

**PROGETTO DI RICERCA SVOLTO IN COLLABORAZIONE TRA LA SEZIONE DI BIOCHIMICA CLINICA DEL DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE CELLULARI ED EMATOLOGIA E IL CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER LA FIBROSI CISTICA DEL DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA, "SAPIENZA" UNIVERSITÀ DI ROMA**

**L'Associazione Laziale Fibrosi Cistica ha messo a disposizione una borsa di studio per lo svolgimento del progetto.**

**TITOLO: Individuazione di alleli complessi e caratterizzazione funzionale di varianti genomiche nello studio del rapporto tra genotipo e fenotipo in forme tipiche e atipiche di Fibrosi Cistica**

Come l'anno precedente, anche questo anno di progetto è stato sviluppato in collaborazione tra il Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica del Lazio, Istituto di Clinica Pediatrica, e la Sezione di Biochimica Clinica, Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia; entrambe sono strutture della "Sapienza" Università di Roma. Nell'ultimo anno di progetto l'Associazione Laziale Fibrosi Cistica ha sostenuto con una borsa di studio la Dott.ssa Silvia Pierandrei che ha proseguito le ricerche intraprese nell'anno precedente. Uno degli scopi di questo anno di progetto è stato quello di automatizzare la procedura a 3 fasi, ottimizzata nel periodo progettuale precedente, per la ricerca delle mutazioni del CFTR. Tale procedura è stata quindi applicata a forme sia tipiche che atipiche di FC ottenendo la caratterizzazione genetica completa (2 mutazioni su 2 differenti alleli) della maggior parte dei pazienti analizzati. Un risultato rilevante è stato il ritrovamento, e la parziale caratterizzazione funzionale, di alcuni alleli complessi (con più di una mutazione sullo stesso allele) che possono spiegare la variabilità clinica riscontrata nella FC. In una forma atipica, da noi proposta, di questa malattia è stato anche ritrovato uno specifico aplotipo (insieme di variazioni della sequenza del DNA sullo stesso allele). Questi studi sono estremamente utili per comprendere meglio il rapporto tra il genotipo e il fenotipo nella Fibrosi Cistica, ma anche per una migliore definizione dell'aspetto diagnostico, prognostico e terapeutico.

I principali risultati conseguiti vengono riportati di seguito, suddivisi nei diversi obiettivi del progetto.

**1) Automazione della procedura di sequenziamento completo per la caratterizzazione genetica di pazienti affetti da FC.**

La nostra procedura di sequenziamento completo di tutti gli esoni e delle relative zone introniche del CFTR, precedentemente messa a punto, prevede l'amplificazione e il sequenziamento dei due filamenti del DNA di ciascuna zona in formato 96-well, permettendo di analizzare contemporaneamente 8 esoni relativi a 11 soggetti più un bianco. Questa metodica contempla la produzione di trenta ampliconi che vengono suddivisi in tre gruppi da 8 esoni più un gruppo da 6, in base alle affinità delle temperature di appaiamento dei primer. In questo progetto, per automatizzare tale protocollo è stata acquisita, grazie ad un finanziamento "Grandi Apparecchiature di Ateneo" della "Sapienza" Università di Roma, una postazione automatizzata (liquid handler) Microlab StarLet (Hamilton Robotics). Il nostro liquid handler Hamilton è in grado di preparare tutte le reazioni, utilizzando 4 canali analitici, a partire dal DNA genomico fino all'elettroforesi capillare con notevole risparmio di tempo e riduzione degli errori. L'apparecchio è stato programmato per l'allestimento delle piastre di PCR, per preparare i campioni per l'elettroforesi, per il trattamento di purificazione e del cycle sequencing. I campioni sono quindi caricati su un plate ottico, pronti per essere trattati dall'Analizzatore Genetico automatizzato ABI PRISM 3100 *Avant*. Una volta programmato l'apparecchio, sono stati effettuati l'ottimizzazione, il test e la validazione dell'automazione (le metodiche non automatizzate erano già state da noi validate).

