
**ANALISI DI GENI MODULATORI IN PAZIENTI
AFFETTI DA FIBROSI CISTICA**

Fabiana Bellitti

Dottorato in Scienze Biotecnologiche - XIX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II





Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XIX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II



**ANALISI DI GENI MODULATORI IN PAZIENTI
AFFETTI DA FIBROSI CISTICA**

Fabiana Bellitti

Dottoranda: Fabiana Bellitti
Relatore: Prof.ssa Giuliana Fortunato
Coordinatore: Prof. Gennaro Marino



INDICE

Riassunto	pag. 1
Riassunto breve	pag. 6
Summary	pag. 8
1 Introduzione	pag. 11
1.1 La Fibrosi Cistica	pag. 11
1.2 Discordanza genotipo-fenotipo nella CF	pag. 16
1.3 I geni modulatori del fenotipo epatico nei pazienti CF	pag. 18
2 Scopo della tesi	pag. 31
3 Materiali e metodi	pag. 31
3.1 Pazienti	pag. 31
3.2 Strategia d'analisi per la caratterizzazione di geni modulatori il fenotipo CFTR	pag. 34
4 Risultati	pag. 42
5 Discussione	pag. 47
6 Conclusioni	pag. 50
Bibliografia	pag. 52
Appendice I: Elenco delle pubblicazioni	
Appendice II: Pubblicazioni	

Riassunto

La Fibrosi Cistica (CF) è la malattia genetica, ad esito letale, trasmessa con meccanismo autosomico recessivo più frequente nella popolazione caucasica: ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi. Ha una trasmissione autosomica recessiva e la frequenza dei portatori, asintomatici, è di 1:25. La malattia dipende dalle alterazioni di una glicoproteina di membrana di 1480 amminoacidi, espressa e funzionante nella porzione apicale della membrana delle cellule epiteliali, denominata *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR), che svolge funzioni di canale ionico del cloro.

Nei soggetti normali, i secreti salini vengono idratati e fluidificati poichè gli ioni cloro e sodio si associano al transito di acqua. Nei soggetti in cui il gene CFTR è mutato, impedendo la sintesi o il corretto funzionamento della proteina, le secrezioni diventano più dense, e da ciò derivano i sintomi sistemici della malattia. Le secrezioni dense a livello polmonare ostruiscono i bronchi favorendo lo sviluppo di infezioni; a livello pancreatico ostruiscono i dotti pancreatici, impedendo agli enzimi digestivi di giungere all'intestino, provocando malassorbimento e deficit di accrescimento; a livello epatico rendono la bile densa, danneggiando il fegato. Inoltre, a livello delle ghiandole sudoripare è compromesso il riassorbimento di ioni cloro e sodio. Infatti, i pazienti CF eliminano nel sudore una quantità eccessiva di NaCl, che può essere dosato, mediante stimolazione delle ghiandole sudoripare con pilocarpina (test del sudore).

Il gene che codifica per la proteina CFTR è stato mappato nel 1989 e sequenziato nel 1991. È localizzato sul cromosoma 7, in posizione q31.2, ed è composto da 27 esoni. Fino ad oggi, sono state identificate oltre 1400 mutazioni diverse nel gene CFTR, gene malattia della Fibrosi Cistica, alcune delle quali diffuse ubiquitariamente (es. F508del, N1303K); altre specifiche di alcuni ambiti etnico-geografici, e la maggior parte "private", cioè confinate a ristretti gruppi geografici o familiari. Per esempio, la mutazione più diffusa, la F508del, è presente nel 90% degli alleli CF in Danimarca ma solo nel 50% degli alleli CF in Italia. Pur essendo molto eterogenee, le mutazioni CF sono state raggruppate in 5 classi in base all'alterazione funzionale della proteina CFTR di cui sono responsabili. Ad esempio, le mutazioni che si associano

all'assenza di sintesi della proteina CFTR (classe 1 e 2) sono candidate a determinare lo sviluppo di un fenotipo più severo, laddove mutazioni lievi (classe 4 e 5), associate ad una attività residua del canale dovrebbero associarsi ad un'espressione clinica meno grave della malattia. Tuttavia, l'unico parametro clinico che sembra dipendere strettamente dal tipo di mutazione CFTR è l'insufficienza pancreatica: oggi sono ben note le mutazioni CFTR associate a sufficienza pancreatica, che se presenti in eterozigosi composta con una mutazione severa sull'altro allele assumono carattere dominante, e determinano il fenotipo CF con sufficienza pancreatica. Tutti gli altri parametri clinici che definiscono l'eterogeneo e complesso quadro della malattia non sembrano dipendere dal genotipo CFTR. Una notevole variabilità del fenotipo clinico della CF è stata osservata nello studio di coppie di fratelli cresciuti nello stesso ambiente o di pazienti portatori dello stesso genotipo (G542X o DF508 in omozigosi), che in molti casi presentano una espressione clinica della CF del tutto discordante. Per questo motivo è stato prospettato il ruolo dei geni modulatori, come geni ereditati indipendentemente dal gene-malattia, che quando alterati sono in grado di modulare il quadro clinico della malattia.

L'identificazione dei geni modulatori potrebbe essere utile per migliorare la capacità predittiva della diagnosi molecolare, poichè diventerebbe possibile avere informazioni anche sulla gravità o sull'espressione clinica della malattia. Negli ultimi anni sono stati studiati numerosi geni ereditati indipendentemente dal gene CFTR che potrebbero modulare l'espressione fenotipica nei pazienti CF.

Presso i laboratori del DBBM-CEINGE, dove si è svolto questo progetto di ricerca, da alcuni anni è in corso l'analisi di alcuni geni candidati a modulare l'espressione clinica della CF.

In una prima fase dello studio, sono stati analizzati pazienti affetti da CF, non imparentati tra loro, e caratterizzati da una diversa severità dell'espressione respiratoria della malattia. Per valutare la correlazione tra la severità dell'espressione respiratoria sono state studiate le varianti geniche della lectina legante il mannosio (MBL, Mannose Binding Lectin).

Nel corso degli ultimi tre anni invece, durante questo lavoro di tesi sono stati analizzati alcuni geni che potrebbero essere implicati nella modulazione del fenotipo epatico della malattia: il gene dell'alfa-1-antitripsina (A1AT), il gene dell'emocromatosi (HFE) il deficit dei quali è associato a malattie epatiche croniche del fegato, e il gene della lectina

legante il mannosio (MBL2), che produce una proteina della fase acuta della risposta immunitaria innata, il cui deficit è associato ad un maggiore rischio infettivo nei confronti di alcuni agenti microbici, soprattutto nei primi anni di vita ed in presenza di altre affezioni di base.

I pazienti inclusi nello studio sono stati reclutati in parte presso alcune strutture di diagnosi e cura dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" di Napoli ed in parte presso il laboratorio di Genetica Medica dell'Istituto Mangiagalli di Milano, con il quale il nostro gruppo di ricerca collabora da diversi anni.

Per lo studio dei geni modulatori il fenotipo epatico sono stati selezionati 127 pazienti affetti da CF di cui 71 presentavano espressione epatica severa e 56 non presentavano espressione epatica. Oltre che ai pazienti, lo studio è stato esteso a 113 soggetti di controllo, adulti, non affetti da CF.

Mediante l'impiego di specifiche coppie di "primers", sono state amplificate le regioni del gene dell'emocromatosi e del gene dell'MBL dove sono localizzate le mutazioni da analizzare. L'amplificazione è stata ottenuta mediante multiplex PCR (amplificazioni simultanee di più regioni del gene). Al termine della PCR l'amplificato è stato sottoposto alla tecnica del Reverse Dot Blot, la cui fase finale ha permesso la visualizzazione, su striscette di nitrocellulosa, di una o due bande colorate per ogni mutazione. La presenza di tali bande ha consentito di validare lo stato di omozigosi o eterozigosi per la mutazione testata. Con questa tecnica sono state analizzate 12 mutazioni del gene **HFE**: V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P, P160 del C. Per il gene **MBL** sono state analizzate 6 varianti alleliche: -550G>C, -221G>C, +4C>T, R52C, G54D, G57E. Tutte le PCR sono state eseguite su Thermal Cycler 9600 e 9700 della Applied Biosystems e per il controllo dell'amplificazione è stata eseguita un'elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in TBE 1X, utilizzando 10 µl della miscela di reazione. Il sequenziamento diretto è stato eseguito utilizzando il metodo di Sanger modificato.

Dall'analisi dei geni candidati a modulare il fenotipo epatico (HFE, A1AT, MBL2) emerge che non esistono differenze significative nella distribuzione delle mutazioni dei tre geni tra i pazienti CF e la popolazione di controllo sana. Tra i pazienti con fenotipo epatico sono stati riscontrati molti portatori di mutazioni dei tre geni (per lo più in eterozigosi), ma

l'incidenza degli alleli mutati non è significativamente differente da quella riportata per la popolazione generale.

In conclusione lo studio, condotto su una delle casistiche più ampie di pazienti CF con o senza espressione epatica della malattia esclude che i geni HFE, A1AT ed MBL 2 possano svolgere il ruolo di geni modulatori del fenotipo epatico.

Riassunto Breve

Con un'incidenza di circa 1/2.500, la Fibrosi Cistica (CF) è la più frequente malattia genetica autosomica recessiva della razza caucasica ad esito letale. Il quadro clinico della malattia è estremamente eterogeneo. In particolare, il coinvolgimento epatico nei pazienti CF varia dal 4.0% al 25-30%, inoltre, è stato osservato che pazienti con lo stesso genotipo possono avere un fenotipo epatico estremamente diverso. Il nostro gruppo ha precedentemente descritto una elevata variabilità dell'espressione epatica in coppie di fratelli affetti da CF. Quindi, fattori genetici ereditati indipendentemente dal gene CFTR potrebbero modulare l'espressione epatica nei pazienti CF.

In questo studio sono stati analizzati tre geni come possibili modulatori del fenotipo CF: il gene dell'alfa-1-antitripsina (A1AT), il gene dell'emocromatosi (HFE) il cui deficit è associato a malattie epatiche croniche del fegato, e il gene della lectina legante il mannosio (MBL2), una proteina sierica coinvolta nell'immunità innata, precedentemente riportata come un gene modulatore del fenotipo epatico CF. Lo studio (basato su PCR seguita dal sequenziamento diretto per l'A1AT e da Reverse Dot Blot per i geni HFE ed MBL2) è stato realizzato su 127 pazienti CF non consanguinei, di cui 71 con espressione epatica severa e 56 senza espressione epatica e su 113 pz di controllo non CF. I criteri di inclusione per l'espressione epatica sono stati: l'ipertensione portale (con varici esofagee o splenomegalia), la cirrosi multilobulare e il trapianto epatico. Tutte le altre cause (genetiche, metaboliche e virali) di malattie epatiche sono state escluse.

Il nostro studio ha identificato molti pazienti portatori di mutazioni dei tre geni (per lo più in eterozigosi), ma l'incidenza degli alleli mutati non è significativamente differente da quella riportata per la popolazione generale. Inoltre, non sono state riscontrate differenze significative nella distribuzione degli alleli mutati tra i pazienti CF con malattia epatica severa e senza malattia epatica.

Questi risultati, (ottenuti sulla casistica più ampia sinora raccolta) parzialmente in disaccordo con altri precedentemente riportati, che indicavano i tre geni come potenziali modulatori dell'espressione polmonare, suggeriscono che l'espressione

epatica nei pazienti CF non è influenzata da varianti dei geni di A1AT, HFE e MBL.

Summary

Cystic Fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive disorder in the Caucasian population: one in 2500-2700 newborns is affected. The disease is characterized by an abnormal salt transport across the apical border of epithelial cells like the sweat gland, the pancreas, the lung, the intestine, male genital tract and the liver.

In 1989, the Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator gene responsible for Cystic Fibrosis, was identified and completely sequenced in 1991.

The gene is located on the long arm of chromosome 7 (7q31), spans 250Kb of genomic DNA and contains 27 exons. Over 1400 mutations have been identified. Some of these are ubiquitously distributed (F508del, N1303K), some are "private", restricted to a specific geographic area. F508del, for example, is present in 90% of CF alleles in Denmark, while only in the 50% of Italian CF alleles. CFTR gene encodes a 1480 aminoacid long transmembrane protein. Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator is a multidomain protein characterized by a complex regulation. Therefore, nucleotide alterations in CFTR gene can disrupt CFTR function by different mechanism depending on their nature and on the domain in which these occur.

According to their effects, CFTR mutations have been subdivided into five classes. For examples mutations related to the absence of synthesis of the CFTR protein (class 1 and 2) are candidate to induce a severe phenotype, while moderate mutations (class 4 and 5), related to a residual activity of the channel should generate a slight clinical expression of the disease.

Pancreatic expression is strictly related to CFTR genotype. CFTR mutations that characterize pancreatic sufficiency even if present together with a severe mutation on the other allele, are well known. All the other clinical parameters (pulmonary expression, liver expression, etc.) seem to be independent from the CFTR genotype.

Furthermore a large variability of the clinical phenotype of CF has been observed in patients bearing the same CFTR genotype, and in different studies concerning siblings with the same genotype.

Thus, it has been postulated that modulatory genes may influence the clinical expression of CF. In particular it has been

hypotized that these genes, inherited independently from CFTR, when mutated could modulate the clinical expression of Cystic Fibrosis. The identification of modulatory genes could be helpful in the prediction of the disease outcome and to select the optimal therapy.

In the laboratories of DBBM-CEINGE, a screening of different putative modulatory genes for CF is in progress. In a first step, unrelated CF patients with a different pulmonary expression have been studied to identify the role of mannose binding lectine (MBL2) as a modifier gene of pulmonary phenotype. Thus, in the last three years, a screening for Serpin-1 gene, encoding for alpha-1 antitrypsin protein, Haemocromatosis (HFE) and MBL-2 genes has been performed on a subset of CF patients with a different liver expression (aim of the present study). The deficit for alpha-1 antitrypsin protein and HFE seem to be correlated to chronic hepatic disease, while MBL-2 gene encodes an acute phase protein of innate immunity. The deficiency of the protein is related to a major risk for recurrent infections in children.

