

Relazione dott.ssa Antonella Stamato

I cinque mesi di ricerca finanziati dall'Associazione Laziale Fibrosi Cistica hanno permesso di completare il sequenziamento del gene CFTR in un campione di 32 neonati selezionati alla nascita dal programma di Screening. Tutti i soggetti esaminati risultavano positivi al primo dosaggio della tripsina immunoreattiva (IRT) e il 48% di essi presenta ipertripsinemia persistente. Inoltre, circa un terzo dei soggetti positivi allo screening mostrava valori del test del sudore border-line e valori della chimotripsina normali (tranne quattro: due patologici e due border-line). Tutti i soggetti in esame, tranne uno, risultavano portatori di una mutazione del gene CFTR al pannello standard di screening che esamina trentuno mutazioni. L'analisi genetica estesa condotta sui 32 soggetti ha permesso di stabilire che circa il 44% dei pazienti analizzati mostra un genotipo eterozigote composto compatibile con forme mild di FC, mentre la percentuale sale a circa il 62% se consideriamo affetti anche i soggetti con tratto variante TG₁₂ e/o T₅. Tali risultati hanno indotto il Centro a modificare il sistema di valutazione dei neonati selezionati da screening. Infatti ora tutti i neonati con ipertripsinemia, eterozigoti al pannello standard di screening e con test del sudore > 25mmol/L vengono sottoposti ad un ulteriore test genetico ed a controlli clinici periodici. L'indagine genetica è stata effettuata anche su altri due neonati che hanno raggiunto il Centro per sintomi. Tali neonati, sfuggiti al programma di screening, hanno mostrato valori del test del sudore prossimi al patologico, un genotipo eterozigote al pannello delle trentuno mutazioni effettuato presso il Centro e da sequenziamento, in entrambi, è stato riscontrato l'allele variante TG₁₂/T₅. Su questi ultimi due soggetti il sequenziamento è tuttora in fase di completamento poiché inseriti nel progetto di ricerca in un momento successivo rispetto al gruppo dei trentadue. Se dopo sequenziamento completo del gene CFTR, per tali due soggetti il genotipo dovesse rimanere eterozigote composto con l'allele variante TG₁₂/T₅, potremmo avvalorare l'ipotesi che tale allele variante può essere considerato causa di malattia.

Dai risultati ottenuti emerge che lo screening neonatale positivo, oltre ad individuare le forme classiche di FC, seleziona anche le forme lievi (definite anche atipiche). Le forme atipiche di FC sono difficilmente diagnosticabili soprattutto nei neonati perché con scarsa o addirittura assente sintomatologia. Tuttavia, l'approfondita indagine genetica, consentendo la caratterizzazione dei soggetti che potrebbero sviluppare negli anni situazioni riconducibili a FC, consente di sottoporre gli stessi ad un piano di cure adeguato fin dalla nascita e di seguire il loro follow up presso il Centro.

Con la presente relazione vorrei porgere i miei ringraziamenti più sentiti all'Associazione Laziale Fibrosi Cistica poiché mi ha consentito, con il finanziamento di cui sono stata titolare, di portare a termine un progetto di ricerca da me seguito durante i due anni di internato svolto nel laboratorio di biochimica e biologia molecolare (Responsabile Dott.ssa Narzi) del Centro di Riferimento Regionale FC (Responsabile Dott.ssa Quattrucci). Inoltre, durante i cinque mesi finanziati dall'Associazione ho continuato anche a partecipare attivamente all'attività assistenziale del Centro eseguendo i test del sudore.

Nei mesi di agosto - ottobre 2005 ho lavorato presso il Centro di Riferimento Regionale Fc grazie al finanziamento percepito dall'Associazione Laziale Fibrosi Cistica. In tale periodo ho individuato una nuova variazione di sequenza nell'esone 13 del gene CFTR in un neonato ipertripsinemico selezionato alla nascita dal protocollo di screening, eterozigote all'analisi di I livello (PCR-OLASCS) e con test del sudore border-line. Tale soggetto faceva parte di un progetto di ricerca eseguito presso il Centro Fc. Ho preso parte a questo progetto sia durante il periodo di internato effettuato nel Centro FC, sia successivamente grazie ad una borsa di collaborazione erogata dall'Associazione stessa nel periodo marzo-luglio 2005. I risultati ottenuti con questo lavoro sono stati sottoposti ed accettati, sia come poster che come comunicazione orale (da me sostenuta), al I congresso SIFC, tenutosi a Roma nei giorni 1-3 dicembre 2005. La variazione di sequenza del soggetto di cui sopra, mai descritta in precedenza, è stata individuata con sequenziamento diretto del gene CFTR e