Grazie a questo lavoro di automazione dell'intera metodologia di sequenziamento del CFTR, è stata ottenuta una procedura rapida, con un'elevata capacità di individuazione delle mutazioni e con costi contenuti (circa 250 euro di reagenti per paziente). Ciò è particolarmente importante anche in relazione all'individuazione di alleli complessi (vedere la relativa sezione) che necessita di un approccio ad alta produttività.

A questo impegno del nostro gruppo nell'automazione delle ricerche mutazionali nel CFTR è stato dato particolare rilievo durante la V Convention d'autunno dei ricercatori FC, organizzata dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica e tenutasi a Verona il 26 e 27 ottobre del 2007; in particolare l'importanza di questo approccio è stata sottolineata dal Prof. Luzzatto durante il suo intervento introduttivo. Metodologie di questo tipo aprono la strada allo screening genetico per la FC nella popolazione adulta, progetto al quale sarà interessato il nostro gruppo a livello nazionale.

I risultati di questi studi sono stati inoltre presentati alla 31<sup>st</sup> European Cystic Fibrosis Conference, tenuta dall'11 al 14 giugno 2008 a Praga.

## **2) Estensione della caratterizzazione genetica in pazienti affetti da FC in forma tipica (di nuovo arruolamento presso il Centro FC o facenti parte di quei pochi non ancora completamente caratterizzati) e indagine della segregazione allelica nei genitori.**

In totale sono stati analizzati ulteriori 48 soggetti, che sono stati sottoposti a estensione in modo da completarne il genotipo, risultato incompleto in seguito all'analisi di I livello mediante CF-OLA (Abbott, test delle 32 mutazioni) e al successivo saggio regionale CF-SNAP+20, e ai quali non era ancora stato applicato il protocollo esteso. In questi casi è stata applicata la nostra procedura automatizzata di sequenziamento esteso in formato 96-well, ricercando le mutazioni in gruppi di esoni pre-selezionati, in maniera sequenziale (per un criterio di economicità). In caso di ulteriore negatività, anche dopo tale estensione della ricerca genetica, si è indagato il tratto polimorfico (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub>. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software SeqScape. I risultati hanno confermato nei soggetti eterozigoti la presenza delle mutazioni già note dalle analisi precedenti, e hanno reso possibile il completamento del genotipo in 19 pazienti. Tutte le mutazioni trovate con il sequenziamento sono state confermate a partire da una seconda aliquota di sangue. In seguito a contatto con le famiglie degli affetti analizzati, e grazie alla loro disponibilità a effettuare un prelievo di sangue presso il Centro FC, è stata verificata la segregazione allelica, confermando in tutti pazienti analizzati che le mutazioni si trovano su 2 alleli diversi, condizione necessaria affinché siano causa di malattia. In particolare sono state trovate 17 mutazioni (in 19 alleli): M1V, P5L (2 alleli), H199R, D192G, C276X, M394R, E585X, V562I (2 alleli), L571S, 574delA, D614G, R764X, 991del5, A1006E, Y1032X, R1066H, A1234V.

Per gli affetti rimasti incompleti nonostante l'estensione genetica, è possibile ipotizzare la presenza di una mutazione pienamente intronica o di una delezione, non indagabili con le nostre tecniche. Al fine di completarne il genotipo, tali pazienti saranno inseriti in un livello successivo di indagine, nel quale verranno ricercate, con opportune metodiche, mutazioni pienamente introniche e delezioni.

Oltre a soggetti con chiara diagnosi di FC, sono state analizzate anche famiglie nelle quali sono presenti neonati eterozigoti per una mutazione classica del CFTR, provenienti da screening neonatale, con sospetta FC ma diagnosi incerta. In queste famiglie si procede all'analisi mutazionale estesa del genitore negativo (per evitare di effettuare un prelievo al neonato). In 2 di questi casi, le mamme hanno mostrato al sequenziamento un genotipo eterozigote per una mutazione rara del CFTR, in particolare la L206W e la A613T. Il passo successivo è di procedere

ad una attenta valutazione funzionale delle mutazioni rare trovate (anche in base ai dati disponibili in letteratura), per poter definire la diagnosi.