Patients included in this study have been recluted from the "Azienda Ospedaliéra Universitaria Federico II" of Naples and from the laboratory of "Genetica Medica" of the "Istituto Mangiagalli" of Milan. In particular 127 CF patients have been screened among 71 with severe liver expression and 56 without liver expression. We examined also 113 DNA samples extracted from blood of unselected, unrelated healthy individuals. The analysis of Haemocromatosis (HFE) and Mannose Binding Lectin (MBL-2) was based on PCR and Reverse Dot Blot. Using this technique it is possible to test 12 mutations of the HFE gene: V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P, P160delC and 6 variants for MBL2 gene -550G>C, -221G>C, +4C>T, R52C, G54D, G57E. The analysis of Alpha-1 antitrypsin gene using PCR and direct sequencing. All PCRs were performed on Thermal Cyclor 9600 and 9700 of Applied Biosystem and 10 µl of the Amplified product were checked on 2% agarose gel in TBE 1%. Our study did not find any significant correlation in the distribution of the mutations in the three screened genes comparing CF patients and healthy individuals. Among the CF patients expressing a severe liver phenotype, some are polymorphic for the mutations of the three screened genes, nevertheless the incidence of the mutated alleles is not significantly different between the populations examined. Concluding, our study, based on one of

the largest number of patients, seems to exclude that HFE, A1AT and MBL2 may act as modifier genes of liver phenotype.

Introduzione

1.1 La Fibrosi Cistica

La Fibrosi Cistica (CF) è la malattia genetica, ad esito letale, trasmessa con meccanismo autosomico recessivo, più frequente nella popolazione caucasica: ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi e la frequenza dei portatori sani, asintomatici, è di 1:25 (1).

La malattia dipende dalle alterazioni di una glicoproteina di membrana di 1480 amminoacidi, espressa e funzionante nella porzione apicale della membrana delle cellule epiteliali, denominata *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR), che svolge funzioni di canale ionico del cloro (Figura 1).

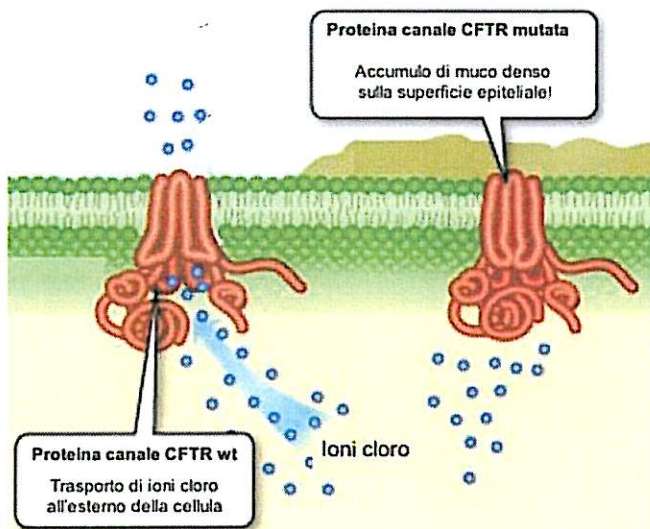


Figura 1: rappresentazione della proteina canale CFTR

Nei soggetti in cui la proteina CFTR non presenta alterazioni, i secreti salini vengono idratati e fluidificati poiché gli ioni cloro e sodio si associano al transito di acqua. Nei soggetti in cui la proteina CFTR è alterata, le secrezioni diventano più dense, causando i sintomi sistemici della malattia (Figura 2). Le secrezioni dense ostruiscono i bronchi favorendo lo sviluppo di infezioni, ostruiscono i dotti pancreatici, impedendo agli enzimi digestivi di giungere all'intestino, provocando malassorbimento

e deficit di accrescimento, a livello epatico rendono la bile densa, danneggiando il fegato (2).

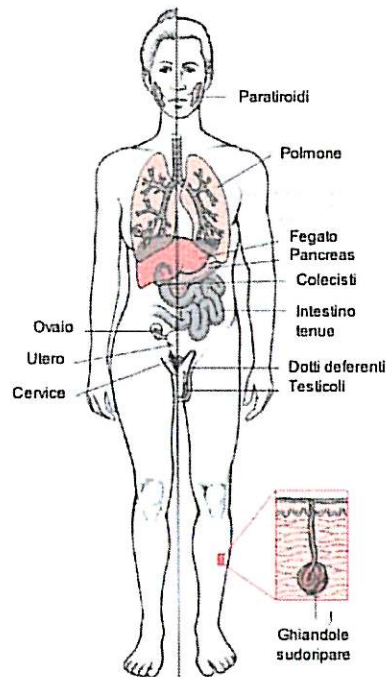


Figura 2: organi ed apparati coinvolti nella donna e nell'uomo nella Fibrosi Cistica.

Inoltre, a livello delle ghiandole sudoripare è compromesso il riassorbimento di ioni cloro e sodio. Infatti, i pazienti CF eliminano nel sudore una quantità eccessiva di NaCl che può essere dosato, dopo stimolazione delle ghiandole sudoripare con pilocarpina (test del sudore). Il test del sudore costituisce, da circa un secolo, il golden standard diagnostico per CF, soprattutto quando eseguito con il metodo di Gibson e Cooke (3). Il test consiste nel prelievo di una piccola quantità di sudore dalla parte volare dell'avambraccio, dopo stimolazione ionoforetica con pilocarpina, e nel successivo dosaggio del cloro. Il valore normale di cloro nel sudore è inferiore a 60 mEq/l. Il test si può eseguire a partire da 40° giorno di vita in bambini con un peso adeguato.

Il gene malattia della Fibrosi Cistica, codificante per la proteina CFTR, è stato mappato nel 1989 e sequenziato nel 1991. E' localizzato sul cromosoma 7, in posizione q31.2, ed è composto da 27 esoni (4). Ad oggi, sono state identificate oltre 1400 diverse mutazioni causative di CF: alcune sono diffuse ubiquitariamente (es. F508del, N1303K), altre sono specifiche

di ristretti ambiti etnico-geografici, e la maggior parte sono "private", cioè confinate a gruppi geografici o familiari. Per esempio, la mutazione più diffusa, la F508del, è presente nel 90% degli alleli CF in Danimarca ma solo nel 50% degli alleli CF in Italia (5). Pur essendo molto eterogenee, le mutazioni CF sono state raggruppate in 5 classi in base all'alterazione funzionale della proteina CFTR di cui sono responsabili (6). La classe 1 comprende le mutazioni che inducono un difetto della produzione della proteina, ovvero mutazioni nonsense, mutazioni frameshift che causano inserzioni o delezioni e mutazioni che possono alterare siti di splicing. La maggior parte di questo gruppo di mutazioni ha una frequenza di circa il 2% a livello dei cromosomi CF all'interno delle popolazioni studiate (G542X, R553X, W1282X) (6). La classe 2 include le mutazioni che alterano il "processing" della proteina CFTR, di conseguenza la proteina non matura e viene degradata a livello del reticolo endoplasmatico; inoltre la proteina non raggiungendo la membrana epiteliale non riesce ad esprimere la propria funzione. La DF508 è la più frequente tra le mutazioni della seconda classe che causano questa malattia (7). Le classi 3 e 4 comprendono mutazioni che non influiscono sulla produzione, maturazione e quindi sulla presenza della proteina sulla membrana delle cellule epiteliali interessate, ma provocano un deficit nell'attivazione del canale o un'alterazione della conduttanza. Le mutazioni di classe 3 interessano le regioni codificanti per i siti di legame per l'ATP e si manifestano con una severa diminuzione della conduttanza del cloruro; la mancata attivazione della proteina si traduce in un grave deficit della conduttanza dell'anione cloro (R553G). La classe 4 comprende le mutazioni che determinano un difetto della permeabilità ionica. Queste mutazioni coinvolgono i domini transmembrana e provocano una diminuzione del flusso ionico e una riduzione del tempo di apertura del canale (G85E). La classe 5 comprende, infine, mutazioni in siti di "splice" che riducono la quantità ma non la funzionalità della proteina CFTR (1811+1.6kb a>g) (Figura 3).

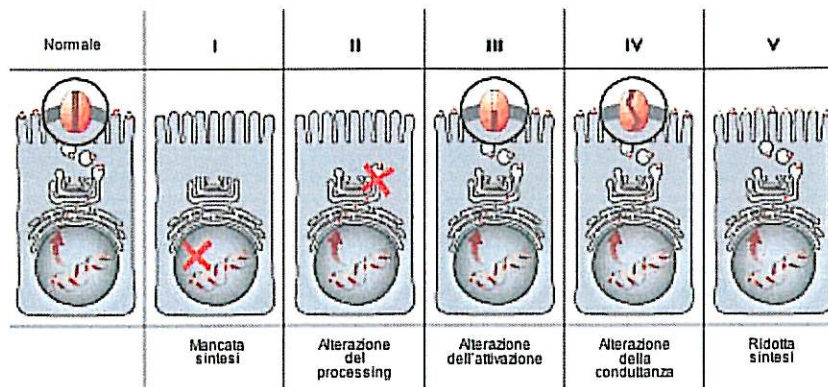


Figura 3: rappresentazione schematica delle 5 classi di mutazioni del gene CFTR in relazione all'alterazione funzionale prodotta.

La diagnosi della malattia è basata su criteri clinici e sul test del sudore. Viceversa, l'unico modo per identificare i portatori sani, del tutto asintomatici, è l'analisi molecolare del gene CFTR, effettuata con lo studio di pannelli di mutazioni determinati in base all'area geografica di provenienza del paziente (indagini di primo livello, detection rate dell'80% circa).

1.2 Discordanza genotipo-fenotipo nella CF

Il grande numero di mutazioni fino ad ora riscontrate nel gene CFTR, la grande variabilità del loro impatto sulla proteina e l'ampio spettro dell'espressione fenotipica della malattia, hanno favorito studi di correlazione genotipo-fenotipo (8);

E' noto che la Fibrosi Cistica è una malattia eterogenea, con un decorso clinico molto variabile. Vi sono infatti pazienti che vanno incontro a morte nei primi giorni di vita per occlusione intestinale da ileo da meconio (MI) (presente nel 10% dei casi); altri che presentano una insufficienza respiratoria severa nei primi mesi o anni di vita. Soprattutto negli ultimi anni sono stati individuati pazienti che sviluppano forme più lievi della malattia, con un decremento graduale della funzionalità respiratoria, diagnosticata in età avanzata e quindi raggiungono l'età adulta in buone condizioni.

Anche l'espressione d'organo della CF è estremamente eterogenea per frequenza e per espressione clinica: ad esempio la malattia epatica è presente soltanto in un terzo dei pazienti CF (prevalenza tra il 4% ed il 25-30%). E' estremamente interessante il fatto che il danno epatico non sia presente in tutti i pazienti affetti da Fibrosi Cistica, nonostante la proteina CFTR risulti essere alterata nell'albero biliare di questi soggetti.

La relazione tra il genotipo CFTR ed il fenotipo "insufficienza pancreatica" è ad oggi ben noto. Tuttavia non è stata ancora dimostrata la presenza di mutazioni del gene CFTR specifiche del danno epatico. Quindi i criteri ad oggi utilizzati per definire una diagnosi di Fibrosi Cistica associata a danno epatico sono clinici, biochimici ed ecografici. All'esame clinico del paziente devono essere osservate milza palpabile ed epatomegalia (fegato che supera di circa 2,5 cm il margine inferiore dell'arcata costale destra); dai risultati dei test biochimici è segnalato un persistente e significativo aumento (non meno di 1,5 volte superiore al range di riferimento) di almeno due enzimi (AST, ALT, AP, GGT) per un periodo superiore a sei mesi; all'esame ecografico deve essere presente una alterazione del parenchima epatico e segni di ipertensione portale. E' necessario escludere altre cause di malattia epatica cronica come epatite B, epatite C, epatite autoimmune per avere la certezza che il fenotipo epatico sia realmente causato dal genotipo CFTR. Il quadro clinico epatico nei pazienti CF spazia dalla lieve epatopatia cronica a forme più

severe di cirrosi giovanile che impongono il trapianto di fegato entro l'età pediatrica. La patogenesi della espressione epatica nei pazienti affetti da CF non è molto chiara. Alcuni studi hanno descritto pazienti CF con lo stesso genotipo, (DF508 in omozigosi) (9), ed aventi una espressione discordante del fenotipo epatico; allo stesso modo in altri studi sono stati analizzati fratelli omozigoti per la mutazione G542X (10), che pur avendo lo stesso genotipo CFTR presentavano una diversa espressione epatica della malattia. Proprio per questo motivo si è pensato che altri fattori genetici o ambientali, al di fuori del gene CFTR, potessero in qualche modo modulare l'espressione epatica dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

1.3 I geni modulatori del fenotipo epatico CF

La variabilità del fenotipo clinico CF osservata in soggetti portatori dello stesso genotipo oppure omozigoti per una mutazione nonsense, e la discordanza nell'espressione clinica della malattia in coppie di fratelli cresciuti nello stesso ambiente (10), ha aperto la strada all'ipotesi che il fenotipo epatico dei pazienti CF possa dipendere da geni ereditati indipendentemente dal CFTR e definiti "geni epistatici", in grado cioè di modulare l'espressione clinica nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

L'effetto di un gene modulatore può essere quello di cambiare l'espressività, la penetranza o la gravità di una malattia, sia migliorandola che peggiorandola. In generale, si tende a pensare che questi geni siano varianti alleliche comuni, con modesto impatto funzionale quando considerati nell'organismo sano, ma che possono agire come "modulatori" in particolari condizioni patologiche. L'identificazione dei geni modulatori del fenotipo dei pazienti CF potrebbe essere utile per migliorare la capacità predittiva della diagnosi molecolare, poiché permetterebbe di ottenere informazioni anche sulla gravità o sull'espressione d'organo della malattia.

Numerosi geni sono stati presi in considerazione come "candidati" ad esercitare il ruolo di modulatori dell'effetto delle mutazioni del gene CFTR e di conseguenza i sintomi della malattia. Alcuni geni candidati sono quelli implicati nella risposta immunologica ed infiammatoria, proprio perché varianti geniche potrebbero condizionare risposte diverse da soggetto a soggetto nei differenti organi e tessuti. Nel topo (11) e successivamente nell'uomo (12) è stato identificato un locus responsabile della modulazione dell'espressione gastrointestinale della malattia (in particolare dell'ileo da meconio). Inoltre, da uno studio europeo multicentrico effettuato su fratelli gemelli, è stato messo in evidenza come l'espressione polmonare dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica non dipenda solamente dal gene CFTR, ma da altri geni coinvolti nella modulazione del fenotipo respiratorio (13). Ancora in un altro studio, è stato riscontrato che geni associati al trasporto della proteina CFTR verso le cellule della superficie di membrana, sono in grado di modulare l'espressione polmonare dei pazienti CF (14).

Per quanto concerne l'espressione epatica nella Fibrosi Cistica, è stato visto che essa non dipende soltanto dal genotipo

CFTR ma anche in questo caso geni modulatori ereditati indipendentemente dal gene CFTR potrebbero modulare l'espressione epatica dei pazienti CFTR così come dimostrato per il fenotipo respiratorio e gastrointestinale (15).

