

LA VARIABILITÀ GENETICA, BIOCHIMICA E CLINICA NELLA FIBROSI CISTICA: RICERCA MUTAZIONALE, ALLELI COMPLESSI E GENI MODIFICATORI

borsista Dott.ssa Sabina Maria Bruno

RISULTATI DEL I ANNO DI PROGETTO

Questo progetto viene sviluppato in collaborazione tra la Sezione di Biochimica Clinica, Dip. di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia ed il Centro di Riferimento della Regione Lazio per la Fibrosi Cistica, Dip. di Pediatria, entrambi della Sapienza Università di Roma. L'Associazione Laziale Fibrosi Cistica finanzia 2 annualità di una borsa di studio per la Dott.ssa Bruno che partecipa al progetto sostenendone la maggior parte del lavoro sperimentale.

L'obiettivo generale del progetto, da raggiungersi in 2 anni, è quello della completa caratterizzazione delle mutazioni del gene CFTR comprendendo anche l'eventuale presenza di alleli complessi, in gruppi selezionati di pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) e forme cliniche ad essa correlate (CFTR-RD), nonché lo studio del ruolo della metilazione del DNA nella regolazione trascrizionale dei geni del canale epiteliale del sodio (ENaC), un gene modificatore della gravità clinica della FC.

Gli obiettivi specifici del progetto che verranno raggiunti nei 2 anni sono:

- potenziamento ed applicazione della procedura multistep di ricerca mutazionale
- individuazione e caratterizzazione di alleli complessi (con più di una mutazione sulla stessa copia del gene)
- studio dell'espressione dei geni CFTR e ENaC (canale epiteliale del sodio) e della metilazione delle zone di DNA regolatorie dei geni ENaC

Vengono di seguito sinteticamente riassunti i risultati relativi al primo anno progetto.

Potenziamento ed applicazione della procedura multistep di ricerca mutazionale

E' stato effettuato l'upgrade dell'analizzatore genetico ABI PRISM 3100 *avant* a 4 capillari (con possibilità di analizzare 4 sequenze contemporaneamente) ad ABI PRISM 3130*xl* a 16 capillari (con

possibilità di analizzare 16 sequenze contemporaneamente); ciò costituisce un evidente incremento di produttività. Attualmente quindi la procedura di ricerca mutazionale che vede coinvolti i 2 laboratori partecipanti prevede l'utilizzo della workstation MicroLab StarLet (Hamilton) per la preparazione e purificazione delle reazioni, di 1 analizzatore genetico ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) e di 1 analizzatore genetico ABI PRISM 3100 *avant* (Applied Biosystems) per lo sviluppo e analisi degli elettroferogrammi. La procedura è completata da una fase semi-automatizzata di analisi dei dati.

E' stata resa operativa ed inserita nei protocolli in uso, la procedura di ricerca di mutazioni con frequenza superiore o uguale allo 0,8% specifiche di alcune regioni italiane (Sardegna con 3 mutazioni aggiuntive, Puglia con 8 mutazioni aggiuntive, Basilicata con 1 mutazione aggiuntiva, Campania con 3 mutazioni aggiuntive, Veneto e Trentino Alto Adige con 2 mutazioni aggiuntive, Lombardia con 3 mutazioni aggiuntive); non sono stati sviluppati pannelli specifici per le altre regioni in quanto le mutazioni più comuni sono già incluse nei test CF-OLA e CF-SNAP+20. Lo stesso approccio è stato seguito per definire pannelli specifici per alcune nazioni (Romania con 3 mutazioni aggiuntive, Bulgaria con 8 mutazioni aggiuntive, Austria con 2 mutazioni aggiuntive, Libia con 1 mutazione aggiuntiva, Germania con 2 mutazioni aggiuntive, Francia – Bretagna con 3 mutazioni aggiuntive, del Sud con 7 mutazioni aggiuntive, Mediterranea con 1 mutazione aggiuntiva), per le quali arrivano al Centro FC frequenti richieste di indagini genetiche relative al CFTR. In quattro nazioni (Croazia, Albania, Egitto e Polonia) non indaghiamo mutazioni aggiuntive perché quelle con frequenza maggiore di 0,8% sono già coperte dai primi due step della nostra strategia di ricerca mutazionale. Ciò garantisce un'adeguata detection rate anche per quei soggetti, sempre più numerosi, che pur non avendo origini geografiche nell'Italia centrale si rivolgono al Centro FC per le indagini molecolari.