Grazie a questi studi è ormai finita (a meno di casi molto particolari) la caratterizzazione genetica di tutti i pazienti seguiti presso il Centro FC ed è anche pienamente operativa la procedura di caratterizzazione genetica dei pazienti di nuovo arruolamento. L'individuazione del pattern mutazionale completo del CFTR nella nostra Regione e la messa a punto da parte nostra di un metodo rapido, multistep e relativamente economico, di ricerca mutazionale costituisce un'importante premessa per iniziare un progetto pilota di screening genetico del CFTR nella popolazione adulta in età riproduttiva del Lazio. Questo progetto riceve ormai, a livello nazionale, ampio consenso e si sta costituendo un gruppo nazionale, all'interno del quale il nostro lavoro è particolarmente apprezzato, per il passaggio alla fase operativa. Sui risultati della caratterizzazione genetica dei pazienti con forma tipica di FC è in preparazione un lavoro a stampa per una rivista internazionale.

### **3) Individuazione di alleli complessi (con più di una mutazione sullo stesso allele) e mutazioni particolari in pazienti affetti da forma tipica di FC.**

Durante queste ricerche sono stati evidenziati diversi casi particolari, tra i quali quelli relativi alla presenza di alleli complessi (con più di una mutazione sullo stesso allele) risultano i più interessanti, poiché aprono nuove prospettive nello studio del rapporto tra genotipo e fenotipo nella FC. A questo riguardo sono stati individuati 3 diversi alleli complessi (distribuiti in 6 diverse famiglie); in molti di questi casi sia il valore del test del sudore che la gravità della malattia ben correlano con la presenza della mutazione in *cis* (aggiuntiva sullo stesso allele). Ciò costituisce un importante avanzamento delle conoscenze per il chiarimento del rapporto tra genotipo e fenotipo nella FC: nei casi di discrepanza tra la gravità clinica della malattia ed il genotipo (inteso come le prime 2 mutazioni trovate, su 2 diversi alleli) andrebbero ricercate mutazioni aggiuntive che possano essere responsabili delle manifestazioni cliniche più gravi rispetto all'atteso. Questo ha anche una ricaduta sulle modalità di ricerca mutazionale adottate finora (a livello nazionale ed internazionale) che prevedono la fine della ricerca mutazionale qualora vengano trovate 2 mutazioni su 2 alleli diversi; alla luce dei nostri risultati questo approccio mostra evidenti limiti.

#### **Caso 1 – L'allele complesso (TG)<sub>12</sub>T<sub>5</sub> – 4374+13A->G**

Un paziente, in seguito al test CF-OLA, è risultato portatore della mutazione  $\Delta F508$ , presentando tutti i sintomi classici di FC. Dunque ci si aspettava di trovare un'altra mutazione "classica" che potesse spiegare tale fenotipo. In realtà, le uniche variazioni messe in evidenza in seguito alla scansione completa del gene, sono il tratto polimorfico (TG)<sub>12</sub>T<sub>5</sub>, localizzato nell'introne 8, nelle vicinanze del sito accettore di splicing dell'esone 9 del gene CFTR, e noto per influenzare l'attività residua del gene incrementando lo splicing anomalo di tale esone, e la variazione di sequenza 4374+13A→G, localizzata nell'introne 23 e dall'incerto significato funzionale. Tale situazione risulta abbastanza singolare in un soggetto affetto dalla forma classica di FC sottoposto a sequenziamento completo.

Altri studi saranno necessari per caratterizzare questo allele complesso, con particolare riguardo al ruolo della variazione di sequenza 4374+13A→G. Tutto ciò richiama comunque l'attenzione sul fatto che il tratto (TG)<sub>12</sub>T<sub>5</sub> possa essere coinvolto non solo nell'insorgenza di forme atipiche di FC ma possa causare, eventualmente inserito in alleli complessi, anche forme gravi di questa malattia.