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati tre geni candidati a modulare il fenotipo epatico dei pazienti CF: il gene codificante la lectina legante il mannosio (MBL), il gene-malattia dell'Emocromatosi ereditaria di tipo 1 (HFE) ed infine il gene codificante l'Alfa 1 antitripsina (SPE1).

Il gene della lectina legante il mannosio (MBL)

Tra i componenti alla base della risposta primaria, la lectina legante il mannosio (MBL) sembra avere un ruolo cruciale. MBL è una glicoproteina sintetizzata dal fegato e liberata nel compartimento ematico, da cui diffonde nelle sedi d'infiammazione in condizioni di aumentata permeabilità vascolare (fase acuta). Appartiene alla famiglia delle collectine, proteine caratterizzate dalla struttura simil-collagene e dall'attività lectinica. Sotto il profilo strutturale, la MBL si presenta come una molecola oligomerica composta da due fino a sei monomeri, ognuno dei quali costituito da tre polipeptidi (Figura 4).

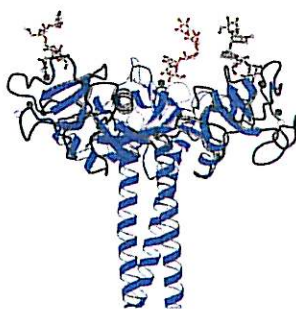


Figura 4: *Modello di struttura tridimensionale della Lectina legante il mannosio (MBL) nella sua unità strutturale omotrimerica.*

Ogni monomero è composto da quattro diversi domini (per ogni singola catena polipeptidica) come rappresentato nella figura 5 (16).

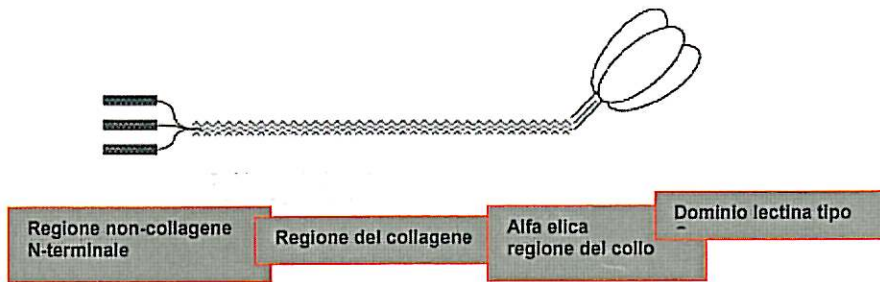


Figura 5: *Rappresentazione grafica della proteina MBL, come appare al microscopio elettronico nella caratteristica configurazione a mazzo di tulipano. I quattro domini sono: 1) il piccolo dominio posto all'N-terminale, ricco in cisteine ed essenziale per la successiva organizzazione della molecola in oligomeri; 2) il dominio simil collagene, responsabile della formazione di una lunga "coda" nella molecola; 3) la regione "collo", piccolo dominio di collegamento che possiede dunque solo funzione strutturale; 4) la "testa" globulare posta al C-terminale, responsabile della capacità di legare residui oligosaccaridici disposti sulla superficie dei patogeni (attività lectinica).*

La proteina possiede una duplice funzione: da un lato funge da opsonina, facilitando la fagocitosi di molti batteri, dall'altro costituisce un attivatore del complemento secondo la via lectinica. La prima di queste due funzioni viene svolta mediante il legame della porzione N-terminale di MBL al recettore per le collectine situato sul fagocito da un lato, e dalla diretta interazione della MBL, attraverso le teste globulari, con glicoproteine della parete microbica (residui oligosaccaridici di NAG, mannosio, fucosio) dall'altro. La specificità di legame della MBL con le glicoproteine batteriche è assicurata dalla scarsa rappresentazione di analoghi residui oligosaccaridici sulle cellule umane.

In aggiunta alla funzione opsonizzante della MBL, che costituisce una sorta di "ponte" tra fagocito e substrato, vi è l'attivazione del complemento attraverso la via lectinica. Questa seconda funzione è svolta dalla MBL in associazione con le serin proteasi associate alla MBL (MASP 1 e 2) (17). Secondo alcune ipotesi l'attivazione del complemento avverrebbe grazie alla forte omologia strutturale della MBL col C1q, tale da renderla capace di clivare i fattori C1r2, C1s2 e grazie alle

MASP1 e MASP2 capaci di scindere rispettivamente C4 -C2 e C3 -C2.

Il gene che codifica per la MBL è situato sul cromosoma 10 ed è composto da quattro esoni. Sono state descritte tre mutazioni puntiformi a carico del primo esone (R52C, G54D, G57E) (17), che provocando alterazioni nel dominio simil collagene e nel dominio N-terminale, impediscono l'assemblaggio dei monomeri in polimeri stabili e funzionali nonché l'interazione della MBL stessa con le MASP(Figura 6).

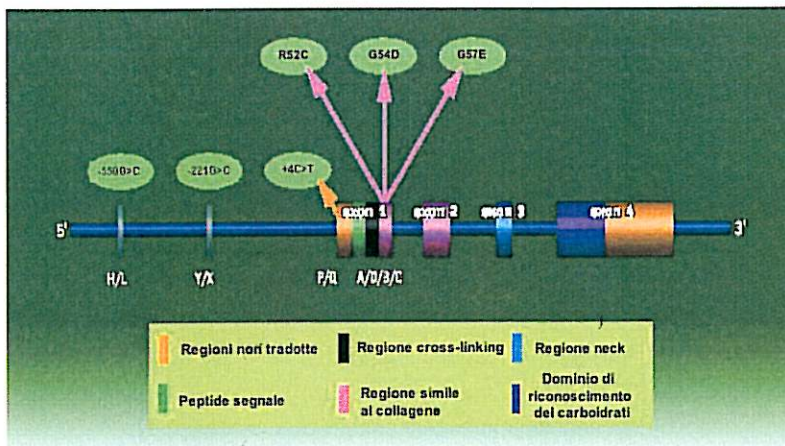


Figura 6: Struttura del gene della lectina legante il mannosio (MBL).

Fenotipicamente le mutazioni si evidenziano con un forte decremento della concentrazione di MBL circolante. L'effetto biochimico sembra essere dominante; infatti già allo stato di eterozigosi si verifica una drastica diminuzione dei livelli ematici della proteina (10%-20%), mentre in omozigosi questi valori possono ridursi a meno dell'1% della norma.

Si aggiungono, oltre a tali mutazioni, diversi dimorfismi allelici nella regione del promotore che influenzano la concentrazione e l'attività di MBL anche se in misura inferiore rispetto alle tre mutazioni descritte. Il dimorfismo più rilevante è localizzato in posizione -221, gli altri due sono localizzati in posizione -550 e +4. A causa del forte "linkage disequilibrium" tra i polimorfismi presenti nel promotore e nella regione codificante dell'esone 1 del gene umano MBL, sono stati descritti diversi aplotipi

derivanti dalle possibili combinazioni delle mutazioni descritte (18).

I deficit di MBL circolanti derivanti da mutazioni a carico del gene risultano in un deficit di opsonizzazione, e benché non sia stato possibile delineare una correlazione genotipo-fenotipo, il deficit comporta una maggiore predisposizione a contrarre infezioni ed un'elevata frequenza di infezioni recidivanti, conseguenza di una compromissione dell'immunità innata. Le infezioni si localizzano in numerosi distretti, conferendo perciò alla mutazione carattere pleiotropico. Sono state individuate infezioni nel tratto respiratorio (bronchiti croniche), nel tratto genitale, a carico di pazienti affetti da fibrosi cistica, da cirrosi epatica, da SLE ed in associazione con aborti ricorrenti, nonché una maggiore predisposizione a contrarre infezioni in utero (19).

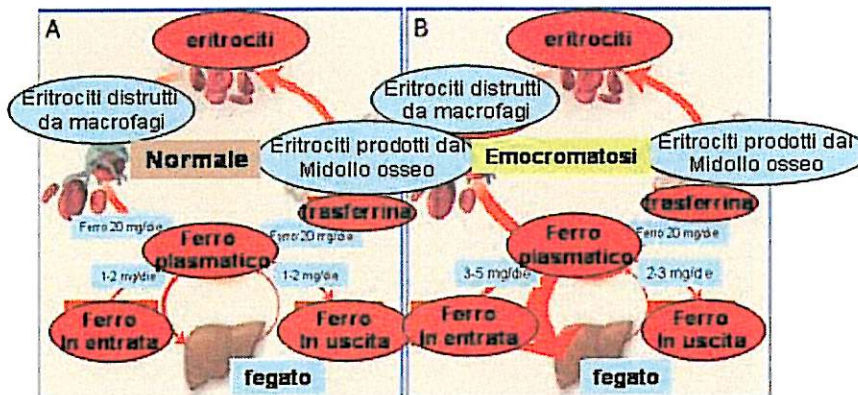
Il gene MBL, date le sue caratteristiche ed il suo ruolo nel processo di opsonizzazione, è stato considerato un possibile candidato a modulare il fenotipo epatico dei pazienti CF (8). In questi pazienti già predisposti all'epatopatia, la manifestazione epatica potrebbe essere aggravata per l'associazione con un deficit di MBL circolante, derivante da mutazioni a carico del gene.

Il gene-malattia dell'Emocromatosi di tipo I (HFE)

L'emocromatosi di tipo I è una malattia genetica autosomica recessiva caratterizzata da un sovraccarico di ferro con lesioni di organi parenchimatosi che si manifestano normalmente in età media. La prevalenza è di 1:500 e la frequenza del portatore sano è di 1:10 con un rapporto F/M di 1:3 (20). Le conseguenze tossiche tardive legate al sovraccarico marziale sono la cirrosi con alto rischio di evoluzione in epatocarcinoma, l'insufficienza cardiaca con disturbi di conduzione, il diabete, l'ipogonadismo, le atalgie etc. Il gene HFE, localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, codifica per una proteina di membrana coinvolta nella regolazione dell'assorbimento cellulare del ferro (20). Quando il gene HFE è mutato, viene sintetizzata una proteina che perde la capacità di interagire con il recettore della transferrina, favorendo il trasporto del ferro attraverso la mucosa intestinale (figura 7). Le mutazioni più frequenti del gene HFE sono la C282Y, la H63D e la S65C. La maggior parte dei pazienti affetti da emocromatosi è omozigote per la mutazione C282Y (85% nel Nord Europa, circa 60% nel Sud dell'Europa), una

minoranza risulta eterozigote composito C282Y/H63D, mentre, più rare sono altre forme di eterozigote composito (es., C282Y/S65C) (21). Anche i soggetti portatori di una mutazione nel gene HFE possono presentare un'anomalia nel bilancio marziale (elevazione della ferremia, ferritinemia e saturazione della transferrina) ma non sviluppano le manifestazioni cliniche tipiche dell'emocromatosi. Il gene HFE è stato selezionato come possibile candidato per modulare il fenotipo epatico in ienti CF perchè il genotipo mutato è associato a cirrosi epatica con elevato rischio evolutivo in epatocarcinoma (22).

Figura 7: A) Omeostasi del ferro in soggetti normali. B) Omeostasi del ferro in soggetti che presentano l'Emocromatosi.



Il gene Serpina 1 (SPE)

Il deficit dell'alfa-1-antitripsina è la principale causa di enfisema polmonare e di malattie epatiche epatiche congenite. Il gene dell'alfa-1-antitripsina è stato mappato sul cromosoma 14.q32.1, è lungo 12.2 Kb e contiene sette esoni. L'alfa-1-antitripsina è una proteina prodotta soprattutto dal fegato ma anche dai macrofagi e dalle cellule epiteliali respiratorie, successivamente è immessa nel circolo sanguigno con la funzione di inibire le proteasi seriche. L'alfa-1-antitripsina ha la funzione di contrastare l'azione della elastasi neutrofila, costituendo, quindi, il più importante sistema di difesa delle vie respiratorie inferiori contro i danni causati dalle elastasi sulle pareti degli alveoli polmonari.

Il deficit di alfa 1-antitripsina è tra le più frequenti malattie ereditarie che colpiscono polmoni e fegato. La patologia polmonare è causata dall'insufficienza di alfa-1-antitripsina funzionante, mentre la malattia epatica è presumibilmente determinata dall'accumulo negli epatociti di una forma di alfa-1-antitripsina anomala che costituisce degli aggregati insolubili all'interno delle cellule (23). L'età di manifestazione del deficit e l'entità del danno polmonare dipendono anche dall'abitudine al fumo: nei fumatori il danno polmonare conseguente al deficit di alfa-1-antitripsina è maggiore perché il fumo aumenta la produzione di proteasi da parte delle cellule del sistema immunitario. La malattia si manifesta soprattutto a livello polmonare, con l'insorgenza precoce di broncopneumopatia ostruttiva, in particolare enfisema e conseguente difficoltà nella respirazione. Raramente coesistono pneumopatia grave ed epatopatia grave.

Oltre che sulla valutazione del quadro clinico, la diagnosi si basa su specifiche analisi di laboratorio quali: analisi delle alfa-1-globuline (di cui l'alfa-1-antitripsina costituisce il 90%), dosaggio specifico dell'alfa-1-antitripsina, bassa capacità di inibizione delle proteasi, alti livelli serici di bilirubina, alti livelli di transaminasi.

Il gene Serpina 1 (SPE) responsabile della produzione di alfa-1-antitripsina è localizzato sul cromosoma 14. Sono note più di 75 varianti del gene, di cui più di 20 determinano alterazioni rilevanti nella funzionalità dell'alfa-1-antitripsina; la versione normale più comune è l'allele M, mentre, gli alleli Z, null, ed S sono quelli associati alla malattia (Figura 8) (24).

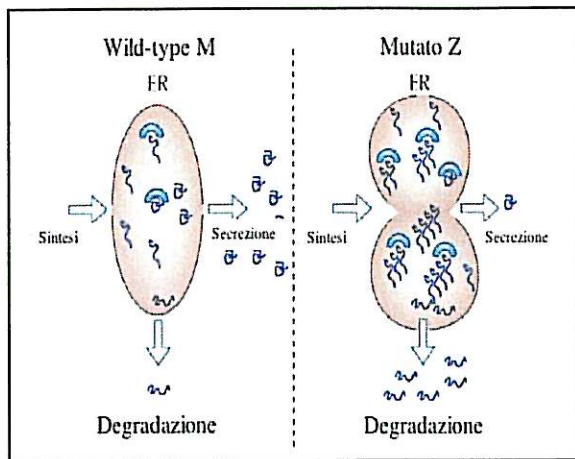


Figura 8: *schema del meccanismo di biosintesi della proteina A1AT nello stato di wild-type e mutante Z.*

Nella Tabella 1 sono riportate le varianti alleliche più comuni del gene Serpina 1.