Successivamente all'applicazione della ricerca mutazionale di I livello (mediante il pannello di mutazioni CF-OLA, Abbott), sono state effettuate 165 analisi genetiche, delle quali 36 per caratterizzazione di soggetti FC con genotipo incompleto, 23 in soggetti con sospetta FC, 42 per abbattimento del rischio e 64 per ricerca del portatore o segregazione allelica. Sono state trovate 22 diverse mutazioni del CFTR (aggiuntive rispetto al pannello di I livello) con frequenza variabile: 574delA, 711+3A>G, A1006E, D1270N, G576A, D1152H, F587I, L997F, L1065P, L1077P, P5L, Q1291R, R117L, R1070Q, S466X(TAG), S549R(A>C), S1235R, V562I, Y1092C, (TG)₁₂T₅, TG₁₅T₇, (TG)₁₁T₅; queste ultime 3 varianti genomiche sono state studiate, o sono in corso di studio, anche dal punto di vista funzionale caratterizzando eventuali splicing anomali dell'esone 9.

Ricerca e caratterizzazione degli alleli complessi del CFTR (con più di una mutazione sulla stessa copia del gene)

Gli attuali protocolli di ricerca mutazionale, compresa la nostra metodologia di indagine applicata finora, si limitano all'individuazione delle prime 2 mutazioni (su 2 alleli diversi) del CFTR; l'eventuale presenza di alleli complessi (con più di una mutazione sullo stesso allele) sfugge a tali indagini. La conseguenza di ciò è che in un gruppo di soggetti apparentemente con le stesse mutazioni, ce ne può in realtà essere qualcuno con un allele complesso: ciò potrebbe spiegare la diversa gravità delle manifestazioni cliniche in questi soggetti. Finora abbiamo completato la caratterizzazione genetica del CFTR di oltre 500 pazienti affetti da FC. Ciò ha permesso la selezione di oltre 450 pazienti con genotipo mutato completo (2 mutazioni su 2 alleli diversi). Numerosi di questi pazienti, pur presentando lo stesso apparente genotipo, presentano manifestazioni cliniche discordanti. In questa parte di progetto il problema del rapporto tra genotipo e fenotipo è stato affrontato inizialmente a partire dal fenotipo biochimico, inteso come valutazione della funzionalità residua *in vivo* del CFTR misurata mediante il test del sudore (concentrazione dello ione Cl⁻ trasportato dal CFTR).

Sono stati selezionati 2 gruppi di pazienti. In un gruppo abbiamo inserito tutti i pazienti con genotipi con una mutazione classica (mut) su un allele e sull'altro allele una mutazione con significato funzionale incerto e ritrovata in soggetti con manifestazioni cliniche molto variabili; è questo il caso di 12 soggetti con genotipo mut / L997F, di 11 soggetti con genotipo mut / (TG)₁₂T₅ e di 7 soggetti con genotipo mut / D1152H. Nell'altro gruppo abbiamo inserito quei pazienti con apparentemente stesse mutazioni del CFTR ma elevata variabilità interindividuale dei valori del test del sudore. In particolare sono stati studiati 4 soggetti con genotipo F508del / R553X, 22 soggetti F508del / F508del, 8 soggetti F508del / G542X e 13 soggetti F508del / N1303K. La ricerca di mutazioni aggiuntive è stata condotta mediante un'ulteriore fase di ricerca mutazionale estesa di II livello mediante sequenziamento, indipendentemente dal fatto che si siano già trovate 2 mutazioni su 2 diversi alleli. Ciò con lo scopo di evidenziare l'eventuale presenza di ulteriori mutazione del CFTR in *cis* (sullo stesso allele) rispetto a quelle già evidenziate che possano essere responsabili della variabilità nei valori del test del sudore. I genotipi mutati, gli alleli complessi evidenziati e i valori del test del sudore sono anche stati messi in relazione agli aspetti microbiologici e clinici; è stata quindi studiata la correlazione tra genotipo mutato (comprendente anche eventuali alleli complessi), fenotipo biochimico (test del sudore), fenotipo clinico (gli altri parametri microbiologici e clinici studiati).

Per quanto riguarda la casistica mut / L997F un'ulteriore mutazione (R117L) sullo stesso allele della mutazione L997F, responsabile di valori maggiori di test del sudore e di un più grave fenotipo clinico, è stata evidenziata in 4 diversi pazienti. Ciò definisce la scoperta di un nuovo allele complesso del CFTR [L997F;R117L] che parzialmente spiega l'elevata variabilità clinica riscontrata nei soggetti con la mutazione L997F descritta con significato funzionale estremamente controverso. Questi risultati sono stati pubblicati mediante il seguente articolo su rivista internazionale con un Impact Factor = 3.92:

Lucarelli M, Narzi L, Pierandrei S, Bruno S M, Stamato A, d'Avanzo M, Strom R, Quattrucci S.

A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation. *Genetics in Medicine 2010 in press* (è al momento disponibile in Pubmed l'Epub ahead of print a questo indirizzo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20706124>).

