctta	gcctcaagta	11086731	
atctgcctgc	ctcagcctcc	caaacagcgg	ggattacagg	catgagccac	11086781	
tgtgcccac	ccaaccctgg	atctctttta	aacaagacaa	tgtcgtgtgt	11086831	
tgccacagaa	caatgggtgg	ggtacatgtg	gcccagtgtg	tttgccaca	11086881	
taactgccag	gccagaggga	aagagactct	cagactgtct	ccactcagat	11086931	
acaaatgtgt	gtgttgtgtg	cgtgtgttct	ggtctcatat	ttgtttgttt	11086981	
tgagacaggg	tgtcgtctg	tcactgagtc	tggagtgcag	tggcgcaatc	11087031	
agagttcact	gcagcctcaa	actcttgggc	tcagtgtgatt	ctcccacttc	11087081	
agcctcccaa	gtagctggaa	ctacaggtga	acaccactgt	gccagctaa	11087131	
tttattttat	ttttagtaga	gatgaggtct	cactatgttg	cccaggctgg	11087181	
tcttgacctc	ctagcctcaa	gcaatcctcc	tgccttggtc	tcccaaagtg	11087231	
ctgggattac	acgtgcgagc	cattgcgcac	ggcttgtgtt	cttgtgtttc	11087281	
ttcctttttc	tttcgagatg	gcgtctcagt	ctgccaccca	ggctggagtg	11087331	
cagtgggtgtg	atcatagctc	actgtagcct	caacttcctg	ggctcaagca	11087381	
atcctcttga	tttcagcctc	ccgggcctgg	ccagcatggt	gaaaccccg	11087431	
ctctactaaa	aatacaaaaa	tgtagccagg	cgtggtggtg	ggcgccctgta	11087481	
atcccagcta	caccagaggc	tgaggcagga	gaatcgcttg	agcctggaag	11087531	
gtggaggttg	gcgaagcca	agatcgtgcc	actgcactcc	agcctgggca	11087581	
acagagacag	actctgtctc	aaaaaaaaaa	aaaacaaacc	caaacaagcc	11087631	
acatttggag	tttggggttc	ccagcaggac	tatttcccaa	gcctgagcct	11087681	
ggctgtttct	tccagaattc	gttgacgca	ttggctggga	tcctcccccg	11087731	
ccctccagcc	tcacagctat	tctctgtcct	cccaccagCT	TCATGTACTG	11087781	ESONE

GACTGACTGG	GGAAC TCCCG	CCAAGATCAA	GAAAGGGGGC	CTGAATGGTG	11087831	11
TGGACATCTA	CTCGCTGGTG	ACTGAAAACA	TTCAGTGGCC	CAATGGCATC	11087881	
ACCCTAG	gta	tgttcgcagg	acagccgtcc	cagccagggc	cgggcacagg	11087931 Intr.
ctggaggaca	gacgggggtt	gccaggtggc	tctgggacaa	gcccagctg	11087981	11
ctccctgaag	gtttccctct	ttcttttctt	tgttttttct	ttttttgaga	11088031	
tgaggtcttg	gtctgtcacc	caggctggag	tgcaactggc	caatcgtagc	11088081	
tcactgcagc	ctccacctcc	caggctcaag	tgatcctcct	gcctcaccct	11088131	
cctgagtagc	tgagattaca	gacacgtgcc	accacggcag	actaatttta	11088181	
ttttattttt	gggaagagac	aaagtcttgt	tatgttggcc	tggtctgtct	11088231	
caaactcagg	gtgcaagcga	tcctcccgcc	tcagccttcc	aaactgctgg	11088281	
gattacaggc	gtggggcacc	gtaccagcc	tccttgaagt	ttttctgacc	11088331	
tgcaactccc	ctacctgccc	attggagagg	gcgtcacagg	ggagggggtc	11088381	
aggctcacat	gtgggtggag	ctgctctcc	agggtctttt	ctgctagggtc	11088431	
cctggcaggg	ggtcttctctg	cccggagcag	cgtggccagg	ccctcaggac	11088481	
cctctgggac	tggcatcagc	acgtgacctc	tccttatcca	cttgtgtgtc	11088531	
tag ATCTCCT	CAGTGGCCGC	CTCTACTGGG	TTGACTCCAA	ACTTCACTCC	11088581	ESONE
ATCTCAAGCA	TCGATGTCAA	cGGGGGCAAC	CGGAAGACCA	TCTTGGAGGA	11088631	12
TGAAAAGAGG	CTGGCCCACC	CCTTCTCCTT	GGCCGTCTTT	GAGgtgtggc	11088681	Intr.
ttacgtacga	gatgcaagca	cttagtgtgc	ggatagacac	agactataga	11088731	12
tcactcaagc	caagatgaac	gcagaaaact	ggttgtgact	aggaggaggt	11088781	
cttagacctg	agttatttct	attttcttct	ttcttttttt	tttttttttt	11088831	
gagacagagt	tttgctctcg	tttcccaggc	tggagggcaa	tggcatgata	11088881	
tcggctcacc	gcaacctcca	cctcccagggt	tcaagtgtat	ctcctgtctc	11088931	
aggctcccca	gtagctggga	ttacaggcat	gcaccaccac	catgcccggc	11088981	
taatttttga	tttttagtag	agacggagtt	tctccatggt	ggtcaggctg	11089031	
gtctcgaaact	cccgaacctca	ggtgatctgc	ctgcctcggc	ctcccaaagt	11089081	
gctgggatta	cagacttgag	ccaccgcgcc	cagctatttc	tgttttcttt	11089131	
ctttcttctt	cttctttttt	tttttctaag	agacaggatc	tcactctgtc	11089181	
cccaggcagg	agtgcagtgc	tgtgatcata	gctcactgca	gccttaacct	11089231	
cctgggctca	agtgatcttc	ccacctcagc	ctcccaaagta	gctggaacta	11089281	
cagggtgaca	ccaccatgcc	cagctcattt	ttgtattttt	tttttttttg	11089331	
agacagtctc	gttctgtcac	cccggctgga	gtgcagtggt	acaatcttgg	11089381	
ctcactgcaa	cctctgcctc	ccaggttcaa	gcgattctcc	tgccctcagcc	11089431	
tcctgagtag	ttgagattac	aggcatgtgt	gccatcatac	ctggctgatt	11089481	
tttgattttt	tttttagaga	tgggggtctca	gtatgttgac	caggcttgct	11089531	
ttaaactccc	ggcctcaagt	gatcctccca	cttcagtctc	ccaaagtgtc	11089581	
gggattacag	gcatgagcca	ctgcccggcg	tttgttttct	tttttttttc	11089631	
gttttttggg	gacggaattt	cacctttgtt	gcccaggatg	gagtgcgaat	11089681	
gcacgatata	gcttcaccac	aacctctgcc	tcctgggttc	aaaccatttt	11089731	
cctgcctcag	ccttcttagt	agctgggatt	acaagcatgt	gccaccacgc	11089781	
ccggctgatt	ttgtattttt	agtagagatg	gggtttctcc	atgttggtcca	11089831	
ggctggtctc	gaactcctga	cctcaggtca	ttcgcccacc	tctgcctccc	11089881	
aaagtgtctg	gattacaggc	gtgagccacc	gtgcccgggtg	gtttgtattc	11089931	
tttttactga	gagtcgtgaa	aggcagtgat	cctctgtcac	atgtgatctt	11089981	
ggctctcagg	ggacatttgg	caatttctag	agattttttg	gttgtcacia	11090031	
gtcaatgggg	aagactgttg	gcatttagtg	ggtagaggct	ggtagcgtg	11090081	
ctgaacaccc	agaacaggga	agtagcaggc	cctagataga	gccatcgtgg	11090131	
ggaaaccctg	ctctaaggaa	atggcgctat	tttataaccc	cacgttcctg	11090181	
gcatgattac	caacagccaa	aagtggagtc	cccccaaagt	tgcttcgtcca	11090231	
tttgcatgtc	agtaaaggaa	tagctgaggc	cgggtaattt	ataaagaaaa	11090281	
gagatttaaa	ctgggtatgg	cagtttatgc	ctataatccc	agaactttgg	11090331	
gagctgagg	caggaggatc	gcttgagtcc	aggagtgtga	gaccgagacc	11090381	
agcctggcca	acatgacgaa	actctgtctc	tacaaaaaat	acaaaaagta	11090431	
ggccaggcac	ggtggttcac	gcctgtaatc	ccagcacttt	gggaggccga	11090481	
ggcgggcgga	tcacgaggtc	aggagatcga	gaccatcctg	gctaacacgg	11090531	
tgaacccccg	tctctactaa	aaatacaaaa	acaaaattag	ccgggtgtgg	11090581	
tggcaggcgc	ctgtagtccc	agctactcgg	gaggctgagg	cgggagaatg	11090631	
gcgtgaaccc	gggagggcga	gcttgagtg	agccaagatc	gcgccactgc	11090681	
actccagcct	gggtgaccga	gttgagactc	cgtctcaaaa	aaaaaaaaaa	11090731	
aaaaaaaaaat	acaaaaagta	gccagggtgtg	gtggcaggca	cctgtaatcc	11090781	
tgggttctcg	agaccgaggc	atgagaattg	cctgacccca	ggagggtggag	11090831	