## Caso 2 – L'allele complesso (TG)<sub>11</sub>T<sub>5</sub> - V562I - A1006E

In due soggetti affetti da forma tipica di FC (senza relazione di parentela), è stata evidenziata la presenza di tre mutazioni, la  $\Delta F508$  (esone 10), la V562I (esone 12) e la A1006E (esone 17a), più il tratto polimorfico (TG)<sub>11</sub>T<sub>5</sub> (causa di parziale splicing anomalo) e alcune variazioni di sequenza (M470V, 1898+152T/A). Per capire come le mutazioni erano distribuite sui due alleli sono stati analizzati i genitori. In seguito agli studi di segregazione il genotipo dei due pazienti è risultato così costituito:

- Paziente 1:  $\Delta F508$  (allele paterno) / (TG)<sub>11</sub>T<sub>5</sub>-V562I-A1006E (allele materno)
- Paziente 2:  $\Delta F508$  (allele materno) / (TG)<sub>11</sub>T<sub>5</sub>-V562I-A1006E (allele paterno)

Per escludere la presenza di altre mutazioni il CFTR di questi pazienti è stato sequenziato completamente. La presenza di questo allele complesso in entrambi i pazienti, i quali mostrano la forma clinica classica di FC, in concomitanza con l'assenza di altre mutazioni a effetto patologico noto riscontrata nel corso del sequenziamento completo, ci induce a pensare che sia esso stesso causa di malattia. E' stato richiesto ai pazienti e ai loro familiari di sottoporsi a un prelievo di cellule dell'epitelio nasale mediante brushing, in modo da poter effettuare studi di espressione per analizzare il meccanismo molecolare alla base del ruolo patogenetico dell'allele complesso.

## Caso 3 – L'allele complesso R117L – L997F

Di particolare interesse è l'analisi di un gruppo di soggetti che presentano la mutazione L997F. L'effetto funzionale di tale mutazione è assai controverso; alcuni studi la considerano una vera e propria mutazione causa di patologia (sebbene in alcuni casi lieve), altri studi la considerano un polimorfismo non causa di malattia. I nostri dati, relativi a 11 pazienti FC con questa mutazione, rivelano una grande variabilità clinica: da forme oligosintomatiche a forme classiche.

Per spiegare questa estrema variabilità fenotipica è stata da noi avanzata l'ipotesi che, nei pazienti con fenotipo più severo, possa essere presente una terza mutazione in *cis* con la L997F che spiegherebbe quindi la maggior gravità delle condizioni cliniche. Al contrario, nei pazienti con fenotipo mild non dovrebbero essere presenti altre mutazioni, eccetto quelle già note. Per confermare la nostra ipotesi abbiamo quindi sottoposto questi 11 soggetti al sequenziamento esteso, nonostante il loro genotipo potesse essere considerato completo. I risultati ottenuti, sembrano confermare l'ipotesi da noi formulata in quanto in 3 tra i soggetti esaminati, i quali presentano un fenotipo più severo rispetto agli altri, è stata trovata la mutazione R117L in tutti e tre i casi sullo stesso allele della L997F. Ciò che è possibile ipotizzare è che nei soggetti con genotipo eterozigote composto, costituito da una mutazione classica su un allele e la R117L in *cis* con la L997F sull'altro, le manifestazioni cliniche più gravi siano imputabili all'azione congiunta che esplicano la R117L e la L997F.

Anche i risultati di questi studi sono stati presentati alla 31<sup>st</sup> European Cystic Fibrosis Conference, tenuta dall'11 al 14 giugno 2008 a Praga (con selezione del poster per presentazione orale durante la visita guidata ai poster).

In un caso particolare, nella madre di un affetto è stata riscontrata la presenza del tratto variante (TG)<sub>13</sub>T<sub>5</sub> e di una nuova mutazione complessa nell'esone 6b, etichettata provvisoriamente come 907delC - ins(29) che, ad una analisi preliminare, consisterebbe nella delezione di una citosina e nella contemporanea inserzione di 29 basi a livello del nucleotide 907. Tale mutazione, tuttavia, deve ancora essere indagata approfonditamente mediante clonaggio, per accertare definitivamente la sua esatta composizione. Al momento non sappiamo se la nuova mutazione si trovi sullo stesso allele del (TG)<sub>13</sub>T<sub>5</sub>, per averne la certezza sarà necessario effettuare la

segregazione allelica nei genitori della madre dell'affetto. Sarà inoltre necessario verificare la trasmissione della mutazione e/o del tratto variante all'affetto; inoltre sarà necessario valutare funzionalmente questa nuova mutazione, in modo da comprendere se costituisca la base della patologia.