Tabella 1: varianti alleliche del gene *Serpina 1*

GENOTIPO	STATO	LIVELLO DI A1AT	QUADRO CLINICO
MM	Normale	Livelli sierici > 2,5 g/l	Nessuna sintomatologia.
MZ	Portatore	Livelli sierici tra 0,5–2,5 g/l	Potrebbero manifestarsi i sintomi della malattia.
MS	Portatore	Livelli sierici tra 0,5–2,5 g/l	Potrebbero manifestarsi i sintomi della malattia.
ZZ-SZ	Omozigote, eterozigote composito	Deficit di A1AT. Livelli sierici vicini allo 0	il 20% degli omozigoti per l'allele Z sviluppa epatopatia.
SS	Omozigote	Deficit di A1AT. Livelli sierici vicini allo 0	I sintomi della malattia si manifestano solo nei fumatori.

Il deficit di alfa-1-antitripsina si trasmette come carattere autosomico recessivo. Mediante l'analisi molecolare è possibile rilevare le varianti alleliche più comunemente responsabili del deficit di alfa-1-antitripsina, per poi estendere l'analisi ai familiari ed eventualmente effettuare una diagnosi prenatale.

Il gene *SPE 1* è stato considerato come gene candidato a modulare il fenotipo epatico dei pazienti CF, poichè le varianti alleliche Z ed S sono state associate ad un accumulo di aggregati insolubili all'interno degli epatociti. Inoltre, poichè le varianti alleliche del gene *SPE 1* sono relativamente comuni nella popolazione caucasica, è stato ipotizzato un coinvolgimento nella modulazione del fenotipo epatico per questo gene (25).

2. Scopo del progetto

Presso i laboratori del DBBM-CEINGE, dove è stato svolto questo lavoro di tesi, sono stati analizzati alcuni dei geni che potrebbero essere implicati nella modulazione del fenotipo epatico della malattia: il gene Serpina 1 che codifica per l'Alfa-1-antitripsina (A1AT) e il gene-malattia dell'emocromatosi (HFE) entrambi responsabili di deficit proteici associati a malattie epatiche croniche del fegato. Inoltre è stato ripreso lo studio del gene della lectina legante il mannosio (MBL2), il cui deficit è associato ad un maggiore rischio infettivo nei confronti di alcuni agenti microbici, soprattutto nei primi anni di vita ed in presenza di altre affezioni di base. Il gene MBL era stato già preso in considerazione come possibile modulatore del fenotipo polmonare delle CF (dati non ancora pubblicati).

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti

Per l'analisi dei geni modulatori il fenotipo epatico sono stati selezionati tre gruppi di pazienti. I criteri di inclusione per l'espressione epatica sono stati: l'ipertensione portale (con varici esofagee o splenomegalia), la cirrosi multilobulare e il trapianto epatico, mentre tutte le altre cause (genetiche, metaboliche e virali) di malattia epatica sono state escluse. Inoltre al momento della selezione dei pazienti CF con espressione epatica, è stato preso in considerazione che le mutazioni associate con insufficienza pancreatica sembrano diminuire il rischio di malattia epatica (26, 27); per questo motivo sono stati inclusi nello studio pazienti che presentavano genotipi associati ad insufficienza pancreatica.

I pazienti inclusi nello studio sono stati reclutati dalle diverse cliniche che hanno preso parte al progetto: in parte presso alcune strutture di diagnosi e cura dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" di Napoli ed in parte presso il laboratorio di Genetica Medica dell'Istituto Mangiagalli di Milano, con il quale il nostro gruppo di ricerca collabora da diversi anni. Al momento dell'analisi molecolare i tre gruppi di pazienti sono stati suddivisi in questo modo:

- Il primo gruppo comprendeva 54 pazienti affetti da Fibrosi Cistica non imparentati tra loro, che presentavano una espressione epatica severa della malattia caratterizzata da cirrosi epatica,

ipertensione portale e trapianto di fegato; la maggior parte dei pazienti presentava la mutazione DF508 in omozigosi o in eterozigosi, e quasi tutti erano caratterizzati da insufficienza pancreatica (PI). In questo primo gruppo sono stati inclusi, inoltre, 17 pazienti affetti da Fibrosi Cistica che presentavano espressione epatica severa della malattia associata ad ileo da meconio (MI).

- Il secondo gruppo di pazienti era formato da 56 soggetti affetti da CF ma che non presentavano alcun disordine epatico e che erano strettamente compatibili per sesso e per età con il precedente gruppo di pazienti. Questo gruppo di soggetti presentava per lo più la mutazione DF508 in omozigosi o in associazione con un'altra mutazione. Anche questi pazienti erano caratterizzati da una forma di insufficienza pancreatica così come il gruppo dei soggetti con fenotipo epatico.
- Lo studio è stato esteso infine ad un terzo gruppo di 113 soggetti adulti, non affetti da CF, rappresentanti la popolazione di controllo sana.

Per tutti i pazienti sono stati raccolti i dati clinici, di laboratorio e strumentali utili alla loro classificazione. Tutti i pazienti hanno rilasciato il consenso informato a prendere parte, in forma anonima, allo studio. Da ognuno dei pazienti è stato prelevato un campione di sangue periferico per la successiva estrazione del DNA.

3.2 Strategia d'analisi per la caratterizzazione di geni modulatori il fenotipo CFTR

Analisi diretta delle varianti alleliche del gene MBL mediante RDB

Sono state analizzate 6 varianti alleliche del gene MBL: -550G>C, -221G>C, +4C>T, R52C, G54D, G57E mediante PCR seguita da reverse dot-blot.

Fase 1: amplificazione del DNA

L'amplificazione è stata ottenuta mediante multiplex PCR utilizzando specifiche coppie di "primers", relative alle regioni del gene dell'MBL di nostro interesse. Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:

95°C x 15	
95°C x 30"	
65°C x 30"	35 cicli
72°C x 60"	
72°C x 7'	

Fase 2: Reverse Dot Blot

Dopo la PCR, l'amplificato è stato denaturato chimicamente e posto in incubazione con una striscia di nitrocellulosa dove sono localizzate le sonde corrispondenti alle sequenze wild-type e mutate. Utilizzando la reazione biotina/streptavidina/fosfatasi alcalina, seguita da una reazione di coniugazione con il cromogeno NBT/BCIP, si forma un precipitato scuro che permette di visualizzare, per ogni mutazione, una o due bande colorate che consentiranno di stabilire la presenza o meno della mutazione testata e lo stato di omozigosi o eterozigosi. Le principali fasi della metodica sono schematizzate nella figura 9.

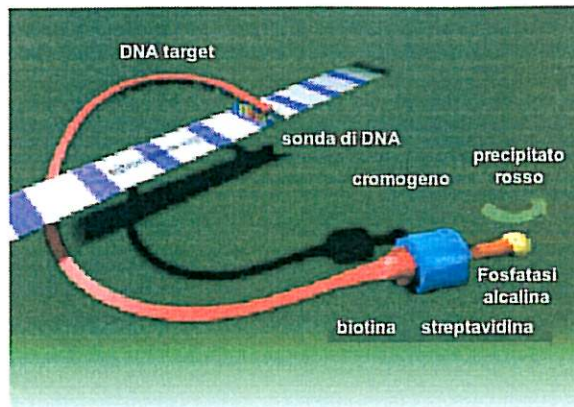


Figura 9: *schema della metodica reverse dot-blot.*

Per questa analisi è stato utilizzato un kit commerciale prodotto dalla Innogenetics (Figura 10).



Figura 10: esempi di differenti risultati ottenuti dall'analisi di MBL.

Analisi delle mutazioni del gene HFE mediante reverse dot-blot

Sono state routinariamente analizzate 12 mutazioni del gene HFE: V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P, P160delC mediante PCR seguita da reverse dot-blot (figura 9). Le due fasi della tecnica di PCR seguita da reverse dot blot sono comuni a quelle precedentemente descritte per il gene MBL2. Le due metodiche differiscono nel programma di amplificazione e nelle sonde depositate sulle striscette di nitrocellulosa. Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:

94°C x 2	
95°C x 15''	
58°C x 30''	35 cicli
72°C x 30''	
72°C x 3'	

Nella Figura 11 è riportata in maniera schematica la disposizione delle sonde wild-type e mutate sulla striscetta per il RDB dell'HFE.

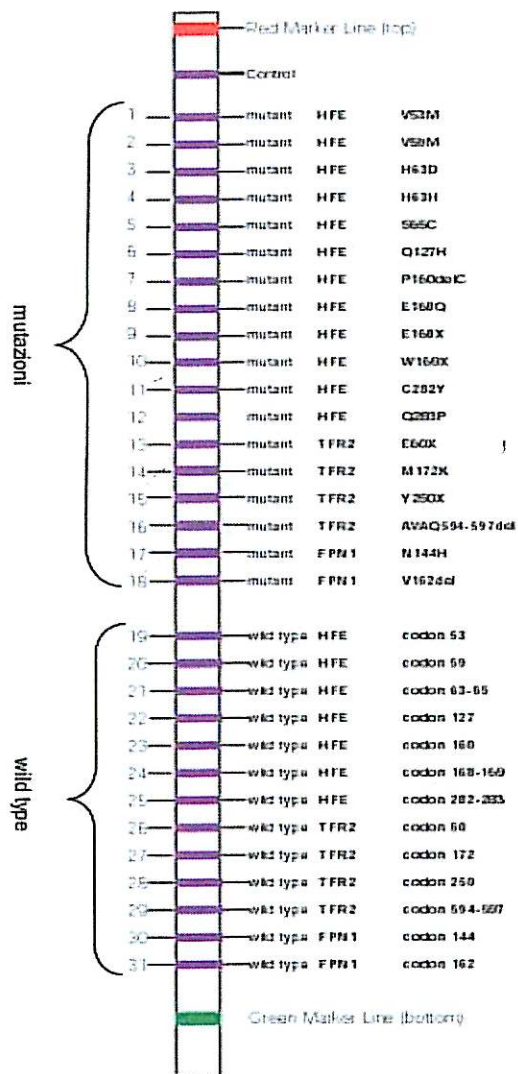


Figura 11: esempio di striscetta riportante le mutazioni analizzate mediante RDB per il gene HFE

Analisi mediante PCR e sequenziamento diretto dell'intero gene della Serpina 1 (SPE)

Tutte le PCR messe a punto per l'amplificazione del gene della Serpina 1 sono state eseguite su Thermal Cycler 9600 e 9700 della Applied Biosystems e per il controllo dell'amplificazione è stata eseguita un'elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in TBE 1X, utilizzando 10 µl della miscela di reazione.

Nella tabella 2 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per ciascun esone, con le relative temperature di annealing (T°A.) e la lunghezza in bp relativa al prodotto amplificato (28).

	Sequenze dei primer	Bp
Spe 2 A	TCATCATGTGCCTTGACTCG□GGTA TAGGCTGAAGGCGAAC	280
Spe 2 B	CCACCATGATCAGGATCACC□TCCA CTAGCTTCAGGCCCTC	382
Spe 2 C	CAATGGCCTGTTCCCTCAGC□GCÇAA GGAGAGTTCAAGAACTG	357
Spe 3	TCTTCCAAACCTTCACTCACC□TTCT TGGTCACCCTCAGGTT	393
Spe 4	GAACAAGAGGAATGCTGTGC□GGTG CAACAAGGTCGTC	270
Spe 5 A	GCCTTACAACGTGTCTCTGC□GATA GACATGGGTATGGCCTC	162
Spe 5 B	GAAAGGGACTGAAGCTGCTG□GTTG AGGAGCGAGAGGCAG	219

Tabella 2

Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:

96°C x 3	
96°C x 45''	
58°C x 60''	32 cicli
72°C x 60''	
72°C x 10'	

Il sequenziamento diretto degli esoni del gene della Serpina 1 (SPE) è stato effettuato mediante procedura di Sanger modificata (figura 12).

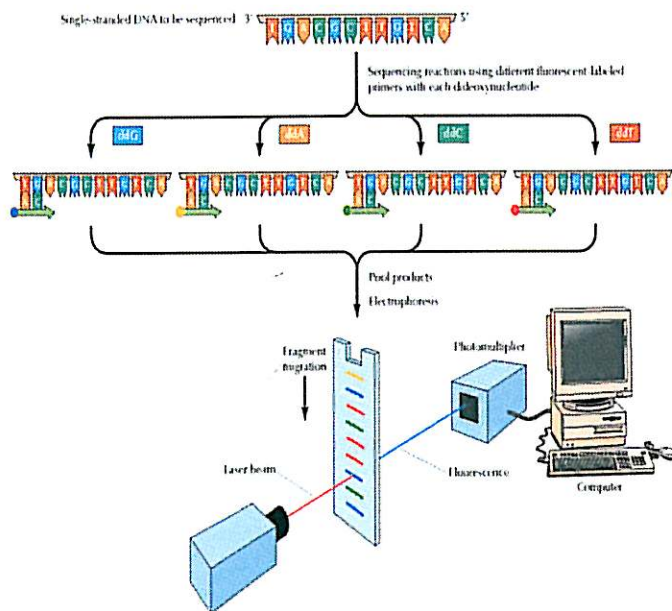
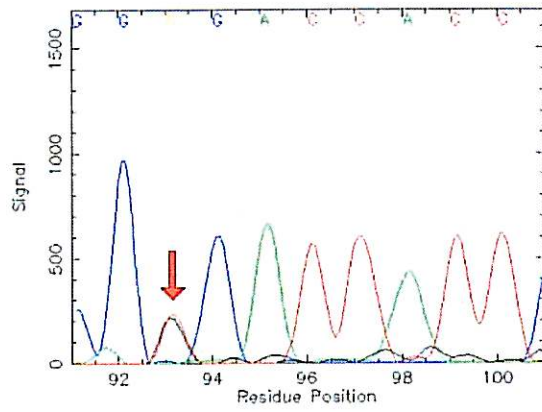


Figura 12: *schema della metodica del sequenziamento diretto (metodo di Sanger modificato)*

Gene Serpina: esone SPE 3



Gene Serpina: esone SPE 2

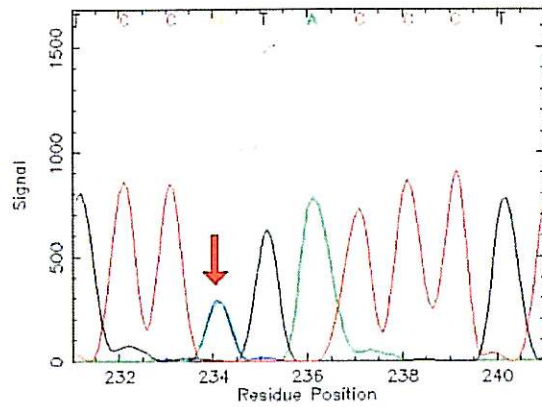


Figura 13: Esempi di elettroferogramma rappresentante: a) la mutazione V213A in eterozigosi e b) la mutazione R101H in eterozigosi.