confermata successivamente con un secondo prelievo venoso. E' in corso il sequenziamento totale del gene CFTR per verificare che nessun'altra mutazione sia presente oltre le due già descritte.

Inoltre, nello stesso periodo mi sono occupata della caratterizzazione genetica di un soggetto adulto in cura presso il Centro. All'analisi di I livello il soggetto risultava omozigote per la mutazione DF508, risultato assolutamente compatibile con il suo quadro clinico. Quando, per verifica dell'effettiva omozigosi, sono stati sottoposti ad analisi di I livello i genitori del soggetto, si è riscontrata la mutazione DF508 solo nel padre. E' stato necessario, dunque, sequenziare direttamente l'esone 10 del gene CFTR dei tre soggetti per chiarire l'effettiva natura dell'omozigosi avuta all'analisi di I livello. Con il sequenziamento diretto è risultato chiaro che il soggetto in esame ha la DF508 in eterozigosi e presenta, sempre nell'esone 10, poche basi a monte della tripletta deleta per la DF508, una mutazione mai precedentemente descritta in letteratura. La nuova mutazione è stata riscontrata nella madre del soggetto in esame mentre nel padre il sequenziamento ha confermato la DF508 in eterozigosi. Attualmente è in corso la conferma della nuova mutazione su un secondo prelievo dell'affetto e la verifica, mediante sequenziamento totale del gene, che nessun'altra mutazione sia presente oltre le due già descritte. Risulta evidente quanto sia importante verificare la segregazione allelica, soprattutto nelle presunte omozigosi, poiché il falso risultato di omozigosi all'analisi di I livello può essere dovuto all'interferenza di una nuova mutazione con la zona di attacco dei primers dell'OLA. Se, al termine del sequenziamento totale del gene CFTR dei due soggetti in esame, le due variazioni di sequenza risulteranno realmente delle mutazioni, il risultato sarà pubblicato sul sito Cystic fibrosis mutation database (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).

Ringraziando per la disponibilità e l'opportunità offertami dall'Associazione di continuare il mio lavoro presso il laboratorio di biologia e biochimica del Centro FC, porgo i mie più cordiali saluti.