Un'indicazione chiara emerge da questi risultati. Nel rapporto tra genotipo e fenotipo gli alleli complessi giocano un ruolo da protagonisti. Per poter selezionare il maggior numero di alleli complessi con significato funzionale è necessario disporre di casistiche estremamente specifiche. Noi abbiamo già organizzato 2 iniziali casistiche di soggetti con mut / 12-5 e mut / L997F. Quest'ultima in particolare ha già dato i suoi frutti permettendo l'individuazione di un allele complesso particolarmente significativo. E' indispensabile procedere alla selezione di altre casistiche simili basate sulla presenza di una mutazione comune e di elevata variabilità fenotipica.

Le variazioni di sequenza in *cis* su uno stesso allele, spesso influenzano la maturazione e/o i livelli dei trascritti. E' auspicabile quindi poter condurre, sugli alleli complessi selezionati, anche studi funzionali, condotti ad esempio a partire dall'estrazione dell'RNA da campioni biologici (quali brushing nasale) e successiva indagine sia qualitativa in RT-PCR sia quantitativa in real-time PCR.

#### **4) studio degli aplotipi (combinazioni di variazioni nella sequenza del DNA che si trovano simultaneamente sullo stesso allele) e prosecuzione della caratterizzazione genetica in pazienti con ridotta fertilità per iperviscosità idiopatica del liquido seminale;**

Sono stati analizzati i dati sperimentali precedentemente ottenuti dal sequenziamento dell'esone 10 nella popolazione di maschi infertili per iperviscosità *sine causa* del liquido seminale (ISHV), relativi alla frequenza degli alleli M470 e V470 (1540 A/G). Inoltre, la popolazione ISHV è stata sottoposta al sequenziamento di altri due esoni, l'esone 14a e l'esone 24, per ricercare la presenza delle variazioni di sequenza 2694T/G (esone 14a) e 4521G/A (esone 24). Lo scopo del lavoro è stato quello di indagare la presenza di un particolare aplotipo, definito come una combinazione di variazioni nella sequenza del DNA che si trovano simultaneamente sullo stesso allele, eventualmente caratteristico di questa popolazione. Nell'analisi dell'aplotipo, sono state prese in considerazione, oltre a quelle sopracitate, le variazioni di sequenza 125G/C (5'UTR), 875+40A/G e (GATT)<sub>6/7</sub> (introne 6a), 1001+11C/T (introne 6b), 1898+152T/A (esone 12), 2751+86delTA e 2751+106T/A (introne 14a), 4700T<sub>8</sub>/T<sub>9</sub> (3'-UTR) e il tratto polimorfico (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub> (introne 8). L'analisi dei dati relativa a un totale di 40 soggetti ISHV (80 alleli) ha evidenziato la presenza di due specifici aplotipi che caratterizzano più del 58% degli alleli. Per definire una possibile specificità di questi aplotipi nell'ambito della popolazione ISHV si sono ricostruiti gli stessi aplotipi nella popolazione generale, in modo da poter confrontare le frequenze nell'ambito delle due popolazioni. Gli aplotipi sono i seguenti:

- I Aplotipo: 125G, 875+40A, (GATT)<sub>7</sub>, 1001+11C, (TG)<sub>11</sub>T<sub>7</sub>, 1540A, 2694T, 4521G  
Tale aplotipo è presente in 39 alleli su 80 negli ISHV e in 120 alleli su 206 nella popolazione generale; si presenta quindi con una frequenza del 48,8% nella popolazione ISHV e del 58,3% della popolazione generale.
- II Aplotipo: 125G, 875+40A, (GATT)<sub>6</sub>, 1001+11T, (TG)<sub>10</sub>T<sub>9</sub>, 1540G, 2694T, 4521G  
Tale aplotipo è presente con una frequenza del 12,5% nella nostra popolazione target (10 alleli su 80), mentre ha una frequenza del 4,9% nella popolazione di controllo (10 alleli su 206).