gctgcagtga	gccaagatca	tgccactgca	ctccagcctg	ggcgacagag	11090881
tgggactctg	tctcaaaaaa	caacaaaaaa	aaagtctctg	aaatggatgg	11090931
tgggtgatgt	gatacttcca	caacagcgtg	aatctgctta	aggccaccga	11090981
actgtgcact	cacaaatagt	cgagatggta	cattttatgt	tatgtgtatt	11091031
tcaccacaat	taaaaactag	ttgtggggca	ggtgtggtgg	ttcatgcctg	11091081
taatcccagc	actttgggag	gtcagagggg	ggtggatcat	gaggtcagca	11091131
gttcgagacc	agccaggcca	acatggtgaa	accccatctc	tactaaaaat	11091181
acaaaaatta	gccaggcgtg	gtggcacatg	cctgtagtcc	cagctacttg	11091231
agaggctgaa	gcaggagaa	cgcttgaacc	tgggaggcta	agattgcagt	11091281
gagccgagat	cgtgccactg	cactccagcc	tggacgacag	agtgcagact	11091331
cgtctcaaaa	aaaaaaccaa	aaaaaaaatt	agctgtgggt	caggcactgt	11091381
ggctcagcgc	tgtaatccca	gcactttggg	agaccgaggt	aggtggatgg	11091431
cctgaggtca	ggagtccgaa	tccagcctgg	ccaacatggt	gaaagcccg	11091481
ctctactaaa	aatacaaaaa	attagtccag	tatgttggca	cacctgtaat	11091531
cccagctact	cgggaggctg	aagcaagaga	atcgtttgaa	cccaggaggt	11091581
ggacgttgca	gtgagccgag	attggggccac	tgtactccag	cctgggcaac	11091631
aaaagtga	ctctgtctga	aacaaacaaa	caaacaaaca	aacagacaaa	11091681
caaaaaaact	agttgtggag	agagggtggc	ctgtgtctca	tcccagtgtt	11091731
taacgggatt	tgtcatcttc	cttgctgcct	gttttagGACA	AAGTATTTTG	11091781
GACAGATATC	ATCAACGAAG	CCATTTTCAG	TGCCAACCGC	CTCACAGGTT	11091831
CCGATGTCAA	CTTGTGGCT	GAAAACCTAC	TGTCCCCAGA	GGATATGGTt	11091881
CTCTTCCACA	ACCTCACCCA	GCCAAGAGgt	aagggtgggt	cagccccacc	11091931
cccccaacct	tgaaacctcc	ttgtggaaac	tctggaatgt	tctggaatt	11091981
tctggaatct	tctggtatag	ctgatgatct	cgttctctgc	ctgactccgc	11092031
ttcttctgcc	ccag GAGTGA	ACTGGTGTGA	GAGGACCACC	CTGAGCAATG	11092081
GCGGCTGCCA	GTATCTGTGC	CTCCCTGCCC	CGCAGATCAA	CCCCACTCG	11092131
CCCAAGTTTA	CCTGCGCCTG	CCCGGACGGC	ATGCTGCTGG	CCAGGGACAT	11092181
GAGGAGCTGC	CTCACAGgtg	tggcacacgc	cttgtttctg	cgtcctgtgt	11092231
cctccaactg	ccccctctctg	agcctctctc	tgtcatctctg	tcaaatgggt	11092281
acctcaaggt	cgttgtaagg	actcatgagt	cgggataaac	atacttttct	11092331
tggatggaca	catcagcacc	gggcttgaca	tttaccaggt	tcccccttga	11092381
tgcctgggtt	cctctttccc	ggccccctga	agagggtgatc	tgattttctga	11092431
caggagccct	gagggaggaa	atggtccct	ttgttgactt	ttctttttct	11092481
ttattttttt	cttttgagat	ttgctgtcac	ccagcctgga	atgcagtgg	11092531
gccatcttgg	ctcactgcta	cctctcccac	tgggttcaag	caattctcct	11092581
gcctcagcct	cccaagtagc	tgggattaca	agcatgcgcc	accatgcctg	11092631
gctaagtttt	gtatttttag	tacagacagg	gtttctccat	ggtggccagg	11092681
ctggtcttga	actcctgacc	tcagggtgatc	ctcccacctc	tgcctcccga	11092731
agtgtctaga	ttacaggcat	gagccaccgc	gccccatccc	ctttgttgac	11092781
ttttctcatc	ctctgagaaa	gtctcagttg	aggccagcac	ctccctcaag	11092831
tgaattgaat	ctcccttttg	aacaacaaca	aataacaata	tgaccagac	11092881
gtgggtggctc	acacctgtgg	tcccagctac	tcgggaggct	gaggtgtgag	11092931
gattgcttga	gcccaggagg	tcaaggctac	agagagctat	aatcacacca	11092981
cttactcca	gcctggggga	caaagtga	ccctgtctga	aaaaaacaaa	11093031
aaaagaaaaa	ggaaaaagaa	acaatacgat	cacaaagtag	atattcatag	11093081
tgtttatttt	cagtactctt	tttttttttt	tttttttttt	ttgagacgga	11093131
gtcttgcctc	gttgcccagg	ctggagtgca	gtggcacgat	cttggtcac	11093181
tgcagcctct	gcctcccagg	ttcaagcgt	tggctcactg	caacctccgc	11093231
ctcctgggtt	caagcgcttc	ttctgcctca	gcctcccag	tagctgggac	11093281
tataggcacg	tcccactacg	cccagctaat	tttttgtatt	ttttagtaga	11093331
gatgggggtt	cactatgta	gccaggatgg	tctcgatctc	ctgacctcgt	11093381
gatctgcctg	ccttgggctc	ccaaagtgtt	gggattatgg	gcatgagcca	11093431
ctgcacctgg	cctttttttt	tttttttttt	gagatggagt	ttcgctcttg	11093481
ttgcccaggc	tggagtga	tgggtgtgatc	tcggctcact	gcaacctctg	11093531
cctcctgggt	tcaagcaatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gtagctggga	11093581
ttacaggcac	ctgccaccac	gcctggctaa	tttttgtact	tttagtagag	11093631
acgggggttt	tccatgttgg	tcaggctgg	ctcaaactcc	tgacctcagg	11093681
tgatccacc	acctggcct	cccaaagtcc	tgggattaca	gacatgagcc	11093731
accgcgctg	gccgtgtctg	gcctttttta	gttatttctt	tttttttttt	11093781
tttttttttt	gagacagagt	cttactccgt	cgcccaggct	ggagtgcagc	11093831
ggtgcgatgt	ctgcgcactg	caagctccgc	cccctgggtt	catgccattc	11093881

tectgectca	gccttctgag	tagctgggac	tgcaggcgcc	tgccactacg	11093931	
cccggctact	tttttgtata	tttagtagag	atggagtttc	actgtgttag	11093981	
ccaggatggt	ctcgatctcc	tgactttgtg	atccgcccg	ctcgccctcc	11094031	
caaagtgtg	ggattacagg	cgtgagccac	catgccaggc	tttttttttt	11094081	
tttttttttt	ttgagacgga	gtcttgctct	gtcgccagg	ctggagtgca	11094131	
gtgccatgat	ctcagctcac	tgcaagctcc	acttcccagg	ctcacgccat	11094181	
tctccagcct	cagcctccca	agtagctgag	actacagggg	cccgccacca	11094231	
cactcggtca	atttttttgt	attttttagta	gagacggggg	ttcaccatgt	11094281	
tagccaggct	ggtcttgaa	tcctaaccct	aggcgattca	cctgcctcgg	11094331	
cctcccaaag	tgctgggatt	aaaggtatga	gccacctcgc	ctgggtgtgag	11094381	
ccacctcgcc	cagcctgagc	cacctcaccc	agcctaagcc	actgtgcctg	11094431	
gcctgatttt	aaaattttta	taataattat	ttttgggttt	11094481		
ctttttttttg	agacagggtc	ttactctgtc	atccaggcca	tcctgtctgt	11094531	
ctgtcatccc	agtgatggga	tcataccttg	ctgcagcctc	tacctcctgg	11094581	
gctcaagcga	tcctccccc	tcagcctcct	gagtagctgg	gagtacaggt	11094631	
gtgcaccacc	acacctggct	aatttttttt	tttttttttg	tatatagaga	11094681	
tggtattttg	ccatggtgac	caggctagt	ttaaactcct	ggactcactc	11094731	
aagagatcct	cctgccttgg	cctcccaagg	tcatttgaga	ctttcgtcat	11094781	
taggcgcaca	cctatgtgaa	gggcctgcag	gcacgtggca	ctcagaagac	11094831	
gtttattttat	tctttcagAG	GCTGAGGCTG	CAGTGGCCAC	CCAGGAGACA	11094881	ESONE
TCCACCGTCA	GGCTAAAGGT	CAGCTCCACA	GCCGTAAGGA	CACAGCACAC	11094931	15
AACCACCCGa	CCTGTTCCCG	ACACCTCCCG	GCTGCCTGGG	GCCACCCCTG	11094981	
GGCTCACCAC	GGTGGAGATA	GTGACAATGT	CTCACCAAGg	taaagactgg	11095031	Intr.
gccctcccta	ggccctctt	caccagaga	cgggtccctt	cagtggccac	11095081	15
gaacattttg	gtcacgagat	ggagtccagg	tgctcgtcct	actcccttgc	11095131	
tgaccttctc	tcacttgggc	cgtgtgtctc	tgggcccctca	gtttccctat	11095181	
ctgtaaagtg	ggtctaataa	cagttcttgc	cctctttgca	aggattaaat	11095231	
gggccaaatc	atatgagggg	ccaggtcctt	caggctcctg	gttcccaaag	11095281	
tcagccacgc	accgtgtggg	tcccaaaatt	ttatcaaggc	acattcgttg	11095331	
cctcagcttc	aggcatctgc	ccaaaaaggc	caggactaag	gcaaggagag	11095381	
ggagggattc	ctcagttact	agctttttcac	agaggctcca	aaaggctaag	11095431	
gaatccagta	acgttttaac	acaattttac	aatttttttt	tttgagacgg	11095481	
agttttgtct	ttgttgccca	ggctggagtg	cagtggcacg	atctcggctc	11095531	
actgcaacct	ctggctcccg	ggttcaagcg	attctcctgc	ctcagtctcc	11095581	
cgagtagctg	ggattacagg	catgcgccac	cacgctcggc	taatttttgta	11095631	
tttttagtac	agaaggggct	tctctgttgg	tcaggctggg	cgtgaactct	11095681	
caacctcagg	tgagccaccc	gcctgagcct	cccaaagtgc	tgggattaca	11095731	
ggtgtgagcc	accagcctg	gccttttttt	tgagacagag	tctcgtctct	11095781	
gcccattgctg	tactgcagt	acgcagtctg	ggctcactgt	aacctccgct	11095831	
tcccagggtc	aagtgattct	tctgccgcag	cctcccatgt	agagtagctg	11095881	
ggattacagg	caccgcgcac	catgcctggc	taattcttgc	attttttagta	11095931	
gagatggggg	ttcacagtgt	tggccaggct	ggtctcaaac	ttctgacctc	11095981	
aagtcattctg	cctgccttgg	ccctgccaaa	gtgctgggat	tatagatgtg	11096031	
agccaccgcg	cctggcctac	agtttattct	ttggtggctc	acacctgtaa	11096081	
tctcagcact	ttgggaggcc	aagggtggag	aatggcttga	gccaggagt	11096131	
tcaagtccag	cctgggcaac	atagcaagac	cctatctcta	ctacaaaata	11096181	
aataataaat	aaactaattt	tttttctttt	aaaacccaac	tattcaacat	11096231	
ggcaatgcaa	tatattaaaa	aaattttttt	tttctttgaa	acggagtctc	11096281	
tcactgtcac	ccgggctgga	gtgcagtgtc	gccatcttgg	ctcactgcaa	11096331	
cctccgcctc	ccaggtccaa	gtgattctcc	tgcttcagcc	tcccagtag	11096381	
ctgggattac	aggcaccac	caccataccc	agctaataat	tttgtatttt	11096431	
tagtagagat	gggttttcac	tatgttgggc	aggctggtct	ggaactcctg	11096481	
acctcgtgat	ctgcccagg	atcgccggcc	tcccaaagt	ctggggattg	11096531	
caggcatgag	ccaccgtgcc	cagccaaaac	ttttttattt	ttattttttt	11096581	
gggacacggg	ctcactgtgt	acccagact	ggagtgatag	agtgtgtca	11096631	
tggctcactg	cagcctcaac	ctccctgggc	tcagggtgat	ttcctgcttc	11096681	
agtctcccag	gtagctggga	ctacaggcat	gagccaccac	acccagctaa	11096731	
tttttgaatt	ttttgtaga	gacaggggtt	caccttgtgg	cccagacttg	11096781	
tctctaactc	cagggctcaa	gcgatctgcc	caccttggcc	tcccaaagt	11096831	
ctgagattaa	tgcaatttaa	aaaatttttt	ggccaggcct	ggtggctcat	11096881	
gcctgtattc	acaacacctt	gggaggcaaa	ggtgggcaga	tcacttgagg	11096931	