L'Associazione Laziale Fibrosi Cistica compare nei ringraziamenti.

Sono stati inoltre individuati gli alleli complessi [F508del;I1072T] (in 2 soggetti), [F508del;L467F] (in 2 soggetti), [F508del;I907V;1716A>G] (in 1 soggetto) e [D1152H;V754M] (in 1 soggetto). In tutti i casi alla mutazione principale (F508del o D1152H) risultano associate varianti genomiche che, prese singolarmente, hanno significati funzionali piuttosto incerti e molto variabili. E' probabile che, invece, se associate ad una mutazione classica influiscano sulle manifestazioni cliniche. In effetti abbiamo trovato tutti questi alleli complessi in soggetti che in genere hanno valori del test del sudore maggiori e manifestazioni cliniche più gravi (rispetto ai soggetti che hanno solo la mutazione classica).

Studio dell'espressione dei geni CFTR ed ENaC (canale epiteliale del sodio) e della metilazione delle zone di DNA regolatorie dei geni ENaC

Questa parte di progetto viene svolta in collaborazione con la Prof. Fiorentina Ascenzioni del Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sapienza Università di Roma.

Oltre al pattern di espressione del gene CFTR, questa parte di progetto vuole studiare i meccanismi di controllo trascrizionale dei 3 geni del canale epiteliale del sodio (ENaC) SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G rispettivamente codificanti per le subunità α , β e γ della proteina. Ciò al fine di stabilire per questo gene un possibile ruolo di modificatore della FC che possa, almeno in parte, spiegare la notevole variabilità fenotipica della malattia fibrocistica.

E' stato effettuato, mediante RT-PCR, lo studio semi-quantitativo di espressione del CFTR e dei 3 geni ENaC sia *in vitro* in linee cellulari in coltura che in campioni biologici *ex vivo*, individuando

condizioni sperimentali con espressione fortemente differenziata. Il pattern di espressione è stato quindi valutato, nelle stesse condizioni sperimentali, in maniera quantitativa mediante real-time PCR. Lo studio di espressione è stato condotto sulle seguenti linee cellulari: H441 (cellule epiteliali derivanti da adenocarcinoma polmonare), con e senza induzione da desametasone; MCF10A (cellule del tessuto mammario), con e senza induzione da desametasone; 16HBE e CFBE (cellule dell'epitelio bronchiale) rispettivamente wild type e mutate per il CFTR; HACAT (cellule umane derivanti da cheratinociti immortalizzati). Sono inoltre stati studiati i seguenti campioni biologici *ex-vivo*: brushing nasale, leucociti polimorfonucleati, monociti e linfociti isolati da sangue periferico di soggetti non affetti. Come controlli di espressione sono stati utilizzati i geni GAPDH o β -actina, che risultano espressi allo stesso livello in tutte le condizioni.

Sono state così individuate condizioni sperimentali nelle quali il CFTR e i 3 geni ENaC sono ben espressi e altre nelle quali l'espressione è assente o fortemente ridotta. Ciò ha permesso di individuare il rapporto relativo di espressione tra il CFTR e l'ENaC. Nella linea cellulare 16HBE i geni CFTR e SCNN1A risultano fortemente espressi, mentre i geni SCNN1B e SCNN1G poco espressi; nella linea H441 il CFTR è espresso a bassi livelli mentre il gene SCNN1A è fortemente espresso e i geni SCNN1B e SCNN1G sono espressi a livelli intermedi. E' comunemente sostenuto che ci sia, nell'epitelio polmonare, una correlazione inversa tra l'attività del CFTR e quella dell'ENaC; i nostri risultati ottenuti su queste 2 linee cellulari che derivano da epitelio respiratorio polmonare, suggerirebbero che questa correlazione inversa origini, almeno in parte, fin dal controllo trascrizionale. Tuttavia, nell'unica linea con CFTR mutato, le CFBE, la ridotta espressione del CFTR coesiste con una parimenti ridotta espressione di tutti e 3 i geni ENaC. Ciò suggerisce quindi che, almeno in presenza di mutazioni del CFTR, la correlazione inversa tra l'attività dei 2 canali non sia sostenuta da un parallelo controllo trascrizionale. D'altra parte, anche nelle altre linee cellulari non di derivazione polmonare, le MCF10A e HACAT, questa correlazione viene a mancare con espressione fortemente differenziata anche tra i geni ENaC: nella linea MCF10A il gene SCNN1A è fortemente espresso mentre i geni SCNN1B e SCNN1G risultano scarsamente espressi, a fronte di un'espressione intermedia del CFTR; nella linea HACAT l'unica espressione apprezzabile, ad elevati livelli, è quella del gene SCNN1A. Questa mancata correlazione è evidente anche per i campioni di brushing nasale, nei quali si riscontra un buon livello di espressione del CFTR, simile a quello del gene SCNN1G, e un elevato livello di espressione dei geni SCNN1A e SCNN1B. Nei campioni di polimorfonucleati, linfociti e monociti si riscontra una generalizzata bassa espressione del CFTR e dei geni SCNN1B e SCNN1G, e un livello di espressione intermedio del gene SCNN1A. Questi risultati suggeriscono, tra l'altro, una regolazione trascrizionale indipendente per il gene SCNN1A, nonché ben differenziata tra cellule di derivazione epiteliale polmonare, epiteliale non polmonare e non epiteliale.