Dall'analisi statistica è emerso che l'aplotipo 1, che si presenta più o meno con la stessa frequenza nelle due popolazioni analizzate, difficilmente può essere implicato nella patologia. Di particolare interesse, invece, è l'aplotipo 2, trovato con una frequenza significativamente maggiore negli ISHV, rispetto alla popolazione di controllo. In questo caso è possibile che la presenza in *cis* delle variazioni di sequenza elencate, possa influire sulla maturazione del trascritto primario (pre-mRNA) del CFTR, ed andare a modulare (diminuire) la quantità di messaggero funzionale. Inoltre 9 aplotipi aggiuntivi (20 alleli, 25%) sono stati trovati solo negli ISHV, o con una frequenza doppia negli ISHV rispetto alla popolazione generale, ma il ridotto numero di casi non ha permesso una efficace analisi statistica. Dunque, dal punto di vista genetico, la popolazione ISHV sembra essere distinta dalla popolazione generale di controllo. Questo diverso pattern di varianti genomiche tra queste due popolazioni è un'ulteriore evidenza che queste possano giocare un ruolo nella patogenesi dell'infertilità per iperviscosità *sine causa* del liquido seminale.

Oltre alla ricostruzione degli aplotipi, sono stati sequenziati ulteriori 3 esoni (4, 7a, 17b), con le relative zone introniche adiacenti. Sono state messe in evidenza diverse variazioni di sequenza, alcune già note in letteratura, altre mai precedentemente descritte. In particolare, nell'introne 3 è stata trovata la mutazione 406-6 T/C, nell'esone 14a la mutazione V588I e nell'esone 17a la L997F, tutte descritte in letteratura come variazioni ad effetto patologico lieve, e ciò potrebbe confermare un loro ruolo principalmente nelle forme atipiche mono/oligosintomatiche di FC. Nell'introne 17b è stata messa in evidenza la variazione 3271+121delA, una variante genomica il cui significato patologico è incerto e ancora in discussione. Sempre nell'introne 17b è stato possibile evidenziare una nuova variazione di sequenza, la 3272-96 A/T, mai precedentemente descritta. Non essendo presenti informazioni in letteratura, non è noto se tale variazione sia una mutazione o un polimorfismo, dunque sarà necessario ricercare questa variazione di sequenza nella popolazione generale e calcolarne la frequenza, in modo da attribuirle o meno un eventuale ruolo patologico. L'importanza nello studio di queste varianti genomiche risiede nel fatto che nei soggetti con ISHV, queste variazioni di sequenza potrebbero costituire la base genetica della patologia, dunque richiedono di essere caratterizzate e sottoposte a un'analisi di frequenza utilizzando come controllo negativo la popolazione generale. D'altra parte queste stesse variazioni di sequenza potrebbero agire da modulatori dell'effetto fenotipico, se presenti in *cis* (sullo stesso allele) con mutazioni gravi, quindi in alleli complessi (vedere la sezione relativa) di pazienti affetti da forma grave di FC.

##### **5) Studio funzionale (a livello trascrizionale) del CFTR sia in linee cellulari che in pazienti affetti.**

Particolarmente laboriosa è risultata la messa a punto dei metodi di estrazione dell'RNA da campioni biologici prelevati da pazienti (ad esempio mediante brushing nasale) e la successiva analisi trascrizionale. Un primo aspetto ha riguardato il perfezionamento delle tecniche di estrazione dell'RNA sia da linee cellulari che da spermatozoi, linfociti, monociti, e cellule dell'epitelio nasale. Per aumentare la quantità e migliorare la qualità dell'RNA estratto, abbiamo scelto di adottare un nuovo kit di estrazione, comprendente un reagente protettore che ha la proprietà di stabilizzare l'RNA e di prevenire la degradazione del messaggero nei tessuti, preservandone, in tal modo, il pattern d'espressione. Questi metodi sono ora completamente ottimizzati e siamo in grado di effettuare l'analisi funzionale del trascritto del CFTR per l'analisi della presenza di fenomeni di maturazione (splicing) anomali. Tale analisi è una procedura particolarmente complessa che solo un ristretto numero di laboratori italiani è in grado di eseguire. Ciò pone la premessa per l'ingresso del nostro laboratorio, e quindi del Centro FC, in una possibile rete di laboratori italiani per lo studio di espressione del CFTR.