tcaggagttc	gagactagcc	tggccaacat	ggtgaaaccc	cctgtctact	11096981
aaaaaaatac	aaaaattacc	tgggcacagt	ggtgggtgcc	tgtaatccca	11097031
gctacttggg	atgctgaggg	tggagaattg	cttgaacctg	ggaggcagaa	11097081
gttgcagtaa	gccaagatca	tgccactgga	ctccagcctc	agtgacagag	11097131
caaaactctg	tctccaaaaa	aattgttttt	tttttttttt	tttcaaatca	11097181
tcacactaca	gcccaaggcct	ggccacttac	ttttgtaaat	aaagttttat	11097231
tggagccagt	ggaccagtga	ggccgaatct	tgcaggtgta	agatcacagt	11097281
ctatccttga	aaattttgat	attttgttca	ttgggtggtt	tttcattaat	11097331
ttaaatttta	aaaaataaca	tattaaaggc	tgggtgtggag	gtgcacgcct	11097381
gcagtcctag	ctactcccag	aggctgaggc	gggagacttg	cttgagccca	11097431
agagttgaag	tccagcctgg	gcaacatagc	gagaccccca	tctctaataa	11097481
taaaaataat	gaatttggaat	attattggat	tcttgggcag	ggcacagtgg	11097531
ctcacacctg	taatcccagc	actttgggag	gctgaggtgg	gtggatcacc	11097581
tgaggtcagg	agtttgagac	cagcctggcc	aacatggtga	aaccccgctc	11097631
ctactaaaaa	tacaaaaatt	agccaggcgt	ggtggcaggt	gcctgtaatc	11097681
ccagctactc	gggaggctga	agcacgagaa	tcgcttgaat	ccaggaggcg	11097731
gaggttgacg	tgagctgaga	ttgcgccatt	gcactccagc	ctggaggaca	11097781
agagtgaac	tccattcccc	tctgcaaaga	aaaggaatat	tatcagattc	11097831
ctaaagctttt	tggctccccc	tttagtttgg	gggctggggt	ggtgagtgtc	11097881
tgacctggcc	tactgtcct	ccctggatgt	gatgagaccc	aggtgtgggt	11097931
caggatgtca	ttcgtttgtc	caccagaggg	cgcccaaact	gctttgagct	11097981
gctgggaaat	ggtgctccta	gacttttagc	aaacaaacaa	aaaaaaatgg	11098031
cacatcggca	aatttcagac	cattcttttt	tttttttttt	ttggttccag	11098081
agtagctgaa	atctttgttc	agttacaagc	aggataaaat	ggaaactgcc	11098131
tgggagaggc	tgagaaacct	tcttgcttgg	gggaggtggg	gcactgctag	11098181
aattaatcgc	ttcacagacc	agcccatcca	ggactcctca	aatttgccaa	11098231
aaaagccatt	cattcattca	ttcatttatg	tagagacgag	ggggatctgg	11098281
ctatattgcc	tagattggtc	tcaaattcct	ggcctcaagt	gatcctcctg	11098331
ccttggtcta	ctaattgtct	gcgattacag	gcatgagcca	ccgtgcctag	11098381
ctctagtggg	cttgaaatgt	tgccttgccc	agggccctta	tgttgaatgg	11098431
cccaggtcca	cttgtatggt	tctgtaccaa	ggttaacccc	atcccataat	11098481
gectgggaca	gttgatgcag	gacaatcagc	ttctgtgcc	ttcaacctca	11098531
ggactgagca	tgtctggcat	tgtggggtcc	gaaggtggct	cccctgtccc	11098581
cttcaaaata	ccctcttttt	cttttcttct	tttttttttt	tttttttttt	11098631
tgagacgaag	tcttgctctg	ttgccccagc	tagagtgcag	tgggtgcgatc	11098681
tcagctcccc	gcaacctctg	cttcccgggt	tcaggcgatt	ctcctgcctc	11098731
agcctcctga	gtagctggga	ttacaggtgc	ccaccgccac	agctggctaa	11098781
tttttgatt	tttagtagag	acagggtttc	accgtgttgg	ccaggctggt	11098831
cttgactcc	tgacctcagg	caacctgccc	acctcagcct	cccaaagtgc	11098881
tgggattaca	ggtttgagcc	actgggcctg	gccttttttt	tttttttttg	11098931
agagggagtc	tactctgtt	gcccaggctg	gagtgcattg	gcgcgatctt	11098981
gactcactgc	aactccattt	cccgggttca	agtgattctc	ctccctcagc	11099031
ctcccaagta	gctgggatta	caggtgcatg	ccaccacggc	cagctaattt	11099081
tgtattttta	gtagagacag	ggttttacta	tgttgatcat	gctggtctca	11099131
aactcctgac	cttagtgat	ctgcccgcct	tagcctccca	aagtgttggg	11099181
attacaggtg	tgagccaccg	cgcccagacc	aaaatatgct	catttttaata	11099231
aaatgcacaa	gtaggttgac	aagaatttca	cctgcaacct	tgtcaaccac	11099281
ctagaataaa	agcctctgca	gccctcccct	aaagactcat	caatgtgagg	11099331
ctcaagaacc	ttcttaggct	gggctcggtg	gctcatttct	gtaatccctg	11099381
cactttggaa	ggctgaggca	ggaggatctc	ttgaggccag	gagttcaaga	11099431
caagctcggg	acacatagcc	agacctctgt	ttctatcccc	cacaaaaaga	11099481
acctctctaa	accggaattg	agtcctacaa	cctcgataac	tcacaaataa	11099531
gcccgtgtgg	cctctcacag	acttgggaag	ttctccaagt	gtccaggagg	11099581
atgtgccagg	cgctttcctg	ccgtgaccac	cgtcctctgc	ctgctccatt	11099631
tcttggtggc	cttcccttag	acctgggcct	cactcttgct	tctctcctgc	11099681
agCTCTGGGC	GACGTTGCTG	GCAGAGGAAA	TGAGAAGAAG	CCCAGTAGCG	11099731
TGAGGGCTCT	GTCCATTGTC	CTCCCCATCG	gtaagcgcg	gccgggtccc	11099781
caggctcccc	caggtcacag	cctcccgcta	tgtgacctcg	tgccctggctg	11099831
ggtgggcctg	ttcacttttt	ctcctggaca	gggaacagcc	ccactggtgt	11099881
cctttatcac	ccccacggcc	tctcctggct	tggggctgac	agtgacaaga	11099931
tcagacagct	aaggggtcag	atggaggatg	tggagctggg	tcccgtgctg	11099981

ESONE

16

Intr.