4. Risultati

Per valutare il possibile ruolo dei geni HFE, SPE, MBL2, candidati come modulatori del fenotipo epatico, sono stati analizzati 240 soggetti di cui: 71 pazienti affetti da CF con espressione epatica severa della malattia (54 con espressione epatica e 17 con espressione epatica ed ileo da meconio); 56 pazienti affetti da CF che non presentavano alcun disordine epatico; 113 soggetti di controllo, adulti, non affetti da CF.

Il gene MBL

L'analisi delle tre mutazioni dell'esone 1 e delle tre mutazioni del promotore del gene MBL è stata effettuata innanzitutto nella popolazione di controllo sana (per un totale di 226 alleli). Sono stati identificati 112 soggetti portatori di diverse varianti alleliche, che se raggruppate costituiscono 22 diversi aplotipi precedentemente descritti (29) ed un aplotipo non riportato in letteratura, come elencato nella tabella 4. Il secondo gruppo analizzato è stato quello dei pazienti CF con espressione epatica della malattia. Su un totale di 142 alleli sono stati identificati 60 pazienti associati a 17 diversi aplotipi precedentemente descritti (29) ed un aplotipo non riportato in letteratura. Infine, sono stati analizzati i pazienti CF che non presentavano espressione epatica della malattia. Sono stati identificati 42 soggetti, su un totale di 112 alleli, che una volta raggruppati costituiscono 24 diversi aplotipi precedentemente descritti (29) ed un aplotipo non riportato in letteratura. I dati relativi alle tre popolazioni analizzate per il gene MBL sono riportati nella tabella 3.

71 pz. CF epatopatici		56 pz. CF non epatopatici		113 soggetti di controllo	
Aplotipo	N° pz.	Aplotipo	N° pz.	aplotipo	N° pz.
HYP A/HYP A	10	HYP A/HYP A	5	HYP A/HYP A	13
HYP A/HYP D	4	HYP D/HYP A	1	HYP D/HYP A	2
LXP A/HYP A	5	LXP A/HYP A	3	LXP A/HYP A	11
LXP A/HYP D	4	LXP A/HYP B	1	LXP A/HYP D	3
LXP A/LXP A	4	LXP A/LXP A	3	LXP A/HYQ A	3
LXP A/LYP A	1	LXP A/LYP A	1	LXP A/LXP A	1
LXP A/LYP B	1	LXP A/LYP B	1	LXP A/LYP A	3
LXP A/LYQ A	4	LXP A/LYQ A	10	LXP A/LYP B	4
LYP A/HYP A	2	LXP AHYP D	1	LXP A/LYQ A	19
LYP B/HYP A	7	LYP A/HYP A	1	LXP A/LYQ C	2
LYP B/HYP D	1	LYP A/LYP B	3	LXP A/LYQ C	1
LYQ A/HYP A	9	LYP A/LYQ C	1	LYP A/HYP A	4
LYQ A/HYP D	7	LYP B/HYP A	3	LYP A/LYQ C	2
LYQ A/LYP A	2	LYP B/HYP D	1	LYP B/HYP A	6
LYQ A/LYP B	4	LYQ A/HYP A	4	LYP B/HYP D	3
LYQ A/LYQ A	1	LYQ A/LYP B	1	LYQ A/HYP A	13
LYQ C/HYP A	1	SOLO SEQ	2	LYQ A/HYP D	1
non descritto	1	non descritto	1	LYQ A/LYP A	3
NO DNA	3			LYQ A/LYP B	8
				LYQ A/LYQ A	4
				LYQ A/LYQ C	3
				Non descritto	1

Tabella 3: aplotipi MBL riscontrati nelle tre popolazioni analizzate.

Il gene SPE1

L'analisi dei quattro esoni del gene SPE1 codificante per l'A1AT è stata effettuata in un primo momento su 84 soggetti sani tra quelli che costituiscono la popolazione di controllo. Sono stati identificati 57 alleli mutati, che se raggruppati costituiscono 6 diverse varianti alleliche precedentemente descritte (28); sono stati di seguito analizzati i pazienti CF con espressione epatica della malattia (142 alleli) e sono stati identificati 66 alleli mutati, che costituiscono 11 diverse varianti alleliche precedentemente descritte (28) ed una non riportata in letteratura. In particolare è stata riscontrata la presenza di una variante MS, che fenotipicamente corrisponde allo stato di

carrier; infine, sono stati analizzati i pazienti CF che non presentavano espressione epatica della malattia (112 alleli) e sono stati identificati 69 alleli mutati, che costituiscono 11 varianti alleliche precedentemente descritte (28). In particolare è stata riscontrata la presenza di due varianti MS, che fenotipicamente corrispondono allo stato di carrier. I dati relativi alle tre popolazioni analizzate per il gene SPE sono riportati nella tabella 4.

71 pz. CF epatopatici		56 pz. CF non epatopatici		84 soggetti di controllo	
varianti alleliche	N° pz	varianti alleliche	N° pz	varianti alleliche	N° pz
M	23	M	11	M3	15
M1	10	M1	6	M3/M3	2
M1/M1	1	M1/M1	2	M4	15
M1/M3/M4	1	M1/M3/M4	1	M2	10
M2	11	M2	9	M1	3
M3	6	M3	4	M4/M1	1
M3/M1	1	M3/M1	3	M	38
M3/M3	3	M3/M3	1		
M4	10	M4	9		
M4/M1	2	M4/M1	8		
MS	1	M4/S	1		
NO DNA	2	MS	1		

Tabella 4: varianti alleliche SPE riscontrate nelle tre popolazioni analizzate.

Il gene HFE

Per l'analisi molecolare del gene HFE è stato testato il pannello comprendente le 12 mutazioni più frequenti sulla popolazione di controllo e sono stati identificati 27 carrier di una mutazione in eterozigosi, tre omozigoti e un eterozigote composto (35 alleli mutati su 226). In un secondo momento sono stati tipizzati i 71 pazienti CF con espressione epatica della malattia. Su un totale di 142 alleli sono stati identificati 16 carrier per una mutazione e solamente 1 eterozigote composto (18 alleli mutati su 142). Infine, tra i 56 pazienti CF che non presentavano espressione epatica della malattia, 19 sono risultati carrier di una mutazione in eterozigosi, due omozigoti e uno eterozigote composto (25 alleli mutati su 112). Nella tabella

5 sono riportate le mutazioni del gene HFE riscontrate nelle tre popolazioni analizzate.

71 pz. CF epatopatici		56 pz. CF non epatopatici		113 soggetti di controllo	
Mutazioni	N° pz	mutazioni	N° pz	mutazioni	N° pz
C282Y in etero	1	C282Y in etero	2	C282Y in etero	3
H63D in etero	15	H63D in etero	16	H63D in etero	23
H63D/S65C	1	H63D omo	2	H63D/C282Y	1
Neg	55	H63D/S65C	1	H63D OMO	3
		S65C in etero	1	S65C in etero	1
		neg	34	Neg	82

Tabella 5: mutazioni del gene HFE riscontrate nelle tre popolazioni analizzate.

5. Discussione

Mediante l'analisi molecolare diretta sono stati analizzati i geni HFE, SPE1 ed MBL selezionati come candidati per modulare il fenotipo epatico. In un primo momento è stata caratterizzata la popolazione sana di controllo e successivamente i pazienti affetti da CF con e senza espressione epatica della malattia. Inoltre, il gruppo dei pazienti CF con espressione epatica è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi, uno costituito da 17 pazienti con ileo da meconio e l'altro da 52 pazienti senza ileo da meconio.

Per il gene *SPE1* è stata osservata una frequenza di mutazioni del 25% nella popolazione di controllo sana, in disaccordo con quanto riportato in letteratura per la popolazione caucasica (3%) (30), tra i pazienti CF con fenotipo epatico del 30% e del 60% tra i pazienti CF senza fenotipo epatico, mentre la frequenza di mutazioni è dell'67% nei 17 soggetti che presentavano sia l'espressione epatica che l'ileo da meconio (su 34 alleli, 23 presentavano mutazioni in eterozigosi). Dal confronto dei tre gruppi la distribuzione delle mutazioni risulta essere statisticamente significativa (più elevata) solo nei soggetti CF con ileo da meconio.

Sono state quindi esaminate le tre popolazioni per il gene malattia responsabile dell'Emocromatosi 1, HFE. Nella popolazione di controllo è stata evidenziata una frequenza del 15% degli alleli mutati, in accordo con quanto riportato in letteratura per la popolazione caucasica (12,5%) (31). Dai nostri dati emerge inoltre che l'incidenza delle mutazioni riscontrate nei 71 pazienti affetti da CF con espressione epatica della malattia corrisponde al 12%, per cui la differenza non risulta essere statisticamente significativa. Per quanto riguarda il sottogruppo dei pazienti CF epatopatici con ileo da meconio, su 34 alleli esaminati 4 risultavano essere portatori di una mutazione, con una frequenza del 12% ed infine i 56 pazienti CF senza espressione epatica presentavano il 22%.

Per il gene MBL è stata osservata la presenza di numerose varianti alleliche nelle tre popolazioni studiate. Dai dati ottenuti dall'analisi della popolazione di controllo è stata riscontrata un'incidenza dell'80% delle mutazioni in eterozigosi ed in eterozigosi composta, in netta discordanza con la frequenza del 5% riportata nella popolazione generale (29). Dai risultati ottenuti si evidenzia, inoltre, un'incidenza di mutazioni in eterozigosi ed eterozigosi composta dell' 80% tra i pazienti CF

con fenotipo epatico e del 75% tra i pazienti CF senza fenotipo epatico. Tra i 17 pazienti con fenotipo epatico ed ileo da meconio è stata riscontrata una frequenza dell' 82% di mutazioni in eterozigosi ed eterozigosi composta (su 34 alleli 30 risultavano mutati). Dal momento che le varianti alleliche se raggruppate costituiscono diversi aplotipi, e dal momento che l'aplotipo più riscontrato è risultato essere LXPA, associato ad un grave difetto di secrezione della proteina MBL, si è ritenuto opportuno elaborare dei dati sulla base della presenza del suddetto aplotipo. Si è visto infatti che presentavano l'aplotipo LXPA in eterozigosi, il 14% tra i pazienti CF con fenotipo epatico, il 53% dei soggetti con espressione epatica ed ileo da meconio, il 71% dei pazienti CF senza fenotipo epatico, mentre la frequenza di tale aplotipo è del 42% nella popolazione sana di controllo. Dal confronto dei quattro gruppi la distribuzione dell'aplotipo LXPA risulta essere statisticamente significativa nei soggetti CF con ileo da meconio, nei pazienti non epatopatici e nella popolazione di controllo ed in netta contrapposizione con la popolazione generale che presenta una frequenza dell'LXPA del 24% (29). Un dato sicuramente rilevante, che emerge dallo studio del gene MBL, è la bassa frequenza dei genotipi wild-type riscontrata nelle tre popolazioni (14% nella popolazione dei pazienti CF epatopatici, 9% per quelli che non presentavano espressione epatica e 11,5% nella popolazione di controllo sana) rispetto a quella riportata nella popolazione generale (30%) (29).

6. Conclusioni

Lo scopo del lavoro di tesi è stato quello di valutare il ruolo dei geni MBL, SPE, HFE nella modulazione del fenotipo epatico in soggetti affetti da Fibrosi Cistica. La scelta dei geni è stata effettuata seguendo l'approccio del gene candidato, ovvero mediante studi di associazione di geni coinvolti nei processi fisiologici della proteina CFTR. Sono state quindi selezionate tre popolazioni (popolazione di controllo, pazienti CF con espressione epatica e pazienti CF senza espressione epatica) ed è stata effettuata l'analisi diretta per la ricerca di mutazioni nei tre geni.

La frequenza di mutazioni riscontrate nella nostra popolazione di controllo, per ciascuno dei tre geni, è sovrapponibile rispetto a quella riportata in letteratura (29,30,31). Tra i pazienti con fenotipo epatico sono stati riscontrati molti portatori di mutazioni dei tre geni, ma la frequenza degli alleli mutati non è significativamente differente da quella riportata per la popolazione generale e quindi non è tale da giustificare un possibile ruolo di uno o di tutti e tre geni nella modulazione del fenotipo epatico.

Questi dati sono in disaccordo con alcuni studi recenti che hanno considerato la presenza di mutazioni nel gene MBL come un fattore prognostico sfavorevole, predittivo di una espressione polmonare più grave della malattia. Il gene MBL, infatti, è stato considerato come un possibile modulatore il fenotipo polmonare nei pazienti CF. In diversi studi sono state descritte varianti alleliche del gene, che producono una ridotta concentrazione sierica della proteina MBL associata ad un incremento del rischio di infezione da parte di una varietà di microrganismi sia nei bambini, che negli adulti. Inoltre è stato evidenziato come le mutazioni riscontrate a livello del gene MBL siano correlate a malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide ed il lupus eritematoso. In particolare è stato visto come nei pazienti affetti da CF che presentavano la stessa mutazione del gene CFTR, la presenza di un deficit di MBL possa essere associato ad una grave espressione del fenotipo respiratorio della malattia e ad una notevole diminuzione della sopravvivenza. In questi soggetti, infatti, aumenta significativamente il tasso di mortalità, nonché la necessità di trapianto di polmone (32).

Gli studi di associazione hanno dimostrato come l'identificazione di geni modificatori possa essere importante per

prevedere l'espressione clinica della malattia, e soprattutto quali saranno gli organi coinvolti, migliorando così l'inquadramento clinico e prognostico. Una volta identificati i geni modulatori sarà inoltre possibile utilizzare in modo mirato le terapie attualmente disponibili, nonché lo sviluppo di nuovi farmaci, basati sulla conoscenza del funzionamento di questi geni, e progettati per le diverse mutazioni a carico del gene CFTR.

