

**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**

UNIVERSITA' DI ROMA "LA SAPIENZA"

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

INTRODUZIONE

La metodologia a 3 fasi (analisi di I livello mediante il pannello di 33 mutazioni CF-OLA (eseguito presso il Centro Regionale di Riferimento FC) -> analisi di un pannello integrativo regionale di mutazioni mediante saggio CF-SNAP+20 -> sequenziamento completo di tutti gli esoni, relative zone introniche adiacenti e zona al 5'-flanking) è ormai consolidata e mostra ottimi risultati in termini di genotipi mutati completi individuati. Infatti, la caratterizzazione genetica completa di tutti i pazienti affetti da forme tipiche di FC e afferenti al Centro di Riferimento Regionale volge ormai al termine. In questi anni sono stati presi in considerazione un totale di 418 pazienti. Solo a 17 di questi pazienti deve ancora essere applicato il test di II livello, risultando quindi ancora incompleto il loro genotipo. Oltre a questi pazienti con forme tipiche di FC, soprattutto negli ultimi 2 anni sono stati analizzati anche un gran numero di soggetti con forme atipiche di questa malattia. In realtà, all'analisi dei soggetti con forme atipiche o incertezza diagnostica è attualmente rivolta la maggior parte dell'indagine mutazionale estesa. Per questi soggetti, la sola caratterizzazione mutazionale (a livello del DNA) non è sempre conclusiva, profilandosi spesso la necessità di una ulteriore caratterizzazione funzionale (ad esempio a livello dell'RNA) delle numerose variazioni di sequenza che vengono rilevate grazie alla crescente sensibilità delle tecniche utilizzate.

SCOPO GENERALE

Lo scopo generale di questo progetto è il raggiungimento della completa caratterizzazione strutturale (ritrovamento di 2 mutazioni in alleli diversi) del CFTR nei soggetti con forme tipiche e atipiche di FC afferenti al Centro di Riferimento Regionale (e non completamente caratterizzati dalle indagini mutazionali di I livello), nonché la caratterizzazione funzionale delle varianti genomiche di incerto significato. Gli studi strutturali verranno effettuati nei soggetti di nuovo arruolamento presso il Centro di Riferimento (essendo praticamente completate le indagini sui soggetti già afferenti al Centro); gli studi funzionali riguarderanno sia soggetti già studiati e nei quali alcune varianti genomiche sono state già individuate, che soggetti di nuova diagnosi nei quali tali varianti venissero eventualmente individuate. Particolare attenzione sarà rivolta alla definizione del rapporto tra genotipo (le mutazioni del CFTR) e il fenotipo (le manifestazioni cliniche), anche in relazione alla eventuale presenza di alleli complessi.

OBIETTIVI SPECIFICI

Gli obiettivi specifici del progetto sono i seguenti.

1) Verrà condotta, con il nostro metodo integrato a 3 step, l'analisi mutazionale estesa del gene CFTR in soggetti con diagnosi di FC in forma tipica e/o atipica nonché in soggetti con incertezza diagnostica. Questo obiettivo sarà mirato innanzitutto al completamento del genotipo di quei pochi soggetti non ancora completati dal punto di vista genetico ma già afferenti al Centro di Riferimento Regionale; verranno inoltre sottoposti all'estensione genetica tutti quei soggetti, con le caratteristiche indicate di seguito, che nell'arco dell'anno di progetto verranno arruolati presso il Centro di Riferimento. Le categorie di soggetti che verranno prese in considerazione saranno: a) soggetti con forme tipiche di FC; b) soggetti con ipertripsinemia alla nascita, 1 sola mutazione del CFTR individuata al pannello standard e test del sudore borderline; c) soggetti infertili per agenesia dei deferenti; d) soggetti con ridotta fertilità per iperviscosità idiopatica del liquido seminale (lo studio di questa categoria di soggetti è finanziato da un progetto Telethon); e) soggetti con sospetto diagnostico per sintomi. Mediante questo obiettivo verrà individuato un elevato numero di soggetti

affetti da forme tipiche e atipiche di FC con genotipo completo (con 2 mutazioni sui 2 diversi alleli); questi genotipi completi potranno essere messi in relazione con l'aspetto clinico.