16

tggaatagcc	tcaccgagat	ttgagtgcct	tctggggaac	tggttccctt	11100031	
gcagggggct	gtgtggagag	gcgcgccttc	cctgcctcac	ccatgctcat	11100081	
cctaactcgg	ttaccatcac	atctcttttt	tctttttttc	ttaaatttta	11100131	
agaaaaaaga	aattttaattt	ttttgagaga	cagagtcttg	ctctgtcacc	11100181	
caggctggag	tgagtgga	ccatcatgcc	tcgctgcagc	ctcaatgtct	11100231	
gggctcaagc	gattcctcca	cctcagcctc	ctgagtagct	gggtgcaagcc	11100281	
actatacccc	acttcctatt	tcttaaaaaag	tcacagccct	gtgtgtggct	11100331	
aatcctggac	agaaatctag	aagaagtcag	ctacttctgg	ggcgtggctc	11100381	
acccagtggg	cttcagggtta	gatatttctt	atacttatga	ggctgggtgt	11100431	
gggtggcttat	gcctgtaatc	ccagcacttt	gggaggctga	agtgggtgga	11100481	
ttgctttgggc	tcaggagttc	gagaccaacc	tgggcaacat	ggcgaaaacc	11100531	
tgtttctaga	aaaggtacaa	aaattagctg	ggcaggtggc	acgtgcctgt	11100581	
ggttaccagct	aattgagggc	ctgaggcagg	aggatcgctt	gaacctggga	11100631	
ggctgagggtt	gcagtgaact	gagatcatgt	cactgcactc	cagcctgggtg	11100681	
acagagcaag	accccgctctc	aaaaaaaaaa	aaagaaagaa	aaaaattctt	11100731	
atgcatagat	ttgcctcttt	tctgtttgtt	tgttttgaga	tggagtctcg	11100781	
ctctgtcgcc	caggctggag	tacagtggct	caacctcggc	tactgcaac	11100831	
ctctgcctcc	cgggttcaaag	caattctcct	gcctcagcct	cctgagtagc	11100881	
tgggtactaca	ggcgcccgcc	accatgccca	gctaattttt	gtatttttag	11100931	
tagagactga	ctgggtttca	tcatgttggc	caggctggtc	tcgaactctt	11100981	
gacctcatga	tccgcccggc	tcagcctccc	aaaatgctgg	gattacaggc	11101031	
gtgagccacc	aggcccaggc	cgcaaggcga	tctctaaaca	aacataaaaag	11101081	
accaggagtc	aaggttatgg	tacgatgcc	gtgttttcac	tccagccacg	11101131	
gagctgggtc	tctggctctcg	ggggcagctg	tgtgacagag	cgtgcctctc	11101181	
cctacagTGC	TCCTTCGCTT	CCTTTGCCTG	GGGGTCTTCC	TTCTATGGAA	11101231	ESONE
GAAGTGGCGG	CTTAAGAACA	TCAACAGCAT	CAACTTTGAC	AACCCCGTCT	11101281	17
ATCAGAAGAC	CACAGAGGAT	GAGGTCCACA	TTTGCCACAA	CCAGGACGGC	11101331	
TACAGCTACC	CCTCGgtgag	tgaccctctc	tagaaagcca	gagcccatgg	11101381	Intr.
cggccccctc	ccagctggag	gcatatgata	ctcaagggac	caggccgagg	11101431	17
cttccccagc	cctccagatc	gaggacagca	ttaggtgaat	gcttctgtgc	11101481	
gctcattcag	aatgtcagcg	gacaatggcc	ttggtggtgt	agaggaatgt	11101531	
tggataagca	aatagagagc	tccatcagat	ggtagacagg	caaagaaaag	11101581	
caaaaggagt	tcagaggccg	ggcgcggtgg	ctcatgcctg	taatcccagg	11101631	
actttgggag	gccgaggctg	gcggtaccac	tgaagtcagg	agttttgagac	11101681	
cagcttgggc	atcatgacaa	aaccccgctc	ctattaaaaa	tacaaaaaat	11101731	
tagccaggcg	tgggagtggg	cgcctgtaat	cccagctact	cgggaggccg	11101781	
aggtagaaaa	atcgcttgaa	cctaggaggc	agaggttgca	gtgagccgag	11101831	
atcgcgccac	tgcattccag	cccgggaggc	aagagcaaaa	ctccatctca	11101881	
aaaaaaaaaa	aaaaaggagt	tcagaggccc	ggcatggtgg	ttcacacatg	11101931	
tgatcccaga	acttggggag	gttgaggcag	gagaatcacc	tgagctcaga	11101981	
gttcaagacc	agcctgggca	gcacagcaag	accccatctc	tgcaaaaaat	11102031	
aaaaatttag	cccagtgtgg	tgatgagcgc	ctagttccag	ctactaggga	11102081	
ggctaaggca	ggaggattgc	ttgaggctaa	ggtaggagat	tgagactgca	11102131	
gtgacttgtg	attgcgtcac	tgcgctccag	cctgggtgac	agagcaagcc	11102181	
cttgtctctt	aaaaaaaaaa	aaaaattcaa	agaagggttt	ccagagggcc	11102231	
aggaggagg	aaggaggagg	aggtgtttta	tttttttgc	tttatttttt	11102281	
attttgagac	agagtctctc	tctgtcacc	aggttgagg	gcagtgtgtg	11102331	
gatcttggtc	cactgcaact	tctgcctcct	gggttcaagc	aattcttatg	11102381	
cctcagcctc	agcctcctga	gtagctggga	ttacaacact	atgcccggtg	11102431	
aatttttgta	tttttagtag	agacgaggtt	tcgccatgtt	gcccagactg	11102481	
gtctcgaa	cctgacctca	agtgatccac	cgccttggtc	ctccccagct	11102531	
gctgggattg	caggcgtag	ccactgcgc	cgccttgatc	tttacacaag	11102581	
gggtttagg	taggtagcct	tctctgaacc	aggagaacag	cctgtgcgaa	11102631	
ggcctgagg	ctggaccgtg	cctgttggtg	ttgaggccgt	tgtagctgga	11102681	
gcaaacagag	agaggggtaa	aaaggcagga	ggctaccagg	caggttgtgc	11102731	
agagccttgt	gggccaactg	ggaggacttt	ggcttttgcc	ctgagagcgg	11102781	
tgggaagtga	ctgaatccgg	tactcaccgt	ctccctctgg	cggctcctgg	11102831	
gggaacatgc	ttggggatca	ggctggggga	ggctgccagg	cccaggaggt	11102881	
gagaagtagg	tggcctccag	cgtgtttcc	tgaatgctgg	actgatagtt	11102931	
tccgctgttt	accatttgtt	ggcagAGACA	GATGGTCAGT	CTGGAGGATG	11102981	Stop
ACGTGGCGTG	AACATCTGCC	TGGAGTCCCG	tCCCTGCCCA	GAACCTTCC	11103031	ESONE

TGAGACCTCG	CCGGCCTTGT	TTTATTCAAA	GACAGAGAAG	ACCAAAGCAT	11103081	18
TGCCTGCCAG	AGCTTTGTTT	TATATATTTA	TTCATCTGGG	AGGCAGAACA	11103131	
GGCTTCGGAC	AGTGCCCATG	CAATGGCTTG	GGTTGGGATT	TTGGTTTCTT	11103181	
CCTTTCCtCG	TGAAGGATAA	GAGAAACAGG	CCCGGGGGGA	CCAGGATGAC	11103231	
ACCTCCATTT	CTCTCCAGGA	AGTTTTGAGT	TTCTCTCCAC	CGTGACACAA	11103281	
TCCTCAAAACA	TGGAAGATGA	AAGGGgAGGG	GATGTCAGGC	CCAGAGAAGC	11103331	
AAGTGGCTTT	CAACACACAA	CAGCAGATGG	CACCAACGGG	ACCCCTTGGC	11103381	
CCTGCCTCAT	CCACCAATCT	CTAAGCCAAA	CCCCTAAACT	CAGGAGTCAA	11103431	
CGTGTtTACC	TCTTCTATGC	AAGCCTTGCT	AGACAGCCAG	GTTAGCCTTT	11103481	
GCCCTGTcAC	CCCCGAATCA	TGACCCACCC	AGTGTCTTTC	GAGGTGGGTT	11103531	
TGTACCTTCC	TTAAGCCAGG	AAAGGGATTc	ATGGCGTCGG	AAATGATCTG	11103581	
GCTGAATCCG	TGGTGGCACC	GAGACCAAAC	TCATTCACCA	AATGATGCCA	11103631	
CTTCCCAGAG	GCAGAGCCTG	AGTCACtGGT	CACCCTTAAT	ATTTATTAAg	11103681	
TGCCTGAGAC	ACCCGGTTAC	CTTGGCCGTG	AGGACACGTG	GCCTGCACCC	11103731	
AGGTGTGGCT	GTCAGGACAC	CAGCCTGGTG	CCCATCCTCC	CGACCCCTAC	11103781	
CCACTTCCAT	TCCCGTGGTC	TCCTTGCACT	TTCTCAGTTC	AGAGTTGTAC	11103831	
ACTGTGTACA	TTTGGCATTT	GTGTTATTAT	TTTGCACTGT	TTTCTGTcGT	11103881	
GTGTGTTGGG	ATGGGATCCC	AGGCCAGGGA	AAGCCCGTGT	CAATGAATGC	11103931	
CGGGGACAGA	GAGGGGCAGG	TTGACCGGGA	CTTCAAAGCC	GTGATCGTGA	11103981	
ATATCGAGAA	CTGCCATTGT	CGTCTTTATG	TCCGCCCACC	TAGTGCTTCC	11104031	
ACTTCTATGC	AAATGCCTCC	AAGCCATTCA	CTTCCCCAAT	CTTGTCGTTG	11104081	
ATGGGTATGT	GTTTAAACAA	TGCACGGTGA	GGCCGGGCGC	AGTGGCTCAC	11104131	
GCCTGTAATC	CCAGCACTTT	GGGAGGCCGA	GGCGGTGGA	TCATGAGGTC	11104181	
AGGAGATCGA	GACCATCCTG	GCTAACAcGT	GAAACCCCGT	CTCTACTAAA	11104231	
AATACAAAAA	ATTAGCCGGG	CGtGGTGGcG	GGCACCTGTA	GTCCCAGCTA	11104281	
CTCGGGAGGC	TGAGGCAGGA	GAATGGTGTG	AACCCGGGAA	GCGGAGCTTG	11104331	
CAGTGAGCCG	AGATTGCGCC	ACTGCAGTCC	GCAGTCTGGC	CTGGGCGACA	11104381	
GAGCGAGACT	CCGTCTCAAA	AAAAAAAAAAC	AAAAAAAAAAC	CATGCATGGT	11104431	
GCATCAGCAG	CCCATGGCCT	CTGGCCAGGC	ATGGCGAGGC	TGAGGTGGGA	11104481	
GGATGGTTTG	AGCTCAGGCA	TTTGAGGCTG	TCGTGAGCTA	TGATTATGCC	11104531	
ACTGCTTTCC	AGCCTGGGCA	ACATAGTAAG	ACCCCATCTC	TTAAAAAATG	11104581	
AATTTGGCCA	GACACAGGTG	CCTCACGCCT	GTAATCCAG	CACTTTGGGA	11104631	
GGCTGAGCTG	GATCACTTGA	GTTCAGGAGT	TGGAGACCAG	GCCTGAGCAA	11104681	
CAAAGCGAGA	TCCCATCTCT	ACAAAAACCA	AAAAGTTAAA	AATCAGCTGG	11104731	
GTAcGGTGGC	ACGTGCCTGT	GATCCCAGCT	ACTTGGGAGG	CTGAGGCAGG	11104781	
AGGATCGCCT	GAGCCCAGGA	GGTGGAGGTT	GCAGTGAGCC	ATGATCGAGC	11104831	
CACTGCACTC	CAGCCTGGGC	AACAGATGAA	GACCTATTTC	CAGAAATACA	11104881	
ACTATAAAAA	AATAAATAAA	TCCTCCAGTC	TGGATCGTTT	GACGGGACTT	11104931	
CAGGTTCTTT	CTGAAATCGC	CGTGTTACTG	TTGCACTGAT	GTCCGGAGAG	11104981	
ACAGTGACAG	CCTCCGTCAG	ACTCCCGCGT	GAAGATGTCA	CAAGGGATTG	11105031	
GCAATTGTCC	CCAGGGACAA	AACACTGTGT	CCCCCCCAGT	GCAGGGAACC	11105081	
GTGATAAGCC	TTTCTGGTTT	CGGAGCACGT	AAATGCGTCC	CTGTACAGAT	11105131	
AGTGGGGATT	TTTTGTtATG	TTTGCACTTT	GTATATTGGT	TGAAACTGTT	11105181	
ATCACTTATA	TATATATATA	taCACACATA	TATATAAAAT	CTATTTATTT	11105231	
TTGCAAACCC	TGTTTGCTGT	ATTTGTTcAG	TGACTATTCT	CGGGGCCCTG	11105281	
TGTAGGGGGT	TATTGCCTCT	GAAATGCCTC	TTCTTTATGT	ACAAAGATTA	11105331	
TTTGACGAA	CTGGACTGTG	TGCAACGCTT	TTTGGGAGAA	TGATGTCCCC	11105381	
GTTGTATGTA	TGAGTGGCTT	CTGGGAGATG	GGTGTCACTT	TTTAAACCAC	11105431	
TGTATAGAAG	GTTTTTGTAG	CCTGAATGTC	TTACTGTGAT	CAATTAAATT	11105481	
TCTTAAATGa	accaattttgt	ctaaactcga	tgacagtctc	tctgttcgcg	11105531	
cgcttcctttt	tgtttttttt	tttttcctga	gatggagcct	ggctctgtca	11105581	
cccctggct						

APPENDICE B

Sequenza codificante e traduzione del gene LDLR (mRNA NM 000527 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)).