<p>ABSTRACT FORM 4th European CF Young Investigator Meeting Lille, France 24 – 27 August 2010</p>	<p>Abstracts must be received by March 19th 2010. Submit to Vaincre la Mucoviscidose: a vjaunet@vaincrelamauco.org</p> <p>For Review Committee use only: Abstract Number</p>																																		
Name of young investigator:	Dr. Stamato Antonella																																		
Name of supervisor:	Prof. Serena Quattrucci																																		
Institution:	Cystic Fibrosis Center of Lazio																																		
Department:	Department of Pediatrics																																		
Full Address:	Viale Regina Elena.324 00156 Rome																																		
Email:	antostama@libero.it																																		
Telephone: (incl. country code)	06/49979295																																		
<p>Abstract title (Bold letters) SEARCH THE LARGE DELETIONS OF CFTR GENE Authors: ¹F. Narzi, ¹A. Amato, ¹A. Stamato, ²M. Lucarelli, ²R. Strom, ¹S. Quattrucci, ¹L. Narzi. Authors affiliations: ¹Centro Fibrosi Cistica Regione Lazio - Clinica Pediatrica ²Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia Sapienza Università di Roma</p> <p>Do you wish to participate to the training course “Presenting your scientific paper in English”? <input checked="" type="checkbox"/> YES <input type="checkbox"/> NO</p> <p>Did you participate to the EYIM in 2008? <input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO</p> <p>Please indicate One Category for review:</p> <table border="1"> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Pulmonology</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>New therapies</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Gastroenterology / Liver</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Nutrition</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/></td><td>Genetics</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Animal Models</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Screening & Diagnosis</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Microbiology / Antibiotics</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Immunology / Inflammation</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Metabolic complications of CF</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Cell Biology / Physiology</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>CFTR</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Nursing</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Physiotherapy</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Psychosocial Issues</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Epidemiology / Registry</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>Other Issues</td></tr> </table> <p>Corresponding author agrees to have contact details available to conference delegates (delete as appropriate)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Agree <input type="checkbox"/> Do not agree</p>	<input type="checkbox"/>	Pulmonology	<input type="checkbox"/>	New therapies	<input type="checkbox"/>	Gastroenterology / Liver	<input type="checkbox"/>	Nutrition	<input checked="" type="checkbox"/>	Genetics	<input type="checkbox"/>	Animal Models	<input type="checkbox"/>	Screening & Diagnosis	<input type="checkbox"/>	Microbiology / Antibiotics	<input type="checkbox"/>	Immunology / Inflammation	<input type="checkbox"/>	Metabolic complications of CF	<input type="checkbox"/>	Cell Biology / Physiology	<input type="checkbox"/>	CFTR	<input type="checkbox"/>	Nursing	<input type="checkbox"/>	Physiotherapy	<input type="checkbox"/>	Psychosocial Issues	<input type="checkbox"/>	Epidemiology / Registry	<input type="checkbox"/>	Other Issues	<p>Background: Cystic fibrosis (CF) is the most common serious genetic disease of the Caucasian population. Mutation analysis of the gene “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)” is crucial for diagnosis, prognosis, therapy and prevention of cystic fibrosis (CF). In order to obtain a genetic characterization in patients with typical, atypical forms or diagnostic suspicion of CF referring to the Lazio Regional Center, we usually perform a 3-step procedure for the identification of CFTR gene mutations (i.e. OLA-SCS assay, SNAPshot and total sequencing). However, with this procedure, 4.8% of patients remains incompletely characterized (2.8% of alleles not identified).</p> <p>Aims: To evaluated a new diagnostic method to find the most common deletions in Caucasian population.</p> <p>Methods: We evaluated the helpfulness of a genetic analysis that identifies 7 large deletions involved in CF (i.e. 22,23del; ex2del; 2,3del; ex1indel; 22,23,24del; 17a,17b,18del; 14b,17bdel) through the amplification and subsequent detection by reverse hybridization on the strip of some sequences of the CFTR gene (DEL method). To date, 432 patients with typical form of CF were evaluated in terms of mutation according to our 3-step procedure. In 402 patients we identified both the mutations but we were not able to completely characterize 30 patients (26 MUT/UN and 4 UN/UN). Until now we studied with DEL method 21 out of 30 uncharacterized patients (23 unknown alleles).</p> <p>Results: Ten out of 23 unknown alleles evaluated (43%) have been characterized with DEL method. The most common deletions were 22,23,24del (17%) and 2,3del (13%).</p> <p>Conclusions: Although the data are still incomplete, adding the DEL method to the 3-step procedure the total detection rate increased to 98.6%.</p>
<input type="checkbox"/>	Pulmonology																																		
<input type="checkbox"/>	New therapies																																		
<input type="checkbox"/>	Gastroenterology / Liver																																		
<input type="checkbox"/>	Nutrition																																		
<input checked="" type="checkbox"/>	Genetics																																		
<input type="checkbox"/>	Animal Models																																		
<input type="checkbox"/>	Screening & Diagnosis																																		
<input type="checkbox"/>	Microbiology / Antibiotics																																		
<input type="checkbox"/>	Immunology / Inflammation																																		
<input type="checkbox"/>	Metabolic complications of CF																																		
<input type="checkbox"/>	Cell Biology / Physiology																																		
<input type="checkbox"/>	CFTR																																		
<input type="checkbox"/>	Nursing																																		
<input type="checkbox"/>	Physiotherapy																																		
<input type="checkbox"/>	Psychosocial Issues																																		
<input type="checkbox"/>	Epidemiology / Registry																																		
<input type="checkbox"/>	Other Issues																																		