L'identificazione di nuove mutazioni del gene CFTR permetterebbe di aumentare la detection rate dell'indagine molecolare, consentendoci di estendere l'analisi molecolare anche a soggetti attualmente non tipizzati, e di conseguenza ai consanguinei. Mentre la caratterizzazione di geni modulatori permetterebbe di effettuare un'analisi di correlazione tra il genotipo ed il corrispondente fenotipo clinico della malattia e di conseguenza potrebbe consentire la formulazione di una prognosi in tempi brevi oltre che di terapie mirate e personalizzate.

Bibliografia

- 1) McIntosh I, et al (1992) Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator and etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J* 6: 2775-2782.
- 2) Gregory RJ, et al. (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 27; 347: 382-6.
- 3) Gibson LE, et al (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549.
- 4) Zielenski J, et al. (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10:214-228.
- 5) www.genet.sickkids.on.ca Cystic Fibrosis mutation database
- 6) Casals T, et al (1993) Cystic Fibrosis in Spain :high frequency of mutation G542X in the Mediterranean coastal area. *Human Genet* 91:66-70.
- 7) Rendine S, et al (1997) Genetic history of Cystic Fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann. Human Genet* 61:411-424.
- 8) Salvatore F, et al (2002) Genotype-phenotype correlation in Cystic Fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 111:88-95.
- 9) Ferrari M, et al (1991) Cystic Fibrosis patients with liver disease are not genetically distinct. *Am J Hum Genet* 48:815-816.
- 10) Castaldo G, et al (1997) Sever liver impairment in a Cystic Fibrosis-affected child homozygous for the G542 X mutation. *Am J Med Genet* 17;69(2):155-8.
- 11) Parmley RR, et al (1998) Cystic fibrosis mice lacking Muc 1 have reduced amounts of intestinal mucus. *J Clin Invest* 102:1798-1806.
- 12) Zielenski J, et al (1999) A cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nature Genet* 22:128-129.
- 13) Ballman M, et al (1997) Variability of clinical phenotype in twins and siblings with cystic fibrosis: first epidemiological results of the european Cystic Fibrosis

- Twin and Sibling Study. (Abstract) *Pediatr Pulm S* 14:246.
- 14) Kerem E, et al (1996) Genotype-Phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 22:387-395.
 - 15) Castaldo G, et al (2001) Liver expression in Cystic Fibrosis could be modulated by genetic factors different from the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator genotype. *Am J Med Genet* 94, 294-7.
 - 16) Kilpatrick DC (2002) Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine* 12:335-351.
 - 17) Vang Petersen S, et al (2001) The manna-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol* 38:133-149.
 - 18) Wallis R (2002) Dominants effects of mutations in the collagenous domain of mannose-binding potein. *J Immunol* 168:4553-4558.
 - 19) Super M, et al (1989) Association of low levels of Mannan -binding protein with a common defect of opsonization. *Lancet* 2:1236-1239.
 - 20) Le Gac G, et al (2005) The molecular genetics of Haemocromatosis *Eur J Hum Genet* 13:1172-1185.
 - 21) Beutler E (2006) Hemocromatosis: genetics and pathophysiology *Annu Rev Med* 57:331-347.
 - 22) Rohlfis EM, et al (1998) Is the Haemocromatosis a modifier locus for Cystic Fibrosis? *Genet test* 2(1):85-8.
 - 23) Teckman JH, et al (2006) Alpha 1 antitrypsin deficiency: diagnosis, pathophysiology and management. *Current Gastroenterology Reports* 8:14-20.
 - 24) L. Cauduro Lima, et al (2001) Molecular analysis of the PI Z Allele in patients with liver disease. *Am J Med Genet* 104: 287-290.
 - 25) Cutting GR (2005) Modifier genetics: Cystic Fibrosis *Annu Rev Genom Human Genet* 6:237-260.
 - 26) Koch C, et al (2001) European epidemiology registry of cysyic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatric Pulmonology* 31:1-12.
 - 27) Wilschanski M, et al (1999) Clinical and genetic risk factors for Cystic Fibrosis liver disease. *Pediatrics* 103:52-57.

- 28) Hayes VM (2003) Genetic diversity of the Alpha 1 Antitrypsin gene in Africans identified using a novel genotyping assay *Hum Mutat* 22:59-66.
- 29) Casanova JL, et al (2004) Human Mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both? *J Exp Med* 199(10):1295-1299.
- 30) Perlmutter DH (2004) Alpha 1 antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. *Clin Liver Disease* 8:839-859.
- 31) Mura C, et al (1997) Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. *Hum Genet* 101:271-276.
- 32) Merlo CA, et al (2003) Modifier genes in Cystic Fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* 141:237-41.

Appendice I

Elenco delle pubblicazioni e delle comunicazioni 2002-2006

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI

1 Haemophilia B: from molecular diagnosis to gene therapy. G. Castaldo, P. Nardiello, F. Bellitti, A. Rocino, A. Coppola, G. Di Minno, F. Salvatore.
(Clin Chem Lab Med 2003;41(4):445-451)

2 Denaturing HPLC procedure for factor IX gene scanning G. Castaldo, P. Nardiello, F. Bellitti, A. Rocino, A. Coppola, G. Di Minno, F. Salvatore (Clinical Chemistry 49, No. 5, 2003)

COMUNICAZIONI A CONGRESSI O CORSI

1 Gene Screening of Factor IX in Patients Bearing Haemophilia B from Southern Italy. G. Castaldo, P. Nardiello, F. Bellitti, A. Rocino, A. Coppola, G. Di Minno, F. Salvatore. Abstracts Volume/Joint Meeting Clinbio 2002

2 Gene Screening of Factor IX in Patients Bearing Haemophilia B from Southern Italy: a Novel D-HPLC Procedure. G. Castaldo, P. Nardiello, F. Bellitti, A. Rocino, A. Coppola, G. Di Minno, F. Salvatore. Congresso Santorini, Greece, 25-28 September 2002.

3 Screening di varianti geniche di geni modulatori in pazienti con Fibrosi Cistica con fenotipo epatico. R. Tomaiuolo, F. Bellitti, A. Elce, V. Raia, D. Salvatore, G. Castaldo, F. Salvatore. 37° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC 2005), Roma 11 -14 ottobre 2005.

4 Ruolo patogenetico del gene MDR3 in bambini con colestasi a γ GT elevate e in pazienti con Fibrosi Cistica ed epatopatia. D. Degiorgio, C. Colombo, L. Porcaro, M. Seia, V. Bennato, R. Tomaiuolo, F. Bellitti, G. Castaldo, R. Iorio, G. Maggiore, G. Torre, A. Follesa, D.A. Coviello 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. (Società Italiana di Genetica Umana). 13-15 Ottobre 2004, Pisa

lated concentrations [mean (SD) differences, 0.6 (4.5)% 0.7 (3.9)%, 0.2 (13)%, and 0.8 (9.6)% for renal, heart, lung cystic fibrosis, and lung non-cystic fibrosis transplant patients, respectively] and good precision (root mean squared error, 1.1–5.7%).

The calculated RCE values at each studied sampling time for each profile for the five different populations are shown in Fig. 1. For each transplant patient, whatever the type of graft, the RCE value was within $\pm 20\%$ in a sampling-time interval from 110 to 130 min. A sampling-time error of ± 15 min produced a RCE $>20\%$ (up to 30%) in a few heart and lung transplant patients. As can be inferred from Fig. 1, in many patients t_{\max} was later than c_2 , which could be designated as "delayed absorption". The present data set included patients with a t_{\max} up to 5 h. In renal transplant patients, overestimation of c_2 was observed for $t < 120$ min and underestimation for $t > 120$ min. In lung and heart transplant patients, over- as well as underestimation of c_2 could be observed regardless of the time error, depending on the patient.

On the basis of data obtained in renal, heart, and lung transplant patients and using a validated pharmacokinetic method, the present study shows that when the sampling-time error around 2 h post dose increases, the relative concentration error and its interindividual variability also increase significantly. Although the impact of sampling-time error differed with the type of graft, an acceptable ($\pm 20\%$) estimation of the true c_2 value was obtained within a time-error range of ± 10 min for all 124 profiles. Interestingly, for renal transplant patients, the mean RCE was always $<10\%$ within this time range.

The c_2 target values defined for CsA TDM in renal and de novo liver transplant patients have been proposed with a range of $\pm 20\%$ (e.g., 1.7 mg/L $\pm 20\%$ for the 0–1 month post-transplantation period in renal transplantation) (4). We compared this range with the interlaboratory CV values of the International Cyclosporin Proficiency Testing Scheme, taken as estimates of the analytical error (15). For concentrations <500 $\mu\text{g/L}$ ($n = 12$; results for the year 2002), the mean CVs were 10% for the Emit and 6.0% for the FPIA. The interlaboratory CV obtained with a whole blood sample to which 2000 $\mu\text{g/L}$ cyclosporin had been added was 7.9% for the Emit ($n = 38$) and 7.2% for the FPIA ($n = 30$).

In summary, numerous studies have promoted a Neoral monitoring strategy using CsA blood concentrations measured 2 h after drug administration, called c_2 , to improve the clinical benefits for transplant patients. Guidelines for c_2 interpretations propose target values with a range of $\pm 20\%$. The present study shows that the accuracy of c_2 monitoring is highly dependent on the correct sampling time and that a substantial difference (up to 30%) from the 2-h values (which are themselves subject to analytical inaccuracy and imprecision) can occur with a sampling-time error of 15 min. Consequently, such time errors could lead to inappropriate dose

adjustment and to inadequate immunosuppression or increased risk of adverse effects. Timing errors of ± 10 min seem to be the acceptable limit for use of c_2 and subsequent dose adjustment of CsA.

References

1. Cantarovich M, Elstein E, De Varennes B, Barkun JS. Clinical benefit of Neoral dose monitoring with cyclosporine 2-hr post-dose levels compared with trough levels in stable heart transplant patients. *Transplantation* 1999;68:1839–42.
2. Nashan B, Cole E, Levy G, Thervet E. Clinical validation studies of Neoral C2 monitoring: a review. *Transplantation* 2002;73(Suppl 9):3–11.
3. Johnston A, David OJ. Pharmacokinetic validation of Neoral absorption profiling. *Transplant Proc* 2000;32(Suppl 3A):53–6.
4. Oellerich M, Armstrong VW. Two-hour cyclosporine concentration determination: an appropriate tool to monitor Neoral therapy. *Ther Drug Monit* 2002;24:40–6.
5. Belitsky P, Levy GA, Johnston A. Neoral absorption profiling: an evolution in effectiveness. *Transplant Proc* 2000;32(Suppl 3A):45–52.
6. Holt DW. Cyclosporin monitoring based on C2 sampling. *Transplantation* 2002;73:953–9.
7. Levy GA, Thervet E, Lake J, Uchida K. Patient management by Neoral C2 monitoring: an international consensus statement. *Transplantation* 2002;73(Suppl 9):12–8.
8. Cole E, Midtvedt K, Johnston A, Pattison J, O'Grady C. Recommendations for the implementation of Neoral C2 monitoring in clinical practice. *Transplantation* 2002;73(Suppl 9):19–22.
9. Leger F, Debord J, Le Meur Y, Rousseau A, Büchler M, Lachatre G, et al. Maximum a posteriori Bayesian estimation of oral cyclosporine pharmacokinetics in stable renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:71–80.
10. Cooney GF, Jeevanandam V, Choudhury S, Feutren G, Mueller EA, Eisen HJ. Comparative bioavailability of Neoral and Sandimmune in cardiac transplant recipients over one year. *Transplant Proc* 1998;30:1892–8.
11. Monchaud C, Léger F, Rousseau A, David O, Cooney G, Marquet P. Bayesian forecasting of oral cyclosporine in cardiac transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2001;23:468.
12. Debord J, Risco E, Harel M, Le Meur Y, Büchler M, Lachâtre G, et al. Application of a gamma model of absorption to oral cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:375–82.
13. Rousseau A, Monchaud C, Debord J, Vervier I, Estenne M, Thiry P, et al. Bayesian forecasting of oral cyclosporine pharmacokinetics in stable lung transplant recipients with and without cystic fibrosis. *Ther Drug Monit* 2003;25:28–35.
14. Sheiner LB, Stuart LB. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981;9:503–12.
15. Analytical Services International Limited. <http://www.bioanalytics.co.uk> (accessed December 2002).

Denaturing HPLC Procedure for Factor IX Gene Scanning, Giuseppe Castaldo,^{1,2} Paola Nardiello,¹ Fabiana Bellitti,¹ Angiola Rocino,³ Antonio Coppola,⁴ Giovanni di Minno,⁴ and Francesco Salvatore^{1*} (¹ Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" and CEINGE-Biotecnologie Avanzate, I-80131 Napoli, Italy; ² Facoltà di Scienze, Università del Molise, 86100 Isernia, Italy; ³ Centro Emofilia e Trombosi, Ospedale S.G. Bosco, 80141 Napoli, Italy; ⁴ Centro di Coordinamento Regionale Emocoagulopatie, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy; * address correspondence to this author at: Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II", via S. Pansini 5, I-80131 Naples, Italy; fax 39-081-746-3650, e-mail salvator@unina.it)

Hemophilia B (HB) is an X-linked recessive bleeding disorder caused by mutations that produce factor IX (FIX)

deficiency. The incidence of HB is ~1:30 000 live male births. The *FIX* gene spans ~34 kb and contains eight exons. The disease results from a myriad of mutations, and because of the rapid turnover of *FIX* mutations, there is no common mutation pattern in any ethnic group (1). Carrier and prenatal diagnosis can be made by linkage analysis (1, 2), which is rapid and inexpensive but limited by noninformative families, recombinant events, and the high incidence of germline mutations (1). Denaturing gradient gel electrophoresis (3, 4) and direct gene sequencing (5-8) have been used for the direct identification of *FIX* mutations. Denaturing reversed-phase HPLC (D-HPLC), which has been used to scan several disease genes, is more sensitive than other scanning procedures and less expensive than direct sequencing (9-13). In addition, the post-PCR analysis can be automated.

We developed an original D-HPLC screening procedure for the whole *FIX* gene and analyzed a cohort of 18 unrelated HB patients from Southern Italy previously typed by direct sequencing. In all patients, diagnosis was confirmed by *FIX* assay (Table 1). The study was approved by the institutional ethics committee.