Il Signal peptide comprende i primi 21 a.a. La numerazione tra parentesi quadra riguarda la proteina matura ed è convenzionalmente usata per localizzare le mutazioni

	1	ATG	GGG	CCC	TGG	GGC	TGG	AAA	TTG	CGC	TGG	ACC	GTC	GCC	TTG	CTC	45	
	1	M	G	P	W	G	W	K	L	R	W	T	V	A	L	L	15	
	46	CTC	GCC	GCG	GCG	GGG	ACT	GCA	GTG	GGC	GAC	AGA	TGT	GAA	AGA	AAC	90	
	16	L	A	A	A	G	T	A	V	G	D	R	C	E	R	N	30	[9]
	91	GAG	TTC	CAG	TGC	CAA	GAC	GGG	AAA	TGC	ATC	TCC	TAC	AAG	TGG	GTC	135	
[10]	31	E	F	Q	C	Q	D	G	K	C	I	S	Y	K	W	V	45	[24]
	136	TGC	GAT	GGC	AGC	GCT	GAG	TGC	CAG	GAT	GGC	TCT	GAT	GAG	TCC	CAG	180	
[25]	46	C	D	G	S	A	E	C	Q	D	G	S	D	E	S	Q	60	[39]
	181	GAG	ACG	TGC	TTG	TCT	GTC	ACC	TGC	AAA	TCC	GGG	GAC	TTC	AGC	TGT	225	
[40]	61	E	T	C	L	S	V	T	C	K	S	G	D	F	S	C	75	[54]
	226	GGG	GGC	CGT	GTC	AAC	CGC	TGC	ATT	CCT	CAG	TTC	TGG	AGG	TGC	GAT	270	
[55]	76	G	G	R	V	N	R	C	I	P	Q	F	W	R	C	D	90	[69]
	271	GGC	CAA	GTG	GAC	TGC	GAC	AAC	GGC	TCA	GAC	GAG	CAA	GGC	TGT	CCC	315	
[70]	91	G	Q	V	D	C	D	N	G	S	D	E	Q	G	C	P	105	[84]
	316	CCC	AAG	ACG	TGC	TCC	CAG	GAC	GAG	TTT	CGC	TGC	CAC	GAT	GGG	AAG	360	
[85]	106	P	K	T	C	S	Q	D	E	F	R	C	H	D	G	K	120	[99]
	361	TGC	ATC	TCT	CGG	CAG	TTC	GTC	TGT	GAC	TCA	GAC	CGG	GAC	TGC	TTG	405	
[100]	121	C	I	S	R	Q	F	V	C	D	S	D	R	D	C	L	135	[114]
	406	GAC	GGC	TCA	GAC	GAG	GCC	TCC	TGC	CCG	GTG	CTC	ACC	TGT	GGT	CCC	450	
[115]	136	D	G	S	D	E	A	S	C	P	V	L	T	C	G	P	150	[129]
	451	GCC	AGC	TTC	CAG	TGC	AAC	AGC	TCC	ACC	TGC	ATC	CCC	CAG	CTG	TGG	495	
[130]	151	A	S	F	Q	C	N	S	S	T	C	I	P	Q	L	W	165	[144]
	496	GCC	TGC	GAC	AAC	GAC	CCC	GAC	TGC	GAA	GAT	GGC	TCG	GAT	GAG	TGG	540	
[145]	166	A	C	D	N	D	P	D	C	E	D	G	S	D	E	W	180	[159]
	541	CCG	CAG	CGC	TGT	AGG	GGT	CTT	TAC	GTG	TTC	CAA	GGG	GAC	AGT	AGC	585	
[160]	181	P	Q	R	C	R	G	L	Y	V	F	Q	G	D	S	S	195	[174]
	586	CCC	TGC	TCG	GCC	TTC	GAG	TTC	CAC	TGC	CTA	AGT	GGC	GAG	TGC	ATC	630	
[175]	196	P	C	S	A	F	E	F	H	C	L	S	G	E	C	I	210	[189]
	631	CAC	TCC	AGC	TGG	CGC	TGT	GAT	GGT	GGC	CCC	GAC	TGC	AAG	GAC	AAA	675	
[190]	211	H	S	S	W	R	C	D	G	G	P	D	C	K	D	K	225	[204]
	676	TCT	GAC	GAG	GAA	AAC	TGC	GCT	GTG	GCC	ACC	TGT	CGC	CCT	GAC	GAA	720	
[205]	226	S	D	E	E	N	C	A	V	A	T	C	R	P	D	E	240	[219]
	721	TTC	CAG	TGC	TCT	GAT	GGA	AAC	TGC	ATC	CAT	GGC	AGC	CGG	CAG	TGT	765	

[220]	241	F	Q	C	S	D	G	N	C	I	H	G	S	R	Q	C	255	[234]
	766	GAC	CGG	GAA	TAT	GAC	TGC	AAG	GAC	ATG	AGC	GAT	GAA	GTT	GGC	TGC	810	
[235]	256	D	R	E	Y	D	C	K	D	M	S	D	E	V	G	C	270	[249]
	811	GTT	AAT	GTG	ACA	CTC	TGC	GAG	GGA	CCC	AAC	AAG	TTC	AAG	TGT	CAC	855	
[250]	271	V	N	V	T	L	C	E	G	P	N	K	F	K	C	H	285	[264]
	856	AGC	GGC	GAA	TGC	ATC	ACC	CTG	GAC	AAA	GTC	TGC	AAC	ATG	GCT	AGA	900	
[265]	286	S	G	E	C	I	T	L	D	K	V	C	N	M	A	R	300	[279]
	901	GAC	TGC	CGG	GAC	TGG	TCA	GAT	GAA	CCC	ATC	AAA	GAG	TGC	GGG	ACC	945	
[280]	301	D	C	R	D	W	S	D	E	P	I	K	E	C	G	T	315	[294]
	946	AAC	GAA	TGC	TTG	GAC	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	TCC	CAC	GTC	TGC	AAT	990	
[295]	316	N	E	C	L	D	N	N	G	G	C	S	H	V	C	N	330	[309]
	991	GAC	CTT	AAG	ATC	GGC	TAC	GAG	TGC	CTG	TGC	CCC	GAC	GGC	TTC	CAG	1035	
[310]	331	D	L	K	I	G	Y	E	C	L	C	P	D	G	F	Q	345	[324]
	1036	CTG	GTG	GCC	CAG	CGA	AGA	TGC	GAA	GAT	ATC	GAT	GAG	TGT	CAG	GAT	1080	
[325]	346	L	V	A	Q	R	R	C	E	D	I	D	E	C	Q	D	360	[339]
	1081	CCC	GAC	ACC	TGC	AGC	CAG	CTC	TGC	GTG	AAC	CTG	GAG	GGT	GGC	TAC	1125	
[340]	361	P	D	T	C	S	Q	L	C	V	N	L	E	G	G	Y	375	[354]
	1126	AAG	TGC	CAG	TGT	GAG	GAA	GGC	TTC	CAG	CTG	GAC	CCC	CAC	ACG	AAG	1170	
[355]	376	K	C	Q	C	E	E	G	F	Q	L	D	P	H	T	K	390	[369]
	1171	GCC	TGC	AAG	GCT	GTG	GGC	TCC	ATC	GCC	TAC	CTC	TTC	TTC	ACC	AAC	1215	
[370]	391	A	C	K	A	V	G	S	I	A	Y	L	F	F	T	N	405	[384]
	1216	CGG	CAC	GAG	GTC	AGG	AAG	ATG	ACG	CTG	GAC	CGG	AGC	GAG	TAC	ACC	1260	
[385]	406	R	H	E	V	R	K	M	T	L	D	R	S	E	Y	T	420	[399]
	1261	AGC	CTC	ATC	CCC	AAC	CTG	AGG	AAC	GTG	GTC	GCT	CTG	GAC	ACG	GAG	1305	
[400]	421	S	L	I	P	N	L	R	N	V	V	A	L	D	T	E	435	[414]
	1306	GTG	GCC	AGC	AAT	AGA	ATC	TAC	TGG	TCT	GAC	CTG	TCC	CAG	AGA	ATG	1350	
[415]	436	V	A	S	N	R	I	Y	W	S	D	L	S	Q	R	M	450	[429]
	1351	ATC	TGC	AGC	ACC	CAG	CTT	GAC	AGA	GCC	CAC	GGC	GTC	TCT	TCC	TAT	1395	
[430]	451	I	C	S	T	Q	L	D	R	A	H	G	V	S	S	Y	465	[444]
	1396	GAC	ACC	GTC	ATC	AGC	AGG	GAC	ATC	CAG	GCC	CCC	GAC	GGG	CTG	GCT	1440	
[445]	466	D	T	V	I	S	R	D	I	Q	A	P	D	G	L	A	480	[459]
	1441	GTG	GAC	TGG	ATC	CAC	AGC	AAC	ATC	TAC	TGG	ACC	GAC	TCT	GTC	CTG	1485	
[460]	481	V	D	W	I	H	S	N	I	Y	W	T	D	S	V	L	495	[474]
	1486	GGC	ACT	GTC	TCT	GTT	GCG	GAT	ACC	AAG	GGC	GTG	AAG	AGG	AAA	ACG	1530	
[475]	496	G	T	V	S	V	A	D	T	K	G	V	K	R	K	T	510	[489]
	1531	TTA	TTC	AGG	GAG	AAC	GGC	TCC	AAG	CCA	AGG	GCC	ATC	GTG	GTG	GAT	1575	
[490]	511	L	F	R	E	N	G	S	K	P	R	A	I	V	V	D	525	[504]
	1576	CCT	GTT	CAT	GGC	TTC	ATG	TAC	TGG	ACT	GAC	TGG	GGA	ACT	CCC	GCC	1620	
[505]	526	P	V	H	G	F	M	Y	W	T	D	W	G	T	P	A	540	[519]
	1621	AAG	ATC	AAG	AAA	GGG	GGC	CTG	AAT	GGT	GTG	GAC	ATC	TAC	TCG	CTG	1665	
[520]	541	K	I	K	K	G	G	L	N	G	V	D	I	Y	S	L	555	[534]
	1666	GTG	ACT	GAA	AAC	ATT	CAG	TGG	CCC	AAT	GGC	ATC	ACC	CTA	GAT	CTC	1710	
[535]	556	V	T	E	N	I	Q	W	P	N	G	I	T	L	D	L	570	[549]