Successivamente è stata studiata la metilazione del DNA delle zone regolatorie dell'ENaC; questi studi contribuiscono a chiarire i meccanismi molecolari che regolano l'espressione di questo canale, nonché individuare e caratterizzare la metilazione del DNA come possibile bersaglio terapeutico in FC. Si vuole infatti valutare la possibilità di modulare l'espressione dei geni ENaC attraverso la manipolazione dei pattern di metilazione del DNA delle loro zone regolatorie. Il lavoro sperimentale indica che il gene SCNN1A è ben espresso nelle linee H441, MCF10A e HACAT, nonché nei campioni di brushing nasale. Nella linea 16HBE l'espressione è minore (sebbene comunque alta); nella linea CFBE e nei polimorfonucleati, linfociti e monociti l'espressione appare estremamente ridotta. Il trattamento con desametasone delle linee H441 e MCF10A stimola l'espressione di questo gene. Lo studio della metilazione del DNA è stato effettuato avvalendosi di una metodologia di indagine basata sull'incapacità di alcuni enzimi di restrizione di tagliare il DNA metilato. Per studiare il pattern di metilazione del gene SCNN1A sono state investigate 2926bp della regione 5'flanking del gene divise in 3 zone organizzate in 1 multiplex, per un totale di 7 siti CCGG studiati. Una delle tre zone analizzate (quella di peso molecolare maggiore, più distante dal sito di inizio trascrizionale) è risultata sempre ipometilata in tutte le linee cellulari studiate; le restanti due zone analizzate sono sempre ipometilate nelle cellule ben esprimenti H441, MCF10A e HACAT (anche dopo trattamento con desametasone), mentre sono metilate, sebbene con differenti pattern di metilazione, nelle cellule meno esprimenti 16 HBE (solo una zona metilata) e non esprimenti CFBE (2 zone metilate). Nelle cellule epiteliali nasali da brushing e nei polimorfonucleati, linfociti e monociti, sebbene la zona di peso molecolare più alta della regione 5'flanking sia sempre demetilata, le altre due zone regolatorie del gene SCNN1A sono risultate metilate; ciò è in accordo con l'assenza di espressione del gene SCNN1A riscontrata nei leucociti ma in contrasto con il notevole livello di espressione riscontrato nel brushing nasale. Tale discrepanza può essere spiegata dal fatto che nel campione di cellule epiteliali nasali è presente anche una certa quota di cellule non epiteliali e non esprimenti che influenza il risultato finale. Questi esperimenti hanno quindi evidenziato una buona correlazione tra l'ipometilazione delle regioni di controllo del gene SCNN1A e la sua espressione. Il fatto che la metilazione del DNA giochi un ruolo nella regolazione trascrizionale di questo gene, è un risultato particolarmente significativo per poter ipotizzare strategie terapeutiche basate sulle modifiche epigenetiche.

Il gene SCNN1B è risultato scarsamente espresso in tutte le linee cellulari sopra citate, a meno delle H441 dove i livelli di espressione sono apprezzabili. Il trattamento con desametasone delle linee H441 e MCF10A stimola l'espressione di questo gene. L'SCNN1B appare fortemente espresso nei campioni di brushing nasale ma non espresso nei campioni di polimorfonucleati, linfociti e monociti. Anche il gene SCNN1G è risultato scarsamente espresso in tutte le linee cellulari sopra citate, con apprezzabile espressione nelle H441 e con una forte induzione della sua espressione

dopo trattamento con desametasone nelle H441 e MCF10A. Il gene SCNN1G risulta ben espresso nei campioni di brushing nasale ma espresso a livelli estremamente ridotti nei campioni di polimorfonucleati, linfociti e monociti.

E' tuttora in corso lo studio dei pattern di metilazione dei geni SCNN1B e SCNN1G. In particolare, per studiare il pattern di metilazione del gene SCNN1B viene indagata una regione di 3842 bp del 5'flanking del gene divisa in 4 zone organizzate in 2 multiplex, per un totale di 14 siti CCGG studiati. Per il gene SCNN1G viene studiata una regione di 2537 bp del 5'flanking del gene divisa in 2 zone organizzate in 2 multiplex, per un totale di 21 siti CCGG.