Grazie a queste tecniche abbiamo indagato, mediante RT-PCR, il pattern di espressione del CFTR in spermatozoi e preparazioni di linfociti e monociti (derivanti da sangue venoso periferico), per verificare se fosse possibile evidenziare un livello di espressione che non era stato rilevato precedentemente. Anche le cellule dell'epitelio nasale (derivanti da brushing) sono state

nuovamente studiate, per verificare l'attendibilità dei risultati ottenuti precedentemente. In più, abbiamo indagato l'espressione del CFTR nella linea cellulare H441 (cellule epiteliali derivanti da adenocarcinoma polmonare, in collaborazione con la Prof.ssa F. Ascenzioni del Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, "Sapienza" Università di Roma) e nella linea HACAT (cellule umane derivanti da cheratinociti immortalizzati, in collaborazione con la Prof.ssa C. Marchese, del Dip. di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma). L'espressione del gene CFTR risulta evidenziabile nell'epitelio nasale, il che conferma i risultati ottenuti in precedenza, e nella linea H441, ma non rilevabile nei linfociti, monociti, spermatozoi e linea HACAT. Come controllo di espressione è stato utilizzato il gene GAPDH, un gene housekeeping costitutivamente espresso. L'assenza di possibili contaminazioni è stata verificata mediante confronto di campioni trattati in presenza (RT+) e in assenza (RT-) di trascrittasi inversa. Dunque sia l'epitelio nasale che la linea H441 risultano essere sistemi sperimentali adatti allo studio dell'espressione del CFTR, in particolare in relazione alle mutazioni del CFTR presenti in pazienti con genotipo mutato, nel primo caso, o in relazione all'esposizione a sostanze con azione sul differenziamento, nel secondo caso.

Come esposto sopra, durante la caratterizzazione genetica dei pazienti FC è stata individuata, in due soggetti, la presenza dell'allele complesso  $(TG)_{11}T_5$ -V562I-A1006E. Avevamo richiesto ai pazienti e ai loro familiari di sottoporsi a un prelievo di cellule dell'epitelio nasale mediante brushing, in modo da poter effettuare studi di espressione per analizzare il meccanismo molecolare alla base del ruolo patogenetico dell'allele complesso. Dai campioni prelevati, è stato estratto l'RNA che, in seguito a controllo elettroforetico su gel d'agarosio per verificarne la purezza e l'integrità, è stato sottoposto a RT-PCR. È stata condotta l'analisi trascrizionale dell'allele complesso; in particolare abbiamo analizzato la zona relativa alla mutazione V562I, che cade nell'esone 12, la zona della A1006E (esone 17a), nonché le zone degli esoni 11 – 15 e quella relativa all'esone 6b. Il risultato ottenuto non ha evidenziato, per le zone in questione, splicing anomali. Tuttavia, abbiamo indagato anche la zona dell'esone 9, in modo da verificare quanto la presenza del tratto  $(TG)_{11}T_5$  possa incrementare lo splicing anomalo di tale esone. Sorprendentemente è stato riscontrato uno splicing pressoché completo dell'esone 9 (con assenza quindi di proteina funzionale) nel soggetto con il tratto  $(TG)_{11}T_5$  rispetto ad un controllo senza tale tratto. Ciò è sorprendente poiché finora non era mai stata evidenziata una così elevata produzione di messaggero anomalo a partire da questo tratto. Ciò può costituire la base della patologia. In ogni caso, il ruolo dell'allele complesso rispetto a quello della singola variazione  $(TG)_{11}T_5$ , è tutto da indagare.