After obtaining informed consent, we collected blood samples by venipuncture at the time of sampling for routine molecular analyses and extracted the DNA with the "Nucleon" procedure (Amersham). Each DNA sample was amplified by PCR for all *FIX* exons and for the promoter region and then was analyzed by sequencing and by D-HPLC. *FIX* exons 2 to 7 were amplified using primers described elsewhere (5). Exon 1 and the upstream region of *FIX* (i.e., from the nucleotide -482), which includes the promoter, were amplified using novel primers:

Promoter forward: 5'-CAAGCTACAGGCTGGAGACA-3'

Promoter reverse: 5'-TCTCCCTCAATGGGTCTTTG-3'
Exon 1 forward: 5'-TTCAGACTCAAATCAGCCACA-3'
Exon 1 reverse: 5'-AAAAGGCAAGCATACTCAATGT-3'

Exon 8 was amplified in two fragments of ~400 bp, each using the following novel primers:

Exon 8 (proximal) forward: 5'-TTGCCAATTAGGT-CAGTGGTC-3'
Exon 8 (proximal) reverse: 5'-ATGTGGCTCGGTCAA-CAAGT-3'
Exon 8 (distal) forward: 5'-TTTGCATTGCTGACAAG-GAA-3'
Exon 8 (distal) reverse: 5'-GCCCTGTAAATTTTCAAT-TCCA-3'

The PCR mixture included, for each amplification, the following reagents in a final volume of 50 μ L: 100 ng of DNA, 1 \times PCR buffer (Applied Biosystems), 250 μ M each deoxynucleotide triphosphate (Amersham), 600 nM each of the primers (forward and reverse), 1.5 mM MgCl₂, and 1 U of *Taq* polymerase (Applied Biosystems). The PCR conditions were set up to amplify all of the fragments with the same program. The protocol was as follows: denaturation, 1 cycle at 94 °C for 3 min; amplification, 14 touchdown cycles at 94 °C for 20 s, 61 °C for 40 s (decreasing 0.5 °C/cycle), and 72 °C for 45 s; 25 cycles at 94 °C for 20 s, 54 °C for 40 s, and 72 °C for 45 s; and primer extension, 1 cycle at 72 °C for 7 min.

Sequence analysis was performed using the Sanger protocol (14) with an automated procedure in which the four terminator reactions were marked with fluorescent dideoxynucleotides; the fragments were analyzed with the 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems).

We used the WAVE system 3500 (Transgenomic) for

Table 1. *FIX* mutations identified by direct sequencing in 18 unrelated patients with HB.

Patient	<i>FIX</i> concentration, %	Exon	Optimum temperature, °C	Initial concentration buffer B, %	Nucleotide change	Amino acid change
1	7.9	2	57	55	6488C→T	T38I
2	<1.0	4	55	54	10497G→C	C82S
3	<1.0	5	58	52	17698T→C	C95R
4	<1.0	5	58	52	17700C→A	C95X
5	2.0	5	58	52	17748T→A	C111X
6	3.0	6	58	56	20414G→A	R145H
7	<1.0	6	58	56	20518C→T	R180W
8	<1.0	6	58	56	20519G→A	R180Q
9	1.5	7	56	55	30150G→A	A233T
		Promoter	56	54	-323T→C	
10	12.0	8 proximal	58	58	30855A→G	E245G
11	4.2	8 proximal	58	56	30855A→G	E245G
12	6.1	8 proximal	58	58	30864G→A	R248Q
13	1.0	8 proximal	58	58	30875C→T	R252X
14	30.0	8 proximal	59	56	31007A→G	T296A
15	5.2	8 distal	58	56	31119G→A	R333Q
16	<1.0	8 distal	58	56	31133C→T	R338X
17	0.5	8 distal	58	56	31203G→A	C361Y
18	0.3	8 distal	58	56	31260C→T	T380I

D-HPLC analysis. PCR samples from HB patients were mixed with a PCR sample from a healthy individual, denatured at 95 °C for 5 min, and left at room temperature for 45 min, a procedure that allowed heteroduplexes to form if a mutation was present in the sample from the patient. DNA aliquots (5–8 μ L) were loaded on a preheated C_{18} reversed-phase column [DNASep; 4.5 (i.d.) \times 50 mm; Transgenomic]. The oven temperature for optimal heteroduplex separation with partial DNA denaturation was deduced from the melting profile of the DNA sequence. Wavemaker 4.1.40 software (Transgenomic) was used to compute melting curves and to establish the temperature for analysis, i.e., the temperature at which 30% of the sequence was denatured. DNA was eluted from the column by a linear acetonitrile gradient in 0.1 mmol/L triethylamine acetate (TEAA) buffer, pH 7.0, (Transgenomic) at a constant flow rate of 0.9 mL/min. The gradient was formed by mixing buffer A (0.1 mmol/L TEAA) and buffer B (0.1 mmol/L TEAA containing 250 mL/L acetonitrile). The analytic gradient lasted 4 min, and buffer B was increased by 2% per min. For each fragment, the initial concentration of buffer B was adjusted to obtain a retention time of 4–5 min (see Table 1). The column was then cleaned with 100% buffer B for 30 s and equilibrated at the starting conditions for 6 s before the next injection. Elution of DNA was detected by the absorbance at 260 nm. HSM software (Transgenomic) regulated each setting of the Wave system during analysis and stored the data.

Sequence analysis identified a mutation in all 18 DNA samples from our HB patients (Table 1). All variants were point mutations: 4 were nonsense, and the other 14 were missense mutations. A gene variant ($-323T \rightarrow C$) was identified 323 nucleotides upstream from the gene in a patient who also carried the A233T mutation in exon 7 (Table 1, case 9). These findings confirm the heterogeneity of *FIX* mutations (1, 15). In fact, unlike other frequent genetic disorders, such as hemophilia A, in which ~50% of patients carry an inversion of F8C intron 8 (1), and cystic fibrosis, in which the microdeletion DF508 is present in up to 80% of mutated alleles (16), no predominant or ethnicity-specific mutations were present in the *FIX* gene in patients with HB.

The D-HPLC method identified all 18 mutations. We first performed D-HPLC using the temperature indicated by the Wavemaker software; we then modified the run temperatures in 1 °C steps. For most fragments, the optimal temperature (shown in Table 1) exceeded that indicated by the software by 1–4 °C; in fact, an increase in oven temperature caused a decrease of the retention time, thereby allowing better resolution of the heteroduplexes.

Several examples of D-HPLC profiles obtained in patients bearing *FIX* mutations as compared with the D-HPLC wild-type profile are shown in Fig. 1. Fig. 1A shows a DNA sample bearing the T38I mutation in exon 2 compared with the wild-type profile; the mutation appears as a two-peak profile. Fig. 1B shows a DNA sample bearing the A148T polymorphism (exon 6); in this case, the DNA sample bearing the variant also appears as a

two-peak profile. Fig. 1C shows a DNA sample bearing a double variant of exon 6, i.e., the A148T polymorphism and the R180W mutation. In this case there were three peaks.

The D-HPLC procedure is reproducible: all 18 samples from HB patients were analyzed twice by two operators who obtained the same results. In addition, our study confirms the high sensitivity of D-HPLC reported in the evaluation of *CFTR* mutations (9, 10) and several other genes (13). The sensitivity of D-HPLC depends on three factors: (a) Each DNA sample must be run at its optimal temperature. A large spectrum of run temperatures must be used with large DNA fragments and with DNA fragments that have several melting domains with different temperatures (9); several software packages are available to calculate the optimal D-HPLC conditions [see, e.g., the Stanford web site (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>)]. (b) The formation of heteroduplexes in DNA

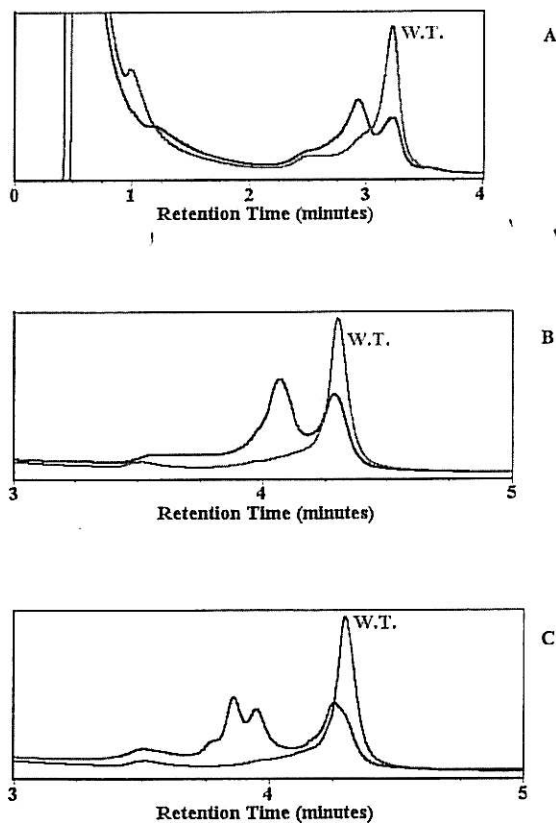


Fig. 1. D-HPLC profiles obtained in patients bearing *FIX* mutations compared with the D-HPLC wild-type profile.

(A), DNA sample bearing the T38I mutation in exon 2 compared with the wild-type (W.T.) profile; the mutated sample appears as a two-peak profile. (B), DNA sample bearing the A148T polymorphism (exon 6); in this case, the variant also appears as a two-peak profile. (C), DNA sample bearing a double variant of exon 6, i.e., the A148T polymorphism and the R180W mutation; in this case, the altered profile shows three peaks.

samples bearing mutations must be correct. In the case of X-linked diseases, this requires the equimolar mixing of PCR products between a wild-type DNA sample and the sample to be tested. (c) The type of mutations searched for must be detectable by D-HPLC. D-HPLC is more sensitive in the screening of point mutations, which is the case of most *FIX* mutations (1). In any case, once the D-HPLC conditions have been defined, a prospective study of a novel population sample should be performed to confirm the detection rate of the D-HPLC procedure.

The D-HPLC scanning procedure described here is fast because all of the DNA fragments can be amplified under the same conditions, the post-PCR phase is automated, and each D-HPLC run requires only 6 min. The protocol for D-HPLC scanning of the entire *FIX* gene is completed in <5 h. Finally, the D-HPLC method is cost-effective: we calculated that it costs approximately US \$25 to scan the whole *FIX* gene, excluding instrument and personnel costs. Direct sequencing has a 100% sensitivity, and rapid protocols have been set up to analyze all *FIX* gene fragments under the same PCR conditions (6) or in single multiplex PCR amplifications (5). Direct *FIX* gene sequencing has been shown to be efficient in various ethnic-geographic groups (5–8). However, direct sequencing is more expensive than D-HPLC. On the other hand, scanning procedures have a sensitivity of ~75–90% (10), and in most studies D-HPLC was more sensitive than other scanning procedures, as recently demonstrated for the factor VIII gene (11) and for several other disease genes (12,13). Furthermore, denaturing gradient gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis are more difficult to automate (9).

In conclusion, D-HPLC scanning of the *FIX* gene with the procedure described here is suitable for the routine diagnosis of HB and for carrier diagnosis if the proband is not available. Using this procedure, we have confirmed the heterogeneity of *FIX* gene mutations in HB patients from Southern Italy.

We gratefully acknowledge grants from MIUR (DM 623/96), CNR (T.P. Biotecnologie), Ministero della Salute and Regione Campania (L. 502/92), Ministero della Salute (Progetti speciali, D.L.vo 299/99, bando 2001-02) and Regione Campania (Ricerca Sanitaria Finalizzata). We are indebted to Jean Ann Gilder for editing the text.

References

- Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *J Clin Pathol* 2000;55:1–18.
- Caprino D, Acquilla M, Mori PG. Carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia B with more advanced techniques. *Ann Hematol* 1993;67:289–93.
- Gejman PV, Cao Q, Guedj F, Sommer S. The sensitivity of denaturing gradient gel electrophoresis: a blinded analysis. *Mutat Res* 1998;382:109–14.
- Tartary M, Vidaud D, Piao Y, Costa JM, Bahnak BR, Fressinaud E, et al. Detection of a molecular defect in 40 of 44 patients with haemophilia B by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Br J Haematol* 1993;84:662–9.
- Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D. Factor IX gene sequencing by a simple and sensitive 15-hour procedure for haemophilia B diagnosis: identification of two novel mutations. *Br J Haematol* 2000;111:549–51.
- Costa JM, Ernault P, Vidaud D, Vidaud M, Meyer D, Lavergne JM. Fast and efficient mutation detection method using multiplex PCR and cycle sequencing—application to haemophilia B. *Thromb Haemost* 2000;83:244–7.
- Jaloma-Cruz AR, Scaringe WA, Drost JB, Roberts S, Li X, Barros-Nunez P, et al. Nine independent F9 mutations in the Mexican hemophilia B population: nonrandom recurrences of point mutation events in the human germline. *Hum Mutat* 2000;15:116–7.
- Attali O, Vinciguerra C, Trzeciak MC, Durin A, Perrod G, Gay V, et al. Factor IX gene analysis in 70 unrelated patients with haemophilia B: description of 13 new mutations. *Thromb Haemost* 1999;82:1437–42.
- Le Maréchal C, Audrézet MP, Quéré I, Raguénès O, Lagonné S, Férec C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet* 2001;108:290–8.
- Ravnik-Gravak M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC screening of cystic fibrosis gene mutations. *Hum Mutat* 2002;19:374–83.
- Oldenburg J, Ivaskovic V, Rost S, Fregin A, White K, Holinski-Feder E, et al. Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47:39–51.
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum Mutat* 2001;17:439–74.
- Ellis LA, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Hum Mutat* 2000;15:556–64.
- Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4354–5.
- Wacey AJ, Krawczak M, Kakkav VV, Cooper DN. Determinants of the factor IX mutational spectrum in haemophilia B: an analysis of missense mutations using a multi-domain molecular model of the activated protein. *Hum Genet* 1994;94:594–608.
- Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1994;4:167–77.