	1711	CTC	AGT	GGC	CGC	CTC	TAC	TGG	GTT	GAC	TCC	AAA	CTT	CAC	TCC	ATC	1755
[550]	571	L	S	G	R	L	Y	W	V	D	S	K	L	H	S	I	585 [564]
	1756	TCA	AGC	ATC	GAT	GTC	AAT	GGG	GGC	AAC	CGG	AAG	ACC	ATC	TTG	GAG	1800
[565]	586	S	S	I	D	V	N	G	G	N	R	K	T	I	L	E	600 [579]
	1801	GAT	GAA	AAG	AGG	CTG	GCC	CAC	CCC	TTC	TCC	TTG	GCC	GTC	TTT	GAG	1845
[580]	601	D	E	K	R	L	A	H	P	F	S	L	A	V	F	E	615 [594]
	1846	GAC	AAA	GTA	TTT	TGG	ACA	GAT	ATC	ATC	AAC	GAA	GCC	ATT	TTC	AGT	1890
[595]	616	D	K	V	F	W	T	D	I	I	N	E	A	I	F	S	630 [609]
	1891	GCC	AAC	CGC	CTC	ACA	GGT	TCC	GAT	GTC	AAC	TTG	TTG	GCT	GAA	AAC	1935
[610]	631	A	N	R	L	T	G	S	D	V	N	L	L	A	E	N	645 [624]
	1936	CTA	CTG	TCC	CCA	GAG	GAT	ATG	GTC	CTC	TTC	CAC	AAC	CTC	ACC	CAG	1980
[625]	646	L	L	S	P	E	D	M	V	L	F	H	N	L	T	Q	660 [639]
	1981	CCA	AGA	GGA	GTG	AAC	TGG	TGT	GAG	AGG	ACC	ACC	CTG	AGC	AAT	GGC	2025
[640]	661	P	R	G	V	N	W	C	E	R	T	T	L	S	N	G	675 [654]
	2026	GGC	TGC	CAG	TAT	CTG	TGC	CTC	CCT	GCC	CCG	CAG	ATC	AAC	CCC	CAC	2070
[655]	676	G	C	Q	Y	L	C	L	P	A	P	Q	I	N	P	H	690 [669]
	2071	TCG	CCC	AAG	TTT	ACC	TGC	GCC	TGC	CCG	GAC	GGC	ATG	CTG	CTG	GCC	2115
[670]	691	S	P	K	F	T	C	A	C	P	D	G	M	L	L	A	705 [684]
	2116	AGG	GAC	ATG	AGG	AGC	TGC	CTC	ACA	GAG	GCT	GAG	GCT	GCA	GTG	GCC	2160
[685]	706	R	D	M	R	S	C	L	T	E	A	E	A	A	V	A	720 [699]
	2161	ACC	CAG	GAG	ACA	TCC	ACC	GTC	AGG	CTA	AAG	GTC	AGC	TCC	ACA	GCC	2205
[700]	721	T	Q	E	T	S	T	V	R	L	K	V	S	S	T	A	735 [714]
	2206	GTA	AGG	ACA	CAG	CAC	ACA	ACC	ACC	CGG	CCT	GTT	CCC	GAC	ACC	TCC	2250
[715]	736	V	R	T	Q	H	T	T	T	R	P	V	P	D	T	S	750 [729]
	2251	CGG	CTG	CCT	GGG	GCC	ACC	CCT	GGG	CTC	ACC	ACG	GTG	GAG	ATA	GTG	2295
[730]	751	R	L	P	G	A	T	P	G	L	T	T	V	E	I	V	765 [744]
	2296	ACA	ATG	TCT	CAC	CAA	GCT	CTG	GGC	GAC	GTT	GCT	GGC	AGA	GGA	AAT	2340
[745]	766	T	M	S	H	Q	A	L	G	D	V	A	G	R	G	N	780 [759]
	2341	GAG	AAG	AAG	CCC	AGT	AGC	GTG	AGG	GCT	CTG	TCC	ATT	GTC	CTC	CCC	2385
[760]	781	E	K	K	P	S	S	V	R	A	L	S	I	V	L	P	795 [774]
	2386	ATC	GTG	CTC	CTC	GTC	TTC	CTT	TGC	CTG	GGG	GTC	TTC	CTT	CTA	TGG	2430
[775]	796	I	V	L	L	V	F	L	C	L	G	V	F	L	L	W	810 [789]
	2431	AAG	AAC	TGG	CGG	CTT	AAG	AAC	ATC	AAC	AGC	ATC	AAC	TTT	GAC	AAC	2475
[800]	811	K	N	W	R	L	K	N	I	N	S	I	N	F	D	N	825 [804]
	2476	CCC	GTC	TAT	CAG	AAG	ACC	ACA	GAG	GAT	GAG	GTC	CAC	ATT	TGC	CAC	2520
[805]	826	P	V	Y	Q	K	T	T	E	D	E	V	H	I	C	H	840 [819]
	2521	AAC	CAG	GAC	GGC	TAC	AGC	TAC	CCC	TCG	AGA	CAG	ATG	GTC	AGT	CTG	2565
[820]	841	N	Q	D	G	Y	S	Y	P	S	R	Q	M	V	S	L	855 [834]
	2566	GAG	GAT	GAC	GTG	GCG	TGA										2583
[835]	856	E	D	D	V	A	*										

APPENDICE C

Gel elettroforesi capillare su microchip

La tecnica comunemente usata per l'analisi dei prodotti di PCR è stata fino a pochi anni fa, la gel-elettroforesi su slab (SGE = Slab Gel Electrophoresis). Essa, pur avendo il vantaggio di essere poco costosa, è però carente in termini di riproducibilità e capacità di quantizzare i prodotti analizzati. D'altra parte, l'elettroforesi capillare abbinata ad un rivelatore a fluorescenza indotta da laser (CE-LIF = Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence) è un sistema molto efficiente sensibile per l'analisi qualitativa e quantitativa di frammenti di DNA ed RNA ma è costosa e non idonea alla routine.

Questi inconvenienti hanno così stimolato la ricerca di soluzioni alternative più semplici ed economiche. Tra il 1995 e il 1998 fu sviluppata la tecnologia per incidere una fitta rete di microcapillari all'interno di blocchetti di vetro o metacrilato, di dimensioni analoghe a quelle dei componenti elettronici conosciuti come microchip. Il riempimento sotto pressione di questi microcapillari con un gel di poliacrilammide contenente nuovi colori fluorescenti intercalanti permetteva la separazione elettroforetica rapida ed efficiente e l'affidabile quantizzazione di frammenti di DNA ed RNA grazie alla sensibilità consentita dalla rivelazione LIF. Nel 2000 L'Agilent Technologies mise in commercio uno strumento munito di software applicativo e di microchip predisposti alla separazione, su gel non denaturante, di frammenti di DNA e RNA di varia dimensione. Questa tecnica risultò vantaggiosa per semplicità d'uso ed elevata standardizzazione, brevità dei tempi di analisi, ridotto consumo di reattivi e di analita, bassi costi di acquisto e di esercizio e fu apprezzata nell'ambito di determinazioni genetico-molecolari, quali ad esempio, quella per la caratterizzazione molecolare di patologie familiari a carico del metabolismo lipidico o lipoproteico, per lo screening di varianti genetiche note attraverso la restrizione enzimatica o l'amplificazione allele-specifica, per la ricerca di mutazioni incognite mediante SSCP e del DNA eteroduplice.

Questa tecnica garantisce grazie all'incorporazione di un sistema di calibrazione, sia qualitativo che quantitativo, una elevata standardizzazione e riproducibilità dei risultati in corse elettroforetiche eseguite con microchip e lotti di gel diversi i cui risultati sono presentati in formato gel-simile o di elettroferogramma o tabulare. Sono inoltre disponibili kit che hanno caratteristiche di risoluzione diverse secondo la diversa lunghezza dei frammenti di DNA da analizzare; in particolare si è rivelato utile per le applicazioni descritte in questo studio il kit DNA500 (sizing 25-500bp). Altri vantaggi dell'analisi con il Bioanalyzer dovuti in gran parte all'impiego di nuovi coloranti intercalanti idonei alla LIF sono l'elevatissima sensibilità di rivelazione e la drastica riduzione della quantità di campione.

Il Bioanalyzer permette di analizzare sequenzialmente 12 campioni di DNA o RNA in meno di 30 min e fornisce tutti risultati quantitativi (con un'accuratezza maggiore del 70% e in un rang lineare di concentrazione compresa tra 0.5 e 50 ng/ μ L) e qualitativi (con un'accuratezza di + 2 bp o di + 4 bp, a seconda del kit utilizzato), automaticamente, al termine della separazione. Il caricamento si effettua in questo modo: in pratica una piccola lastrina sulla quale è incisa una fitta rete di capillari (Figura C1.A) viene caricata col gel elettroforetico con un ladder DNA e 1 μ L di ciascuno di 12 diversi estratti di DNA addizionati di un marker che serve ad allineare le diverse corse elettroforetiche eseguite sequenzialmente nel Lab-Cbip. La piastra viene inserita nel Bioanalyzer (Figura C1.B) e viene avviato lo specifico programma per l'analisi del DNA. Il risultato analitico si ottiene dopo circa 30 minuti e consiste in una simulazione di un gel su lastra piastra, o da 12 elettroferogrammi corrispondenti ai singoli campioni.