2) In molti dei soggetti già studiati e, come è prevedibile, anche in molti di quelli che verranno sottoposti ad analisi mutazionale estesa nel corso dell'anno, vengono individuate varianti genomiche del CFTR ad incerto significato funzionale: alcune mai precedentemente descritte, altre già note ma non studiate dal punto di vista del loro possibile effetto patologico. Mediante le ricerche da noi precedentemente effettuate, abbiamo già selezionato 44 varianti genomiche con queste caratteristiche. Per molte è già stato effettuato anche il confronto della loro frequenza con quella nella popolazione generale; in seguito a queste indagini alcune si presentano estremamente interessanti (con frequenza significativamente maggiore nelle popolazioni patologiche) per successivi studi funzionali. Poiché molte forme atipiche sono originate da genotipi che spesso comprendono mutazioni di splicing (una particolare classe mutazionale), questo obiettivo è specificamente rivolto all'individuazione di splicing anomali nell'RNA messaggero di soggetti con forme atipiche di FC e presenza di almeno una delle varianti genomiche selezionate. Questi studi verranno condotti mediante estrazione dell'RNA a partire da brushing nasale, leucociti e/o spermatozoi (in quest'ultimo caso solo per i soggetti con iperviscosità del liquido seminale) e successiva indagine sia qualitativa in RT-PCR che quantitativa in real-time PCR. Verranno inoltre completati gli studi di frequenza nella popolazione generale, per quelle varianti genomiche per le quali ciò non sia già stato fatto.

3) Per lo studio del rapporto tra genotipo (le mutazioni del CFTR) e il fenotipo (le manifestazioni cliniche), i parametri biochimici e clinici che verranno considerati per la definizione delle caratteristiche fenotipiche sono: concentrazione dello ione Cl^- nel sudore, funzionalità pancreatica mediante dosaggio della chimotripsina fecale, accrescimento (altezza, peso, MBI (mass body index)), funzionalità polmonare (FEV1%), colonizzazione microbica polmonare. Questi dati fenotipici saranno analizzati mediante metodi statistici di analisi multivariata con lo scopo di raggruppare i singoli individui in gruppi fenotipici omogenei, che verranno messi in relazione ai genotipi completi individuati mediante gli obiettivi precedenti considerando, oltre alle mutazioni classiche del CFTR, anche le mutazioni di splicing basate sulle varianti genomiche selezionate. Per alcuni genotipi dovrebbe essere possibile individuare una chiara relazione tra il genotipo e il

fenotipo; quei genotipi per i quali ciò risulterà impossibile, verranno sottoposti alle indagini descritte nell'obiettivo successivo.

4) Una delle fonti di variabilità nella FC è la possibile presenza di più mutazioni contemporaneamente sullo stesso allele (variabilità intragenica da alleli complessi); l'altra fonte di variabilità è l'eventuale attività di geni modificatori, diversi dal CFTR (variabilità extragenica). In questo obiettivo, per quei genotipi completi non raggruppabili in classi fenotipiche omogenee (cioè che non risulteranno facilmente correlabili all'aspetto fenotipico), si procederà ad estendere la ricerca mutazionale (che fino a questo punto è stata limitata al ritrovamento delle prime 2 mutazioni su 2 differenti alleli) alle zone del CFTR non analizzate. Infatti, queste situazioni discrepanti individueranno soggetti FC in cui potrebbero essere presenti variazioni sul CFTR in *cis* (sullo stesso allele) rispetto alle mutazioni già individuate; la ricerca di queste ulteriori mutazioni verrà quindi condotta mediante una fase di ricerca mutazionale estesa, indipendentemente dal fatto che siano già state trovate 2 mutazioni su 2 diversi alleli. Ciò dovrebbe consentire l'identificazione di un certo numero di alleli complessi (con più di una mutazione sullo stesso allele). Dovrebbe quindi risultare possibile correlare l'aspetto fenotipico dei casi discrepanti (il cui rapporto genotipo - fenotipo risultava poco chiaro considerando solo le prime 2 mutazioni identificate) ad alleli complessi e quindi permettere di risolvere l'aspetto diagnostico e prognostico anche di questo gruppo di genotipi.