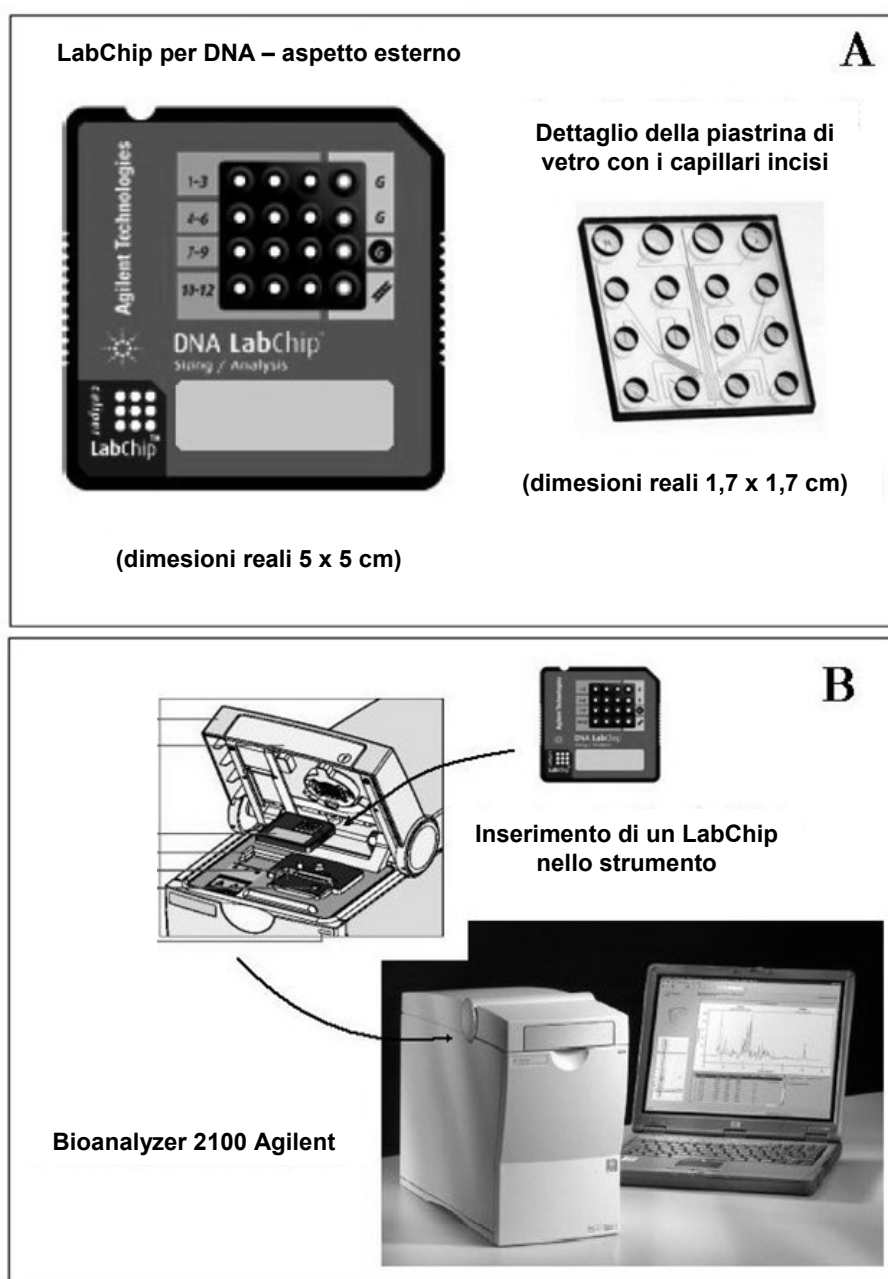


Figura C1. A) Struttura e dimensioni del LabChip. B) Inserimento del LabChip nel Bioanalyzer

APPENDICE D

Elenco aggiornato al 2006 delle mutazioni FH trovate in Italia

MUTAZIONI MISSENSO

Mutation	Receptor (1)	Receptor (2)	Designation
Ex 1 c.28 T>A	W-12R	p.W10R	FH Enna
Ex 2 c.173 A>G	E37G	p.E58G	FH Milan-6
Ex 2 c.185 C>T	T41M	p.T62M	FH Bari-4
Ex 3 c.265 T>C	C68R	p.C89R	FH Catanzaro-1
Ex 4 c.326 G>C	C88S	p.C109S	FH Savona-3
Ex 4 c.346 T>C	C95R	p.C116R	FH Alghero-1
Ex 4 c.352 G>T	D97Y	p.D118Y	FH Naples-3
Ex 4 c.362 G>T	C100F	p.C121F	FH Trento
Ex 4 c.367 T>C	S102P	p.S123P	FH Milan-7
Ex 4 c.401 G>T	C113F	p.C134F	FH Alessandria-1
Ex 4 c.402 C>G	C113W	p.C134W	FH Lucca
Ex 4 c.415 G>A	D118N	p.D139N	FH Sassari-2
Ex 4 c.418 G>A	E119K	p.E140K	FH Alghero-2
Ex 4 c.518 G>A	C152Y	p.C173Y	FH L'Aquila
Ex 4 c.551 G>A	C163Y	p.C184Y	FH Rome-2
Ex 4 c.593 C>T	S177L	p.S198L	FH Latina-1
Ex 4 c.662 A>G	D200G	p.D221G	FH Padua-1
Ex 4 c.665 G>A	C201Y	p.C222Y	FH Genoa-2
Ex 4 c.682 G>A	E207K	p.E228K	FH Modena/Reggio Cal-4
Ex 5 c.761 A>C	Q233P	p.Q254P	FH Catania-2
Ex 5 c.806 G>A	G248D	p.G269D	FH Rome-3
Ex 6 c.826 T>C	C255R	p.C276R	FH Ceva
Ex 6 c.826 T>G	C255G	p.C276G	FH Forlì
Ex 6 c.828 C>G	C255W	p.C276W	FH Sassari-3
Ex 6 c.829 G>A	E256K	p.E277K	FH Genoa-3
Ex 6 c.898 A>G	R279G	p.R300G	FH Vercelli
Ex 7 c.952 T>C	C297R	p.C318R	FH Perugia
Ex 7 c.953 G>T	C297F	p.C318F	FH Trieste
Ex 7 c.1056 C>G	C331W	p.C352W	FH Avellino-1
Ex 8 c.1090 T>C	C343R	p.C364R	FH Palermo-2
Ex 8 c.1109 A>C	N349T	p.N370T	FH Reggio Calabria-1
Ex 8 c.1118 G>A	G352D	p.G373D	FH Potenza-2
Ex 8 c.1130 G>C	C356S	p.C377S	FH Catania-5
Ex 8 c.1133 A>C	Q357P	p.Q378P	FH Rovigo-3
Ex 8 c.1135 T>C	C358R	p.C379R	FH Naples-1
Ex 9 c.1195 G>A	A378T	p.A399T	FH Nuoro-1
Ex 9 c.1211 C>T	T383I	p.T404I	FH Catania-3
Ex 9 c.1244 A>G	D394G	p.D415G	FH Padua-3
Ex 9 c.1274 G>C	R395P	p.R416P	FH Naples-6
Ex 9 c.1285 G>A	V408M	p.V429M	FH Catania-4/Genoa-6
Ex 9 c.1301 C>G	T413R	p.T434R	FH Sassari-4
Ex 10 c.1454 A>G	H464R	p.H485R	FH Milan-1
Ex 10 c.1463 T>A	I467N	p.I488N	FH Piacenza
Ex 10 c.1466 A>G	Y468C	p.Y489C	FH Taranto
Ex 10 c.1468 T>G	W469G	p.W490G	FH Asti-2
Ex 10 c.1532 T>C	L490S	p.L511S	FH Rome-4
Ex 10 c.1567 G>A	V502M	p.V523M	FH Bari-2
Ex 11 c.1644 T>A	N527K	p.N548K	FH Naples-11
Ex 14 c.2088 C>G	C675W	p.C696W	FH Caserta

segue

continua

Mutation	Receptor (1)	Receptor (2)	Designation
Ex 14 c.2132 G>A	C690Y	p.C711Y	FH Ischia
Ex 16 c.2375 T>C	I771T	p.I792T	FH Palermo-5
Ex 10 c.1586 G>A	G508D	p.G529D	FH Genoa-4
Ex 11 c.1646 G>A	G528D	p.G549D	FH Palermo-1
Ex 11 c.1694 G>T	G544V	p.G565V	FH Naples-2
Ex 12 c.1721 G>A	R553H	p.R574H	FH Palermo-4
Ex 12 c.1735 G>T	D558Y	p.D579Y	FH Casale Monferrato
Ex 12 c.1775 G>A	G571E	p.G592E	FH Foggia-1/Genoa-7
Ex 13 c.1892 C>A	A610D	p.A631D	FH Como
Ex 13 c.1897 C>T	R612C	p.R633C	FH Palermo-6
Ex 13 c.1978 C>A	Q639K	p.Q660K	FH Latina-2
Ex 14 c.2054 C>T	P664L	p.P685L	FH Frosinone-1
Ex 17 c.2483 A>G	Y807C	p.Y828C	FH Bari-1

MUTAZIONI NONSENSEN

Mutation	Receptor (1)	Receptor (2)	Designation
Ex 2 c.97 C>T	Q12X	p.Q33X	FH Milan-4
Ex 2 c.103 C>T	Q14X	p.Q35X	FH Milan-3
Ex 3 c.301 G>T	E80X	p.E101X	FH Imperia
Ex 3 c.304 C>T	Q81X	p.Q102X	FH Rapone
Ex 4 c.373 C>T	Q104X	p.Q125X	FH Foggia-2
Ex 4 c.418 G>T	E119X	p.E140C	FH Campobasso
Ex 4 c.465 C>A	C134X	p.C155X	FH Naples-5
Ex 6 c.862 G>T	E267X	p.E288X	FH Milan-2
Ex 8 c.1104 C>A	C347X	p.C368X	FH Cuneo-2/ Arezzo/Eboli
Ex 9 c.1252 G>T	E397X	p.E418X	FH Aosta
Ex 9 c.1257 C>G	Y398X	p.Y419X	FH Caltanissetta-2
Ex 10 c.1449 G>A	W462X	p.W483X	FH Naples-10
Ex 12 c.1798 G>T	E579X	p.E600X	FH Sassari-5
Ex 15 c.2308 C>T	Q749X	p.Q770X	FH Mondovì

DELEZIONI/INSERZIONI PUNTIFORMI

Mutation	Receptor (1)	Receptor (2)	Designation
Ex 4 c.366-7 ins C	S102LFsX108	p.S123LFsX129	FH Rimini
Ex 4 c.557 del G	R164VFsX183	p.R185VFsX204	FH Ferrara-1
Ex 4 c.616-7 ins A	S185KFsX196	p.S206KFsX217	FH Pontedera
Ex 4 c.648 ins T	D196X	p.D219X	FH Reggio Calabria-2
Ex 8 c.1067 del A	D335VFsX348	p.D356VFsX369	FH Cuneo-1
Ex 12 c.1778 del G	G572AFsX643	p.G572AFsX643	FH Sassari-1
Ex 17 c.2416-7 ins G	V785GFsX794	p.V806GFsX815	FH Naples-9

DELEZIONI/INSERZIONI PICOLE

Mutation	Receptor (1)	Receptor (2)	Designation
Ex 1 c.27_37 del 11	R-13FsX	p.R9FsX24	FH Catanzaro-2
Ex 2 c.130-1 insGT	W23CFsX185	p.W44CFsX206	FH Milan-5
Ex 4 c.623_644 del 22	E187AFsX236	p.E208AFsX257	FH Asti-1
Ex 4 c.681-2 ins 18	C201-D206 dupl	p.C222-D227 dupl	FH Padua-4
Ex 4 c.682-684 delc.681-2 ins 6	E207 del 206-208 ins CK 227-229 ins CK	p.E228 del	FH Chieti-3
Ex 4 c.684-5 ins 21	E207 ins 7 aa	p.E228 ins 7 aa	FH Reggio Calabria-3
Ex 8 c.1068 T>Ac.1065-6 ind 18	D335E335 insECQDPD	p.D356E356 ins ECQDPD	FH Chieti-2
Ex 8 c.1078_1081 delAGGATC	Q338, D339 del	Q356, D360 del	FH Turin-1
Ex 8 c.1119-1122 dupl TGGC	Y354WFsX360	p.Y375WFsC381	FH Pisa/Turin-2
Ex 8 c.1120-1123duplGGCT	Y354WFsX360	p.Y375WFsC381	FH Savona-4
Ex 11 c.1296_1298 del GGA	D412 del	p.D433 del	FH-Alessandria-2
Ex 10 c.1374-5 del AG	R437SFsX444	p.R458SFsX465	FH Ancona
Ex 10 c.1418-1419duplACAT	Q453HFsX515	p.Q474HFsX536	FH Savona-1
Ex 10 c.1439_1449 del 11	A459FsX510	p.A480FsX531	FH Reggio Emilia
Ex 10 c.1478-1479 del CT	S472CFsX513	p.S493CFsX534	FH Frosinone-2
Ex 11 c.1698_1704 delc.1697 ins 7	545-547ITL>MPN	p.566-568ITL>MPN	FH Nalpes-7
Ex 12 c.1749-1753del CTCCA	S563LFsX579	p.S584LFsX600	FH Savona-2

MUTAZIONI DI SPLICING

Mutation	Receptor	Designation
IVS3 c.313 +1 g>a	In frame del	FH Olbia
IVS3 c.313 +5 g>a	?	FH Naples-4
IVS7 c.1061 -8 t>c	?	FH Rovigo-2
IVS8 c.1187 -1 g>a	?	FH Genoa-5
IVS10 c.1586 +1 g>a	In frame delIn frame ins	FH Agrigento-1
IVS11 c.1706 -10 g>a	?	FH Nuoro-2/Rovigo-1
IVS12 c.1846 -1 g>a	TruncatedIn frame del	FH Avellino-2
IVS14 c.2140 +5 g>a	?	FH Varese
IVS15 c.2311 +1 g>a	TruncatedIn frame ins	FH Benevento
IVS15 c.2312 -3 c>a	?	FH Naples-8
IVS16 c.2389 +1 g>a	In frame ins	FH Monfalcone
IVS16 c.2389 +5 g>a	?	FH Ferrara-2
IVS16 c.2390 -1 g>a	?	FH Agrigento-2

Abbreviazioni. Ex: esone; Int: introne; IF: ipercolesterolemia familiare; MS: Membrane Spanning; CT Cytoplasmatic Tail; CF Classe Funzionale, 1 (allele nullo), 2A (completo trasporto difettivo), 2B (parziale trasporto difettivo), 3 (legame difettivo), 4 (internalizzazione citoplasmatica difettiva), 5 (riciclo difettivo)

SOMMARIO DELLE MUTAZIONI DEL GENE LDLR TROVATE AD OGGI NEGLI FH ITALIANI

<i>Riarrangiamenti Grossolani</i>	
Delezioni	12
Inserzioni	4
<i>Piccole Mutazioni</i>	
Delezioni	8
Delezioni/Inserzioni	2
Inserzioni	7
<i>Mutazioni Puntiformi</i>	
Delezioni	3
Inserzioni	4
Missenso	64
Nonsense	14
Giunzioni di Splice	15
TOTALI	133

APPENDICE E

Citazioni bibliografiche di rilievo per le mutazioni FH trovate in Italia

Bertolini S, Lelli N, Coviello DA, Ghisellini M, Masturzo P, Tiozzo R, Elicio N, Gaddi A, Calandra S. A large deletion in the LDL- receptor gene- the cause of familial hypercholesterolemia in three Italian families: a study that dates back to the 17th century (FH-Pavia). *Am J Hum Genet* 1992;51:123-34.

Bertolini S, Patel DD, Coviello DA, Lelli N, Ghisellini M, Tiozzo R, Masturzo P, Elicio N, Knight BL, Calandra S. *J Lipid Res* 1994;35:1422-30.

Bertolini S, Garuti R, Lelli N, Rolleri M, Tiozzo RM, Ghisellini M, Simone ML, Masturzo P, Stefanutti C, Coviello DA, Carabbio C, Orecchini G, Calandra S. Four Novel Partial Deletion of LDLReceptor Gene in Italian Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:81-8.

Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rolleri M, Calandra S. Analysis of LDL Receptor Gene Mutations in Italian Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19:408-18.

Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, Calandra S, Bertolini S. Simple detection of a point mutation in LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in southern Italy by allele-specific polymerase chain reaction. *Journal of Lipid Research* 1998;39:1101-5.

Cassanelli S, Bertolini S, Rolleri M, De Stefano F, Casarino L, Elicio N, Naselli A, Calandra S. A 'de novo' point mutation of the low- density lipoprotein receptor gene in an Italian subject with primary hypercholesterolemia. *Clin Genet* 1998;53:391-5.

Deiana L, Garuti R, Pes GM, Carru C, Errigo A, Rolleri M, Pisciotto L, Masturzo P, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. Influence β 0- Thalassemia on the Phenotypic Expression of Heterozygous familial Hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20:236-43.

De Mattei S, Rolleri M, Garuti R, Ginocchio E, Masturzo P, Martini S, Casella F, Baggio G, Calandra S, Bertolini S. Variable phenotypic expression of the mutation Padua-1 of LDL-R gene in homozygous patients. *Atherosclerosis* 1997;134:70.

De Mattei S, Rolleri M, Masturzo P, Fascetti V, Elicio N, Motti C, Cortese C, Calandra S, Bertolini S. A founder -related LDL-receptor gene mutation in the Liguria region of Italy. *Atherosclerosis* 1997;134:66.

Fascetti V, Rolleri M, Guido V, Trovatiello G, Masturzo P, Garuti R, Motti C, Cortese C, Cantafora A, Calandra S, Bertolini S. FH clusters in southern Italy. *Atherosclerosis* 1997;135(Suppl 1):S12.

Garuti R, Lelli N, Barozzini M, Tiozzo R, Ghisellini M, Simone ML, Li Volti S, Garozzo R, Mollica F, Vergoni W, Bertolini S, Calandra S. Two novel partial deletions of LDL-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia (FHSiracusa and FH Reggio Emilia). *Atherosclerosis* 1996;121:105-17.

Garuti R, Rolleri M, Bertolini S, De Stefano F, Casarino L, Calandra S. A de novo point mutation of LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 1997;134:167.

Ginocchio E, Rolleri M, Garuti R, Masturzo P, Guido V, Elicio N, Cortese C, Motti C, Calandra S, Bertolini S. New minute or point mutations of LDL-receptor gene in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1997;133:273.

Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Williams SS, Childs B, et al. (Ed.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease* New York: McGraw-Hill, Inc.; 1995. p. 1981-2030.

Lelli N, Calandra S, Gaddi A, Ciarrocchi A, Bertolini S. Duplication of exons 13, 14 and 15 of the LDL-receptor gene in a patient with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 1991;89:359-62.

- Lelli N, Ghisellini M, Gualdi R, Tiozzo R, Calandra S, Gaddi A, Ciarrocchi A, Arca M, Fazio S, Coviello DA, Bertolini S. Characterization of three mutations of the low density lipoprotein receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991;11:234-43.
- Lelli N, Garuti R, Zambelli F, Cassanelli S, Corsini A, Bertolini S, Riva E, Ortisi MT, Bellù R, Calandra S. Alternative splicing of mutant LDL-receptor mRNA in an Italian patient with Familial Hypercholesterolemia due to a partial deletion of LDL-receptor gene (FH Potenza). *J Lipid Res* 1993;34:1347-54.
- Lelli N, Garuti R, Pedrazzi P, Ghisellini M, Simone ML, Tiozzo R, Cattin L, Valenti M, Rolleri M, Bertolini S, Stefanutti C, Calandra S. A new missense mutation (Cys 297→ Phe) of the low density lipoprotein receptor in Italian patients with familial hypercholesterolemia (FHTrieste). *Human Genetics* 1994;93:538-54.
- Lelli N, Garuti R, Ghisellini M, Tiozzo R, Rolleri M, Aimale V, Ginocchio E, Naselli A, Bertolini S, Calandra S. Occurrence of multiple aberrantly spliced mRNAs of the LDL-receptor gene upon a donor splice site mutation that causes familial hypercholesterolemia (FHBenevento). *J Lipid Res* 1995; 36: 1315-1324.
- Maioli M, Melis MG, Pacifico A, Secchi G, Manconi A, Pintus P, Zuliani G, Fellin R, Leitersdorf E. The FH-Elverum mutation causes familial hypercholesterolemia in northeastern Sardinia. *Atherosclerosis* 1997;134:70.
- Patel DD, Lelli N, Garuti R, Li Volti S, Bertolini S, Knight BL, Calandra S. Analysis of two duplications of the LDL receptor gene affecting intracellular transport, catabolism, and surface binding of the LDL receptor. *J Lipid Res* 1998;39:1466-75.
- Rampa P, Motti C, Trovatiello G, Bernardini S, Massoud R, Fucci G, Federici G, Calandra S, Bertolini S, Cortese C. A tetranucleotide insertion in exon 8 of LDL-receptor gene in an Italian FH-patient. *Atherosclerosis* 1997;135Suppl.1:S19.

APPENDICE F

Elenco dei polimorfismi interni al gene LDLR

Localizzazione	Variazione	Enzimi di Restrizione
Estone 2	C>T al nucleotide 81	SfnaI
Introne 3		ApaLI
Estone 4	G>T al nucleotide 324	MaellI
Introne 4		TaqI
Introne 6		SphI
Estone 7	C>T al nucleotide 1056	Artificial CfoI
Introne 7	G>C al nucleotide 1060+10	SmaI
Estone 8	A>G al nucleotide 1170	StuI
Introne 9	C>T al nucleotide 1359-29	HhaI
Estone 10	G>A al nucleotide 1413	
Estone 11C>T al nucleotide 1617	Artificial StuI	
Estone 12	T>C al nucleotide 1773	HincII
Estone 12	C>T al nucleotide 1725	
Introne 12		BstEII
Estone 13	C>T al nucleotide 1959	Avall
Estone 14	C>A al nucleotide 2029	
Estone 15	G>A al nucleotide 2231	MspI
Introne 15		SpeI
Introne 15		ApaLI
Introne 15	A>G	PvuII
Estone 18	G>A al nucleotide 2635	MspI
Estone 18		NcoI
Estone 18	(TA) _n al nucleotide 4780	HVR-TA

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2006 (n. 3) 5° Suppl.