Fasting vs Nonfasting Plasma Homocysteine Concentrations for Diagnosis of Hyperhomocysteinemia, M. Rebecca Fokkema,^{1*} Marleen F. Gilissen,¹ Jasper J. van Doormaal,² Marcel Volmer,¹ Ido P. Kema,¹ and Frits A.J. Muskiet¹ (Departments of ¹Pathology and Laboratory Medicine and ²Internal Medicine, University Hospital Groningen, NL-9700 RB Groningen, The Netherlands; *address correspondence to this author at: Pathology and Laboratory Medicine, University Hospital Groningen, CMC-V, Room Y1.165, PO Box 30.001, NL-9700 RB Groningen, The Netherlands; fax 31-50-3612290, e-mail m.r.fokkema@path.azg.nl)

Hyperhomocysteinemia, a risk factor for cardiovascular and thrombotic disease, pregnancy complications, and cognitive disorders, is defined as a fasting plasma total Hcy (tHcy) above a chosen cutoff value (1, 2). Reducing both the analytical and biological variation may add to the diagnostic value of any test. tHcy analytical variation (CV_a) is method-dependent and ranges from 2.7% to 4.9% for fluorescence polarization immunoassays and from 2.5% to 14% for HPLC assays (3). The reported biological variations for tHcy under fasting or otherwise standardized conditions include 20–34% interindividual variation (CV_b) and 7–11% (with a single extreme of 15–17%) intraindividual variation (CV_i) (4–9). Because of the short-term influence of meals, e.g., protein, on CV_i (10), it is generally recommended that blood samples be collected under fasting or otherwise meal-standardized conditions. The influence of protein intake on between-day CV_i is, however, unknown. The necessity for fasting has

Haemophilia B: From Molecular Diagnosis to Gene Therapy

Giuseppe Castaldo^{1,2*}, Paola Nardiello¹, Fabiana Bellitti¹, Rita Santamaria³, Angiola Rocino⁴, Antonio Coppola⁵, Giovanni di Minno⁵ and Francesco Salvatore¹

¹Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli "Federico II" and CEINGE-Biotecnologie avanzate, Napoli, Italy

²Facoltà di Scienze, Università del Molise, Isernia, Italy

³Dipartimento di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy

⁴Centro Emofilia e Trombosi, Ospedale S.G.Bosco, Napoli, Italy

⁵Centro di Coordinamento Regionale Emocoagulopatie, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy

Thanks to its typical expression, haemophilia can be identified in writings from the second century AD. Haemophilia B, an X-linked recessive bleeding disorder due to factor IX (FIX) deficiency, has an incidence of about 1:30000 live male births. The *factor 9 (F9)* gene was mapped in 1984 on Xq27.1. Haemophilia is diagnosed from prothrombin time, activated partial thromboplastin time and FIX levels. Carrier females are usually asymptomatic and must be identified only with molecular analysis. Linkage analysis of *F9* polymorphisms is rapid and inexpensive but limited by non-informative families, recombinant events, and the high incidence of germline mutations; thus, various procedures have been used for the direct scan of *F9* mutations. We set up a novel denaturing high performance liquid chromatographic procedure to scan the *F9* gene. This rapid, reproducible procedure detected *F9* mutations in 100% of a preliminary cohort of 18 haemophilia B patients. Parallel to the development of more efficient diagnostic tools, the life expectancy and reproductive fitness of haemophilic patients have greatly improved and will continue to improve thanks to the use of less immunogenic recombinant FIX. Hopefully, new approaches based on gene therapy now being evaluated in clinical trials will revolutionise haemophilia B treatment. Clin Chem Lab Med 2003; 41(4):000-000

Key words: Denaturing HPLC (D-HPLC); Factor 9 (F9); Factor IX (FIX); Mutations.

Abbreviations: aPTT, activated partial thromboplastin time; CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; D-HPLC, denaturing high performance liquid chromatography; FVIII, factor VIII (protein); *F8*, factor 8 (gene); FIX, factor IX (protein); *F9*, factor 9 (gene); HA, haemophilia A; HB,

haemophilia B; PT, prothrombin time; SSCP, single-strand conformation polymorphism.

Haemophilia through the Ages

Thanks to its classical features of bleeding, the male expression and the model of inheritance of haemophilia can be unequivocally identified in ancient writings. Male Jews in the second century AD were exempt from circumcision if two brothers had previously died of bleeding. In the 12th century, the rule was extended to the son of a twice-married woman, which indicates knowledge of X-linked inheritance (1). We owe the first systematic description of haemophilia to J. C. Otto, who in 1803 reported the pedigree of a large kindred of affected individuals. The term "haemophilia" was coined by Hopff in 1828 (2). In the 1950s, haemophilia was divided into two types. Haemophilia B (HB) was called "Christmas" disease, from the name of the first boy bearing this form, and this case was described in the 1952 Christmas issue of *The British Medical Journal*. A decade later, an International Committee assigned a number to the coagulation factors, and in 1964, *Nature* published the "cascade" model of the clotting pathway (see ref. 2).

Before the advent of modern therapies, the life expectancy of haemophilic patients was poor and the disease frequency was maintained thanks to a balance between the high rate of novel mutations that cause factor IX (FIX) deficiency and the rapid turnover of the mutations in affected families. Each mutation has a mean half-life of 2-3 generations because of the low reproductivity of affected males (3). The most famous example is the kindred of descendents from Queen Victoria: none of her ancestors suffered from the disease, which occurred as a novel, germline mutation (4). One of the four sons of Victoria (Leopold) was haemophilic and two of the five daughters (Beatrice and Alice) were carriers. Through marriages the altered gene was transmitted to the Spanish (by Beatrice) and the Russian (by Alice) royal families. The gene ceased spreading in the descendents of Victoria in 1945 (*i.e.*, it was exhausted within six generations). At that time, the difference between haemophilia A (HA) and HB was unknown.

Haemophilia B: Gene and Protein

HB is an X-linked recessive bleeding disorder due to mutations that cause FIX deficiency. The incidence of HB is about 1:30000 live male births, *i.e.*, 4 to 5 times lower than HA. The disease in females is very rare: it can result from a marriage between an HB patient and

*E-mail of the corresponding author: castaldo@dbbm.unina.it

a carrier, or, more likely, it is due to non-random X inactivation (4).

The *factor 9* (*F9*) gene was mapped in 1984 on Xq27.1; it is centromeric to the *fragile X* locus and the *factor 8* (*F8*) gene, but the distance between the *F8* and *F9* genes (*i.e.*, 0.5 cM) prevents linkage disequilibrium between them. The *F9* gene spans about 34 kilobases and contains eight exons that cover from 25 to 1935 base pairs. There is a high homology of *F9* with *factor 7* (*F7*), *factor 10* (*F10*), and *protein C* genes, and *F9* is also phylogenetically conserved (5). HB results from a myriad of mutations, 40% of which have been identified in a single family (Haemophilia B Mutation Database, <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.ht>

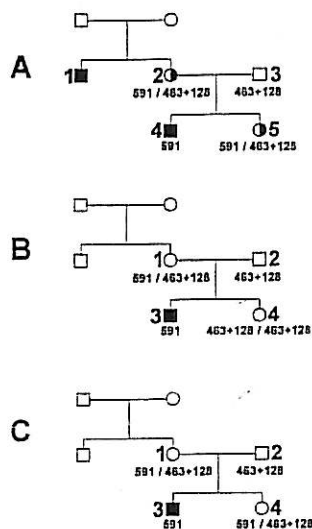


Figure 1 Linkage analysis for haemophilia B (HB). A: a kindred in which several members are affected by HB. The female (case no. 2) is an obligate carrier. The analysis of the intron 4 Taq I polymorphism by restriction analysis showed that case no. 5 was a carrier. In fact, the polymorphism was heterozygous in case no. 2 (an X chromosome carried the uncut allele of 591 bp, and the other had the cut allele: 463+128 bp), and the altered X (transmitted to case no. 4) was that linked to the uncut allele. This X chromosome was also transmitted to case no. 5. B: a family in which carrier status was diagnosed. In this family the disease in the proband (case no. 3) could be due to a novel germline mutation, and thus it is impossible to establish whether the mother (case no. 1) is a carrier (she is defined as a "possible carrier"). In this case, linkage diagnosis excluded the uncut allele (591 bp) in the sister (case no. 4), who was thus defined as a "non-carrier". C: a family in which carrier status could not be diagnosed. The disease in the proband (case no. 3) could be due to a novel germline mutation (present only in the affected patient), and thus it is impossible to establish whether the mother (case no. 1) is a carrier (she is defined as a "possible carrier"). In this case, linkage analysis could not exclude carrier status in the sister (case no. 4) since she inherited an X chromosome from the mother who carried the uncut allele (591 bp) possibly associated to the mutation. The direct search for *F9* mutations would establish whether or not cases no. 1 and no. 4 carried the mutation.

ml). In fact, the rate of chromosome X mutations is significantly higher than that of autosomes, and, except for maternal age, no other environmental factors seem to play a role (6–8). More than 90% of *F9* mutations are point mutations; 5 to 10% are deletions; a few large rearrangements have been also described (see ref. 3 for a review of the *F9* mutations). Because of the rapid turnover of *F9* mutations there is no common mutation pattern in any ethnic group. The protein is synthesised as a pre-pro-protein that includes the signal peptide ("pre" sequence) and a recognition site for the vitamin K-dependent carboxylase ("pro" site).

Factor IX is a vitamin K-dependent zymogen produced by the liver. It is mainly activated by factor VIIa and factor XIa through the proteolytic cleavage of two intramolecular bonds that involve residues Arg 145-Ala 146 and Arg 180-Val 181. In the coagulation pathway, in the presence of phospholipids and calcium ions the active FIX makes a non-covalent complex with activated factor VIII (FVIII), called the "tenase" complex. This complex activates factor X with a proteolytic mechanism (9). FVIII deficiency and FIX deficiency are clinically indistinguishable.

The diagnosis of haemophilia is based on bleeding during infancy, followed by the analysis of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). A normal PT with a prolonged aPTT strongly suggests HA or HB. The subsequent analysis of FVIII and FIX plasma levels will reveal whether the patient is affected by HA or HB, respectively. HB is classified as "severe" (*i.e.*, less than 1% of FIX activity; < 0.01 IU/ml), "moderate" (1 to 5%; 0.01 to 0.05 IU/ml), or "mild" (5 to 25% FIX activity; 0.05 to 0.25 IU/ml).

Carrier females are usually asymptomatic, except for a few cases of bleeding during pregnancy. The levels of FIX in carriers are variable, and the analysis of FIX circulating levels does not identify all HB carriers (10), who can be identified only with molecular analysis. However, unlike autosomal recessive diseases, in which the parents of the affected proband are unequivocally disease carriers, it is much more difficult to identify obligate carriers of haemophilia because of the high incidence of germline mutations (see Figure 1).

Molecular Diagnosis of Haemophilia B: Linkage Diagnosis

Despite the heterogeneity of *F9* mutations, only a few polymorphisms have been found in the *F9* gene, and only eleven are sufficiently heterozygous to be used for linkage diagnosis (Table 1 and Figure 2). Nine of these variants are single-nucleotide polymorphisms (SNP). Only two microsatellite repeats are present in the *F9* gene, in intron 1 and in the 3' flanking region of *F9* (included in exon 8 according to the current nomenclature), respectively (3).

A breakthrough in HB diagnosis came in the mid-1980s with the advent of linkage analysis associated with restriction enzyme digestion of genomic DNA followed by the Southern blotting technique. Intron 4 Taq

Table 1 Factor IX polymorphisms used in haemophilia B linkage diagnosis.

Gene location	Current name	Type of polymorphism	Number of alleles	Type of analysis (following PCR)
5' extragenic	-793 G/A	SNP*	2	Sequence
5' extragenic	5' Bam HI	SNP	2	Restriction analysis
5' extragenic	5' Mse I	SNP	2	Restriction analysis
Intron 1	Dde I	Microsatellite	4	Electrophoresis
Intron 3	Xmn I	SNP	2	Restriction analysis
Intron 3	Bam HI	SNP	2	Restriction analysis
Intron 4	Taq I	SNP	2	Restriction analysis
Intron 4	Msp I	SNP	2	Restriction analysis
Exon 6	Mnl I	SNP	2	Restriction analysis
Exon 8**	Exon 8 (RY)n	Microsatellite	4	Electrophoresis
3' extragenic	Hha I	SNP	2	Restriction analysis

* SNP: single nucleotide polymorphism; ** 3' non-coding region.

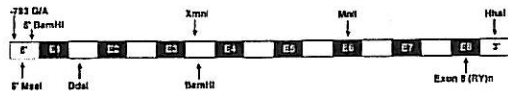


Figure 2 *F9* gene structure. The Figure also reports the gene polymorphisms currently used for linkage diagnosis.

I was one of the first polymorphisms to be tested. It was informative in 40% of HB families (11). With restriction enzyme digestion of genomic DNA, the first prenatal diagnoses of HB were performed in 1984 (12).

The surge in polymerase chain reaction technology a few years later gave renewed impetus to HB linkage analysis. The procedures became faster and easier; novel polymorphisms were identified, and a new factor emerged that was to change our understanding of HB, *i.e.*, there are pronounced ethnic differences in the heterozygosity and Caucasian populations are usually more informative than Oriental populations. In most European studies, the informativity of *F9* polymorphisms used in various combinations was around 70–80%. Reiss *et al.* (13), testing intron 4 Taq I, intron 1 Dde I, and intron 3 Xmn I by PCR, reported an informativity of about 70% in German HB families, and 69% of HB families were informative for prenatal diagnosis with the same polymorphisms in 20 Finnish HB families (14). Three polymorphisms, intron 1 Dde I, exon 6 Mnl I, and 3' Hha I, were informative in 78% of 35 Italian HB families (15).

In Thai and Indian populations, the informativity of HB polymorphisms is very low, *i.e.*, less than 50% of HB families (16, 17). Similarly, *F9* polymorphisms are not frequent in the Chinese population (18, 19). The analysis of several dozens of X chromosomes from New Zealand Maoris and Pacific Island Polynesian populations demonstrated that also the latter ethnic group was poorly polymorphic (< 20% of HB informative families) for *F9* common variants, a finding that incidentally supported the concept that Polynesians originated in east Asia (20).

There is a linkage disequilibrium between several *F9* polymorphisms that differs between ethnic groups. In most cases, the analysis of a greater number of poly-

morphisms does not increase significantly the informativity of linkage analysis. In Caucasian populations, linkage disequilibrium mainly occurs between intron 4 Taq I, intron 4 Msp I, and 5' Bam HI loci; in contrast, there seems to be no linkage between 3' Hha I and other *F9* polymorphisms (3).

The risk of recombination and linkage disequilibrium can be reduced by analysing a panel of polymorphisms located in different gene regions (*e.g.*, one at region 5', one intragenic, and one in exon 8), or by sequentially analysing two panels of polymorphisms (21). For example, we used a two-step procedure for linkage analysis (unpublished results). We first tested a panel of intragenic polymorphisms (*i.e.*, intron 1 Dde I, intron 3 Xmn I, intron 4 Taq I, and exon 6 Mnl I), and then analysed three extragenic markers (*i.e.*, 3' Hha I, 5' -793 G>A, and 5' Mse I) in non-informative families. We tested 20 HB obligate carriers (mothers of HB patients in families with clusters of affected patients). The first panel of markers was informative in 9/20 cases (45%); the subsequent analysis of the three extragenic polymorphisms increased the rate of informativity to 15/20 cases (75%; see Figure 1 for examples of linkage diagnosis).

Although extragenic markers are more informative, the risk of recombination between the polymorphic locus and the putative *F9* mutation increases up to 5%, vs. < 1% with intragenic polymorphisms. In particular, the two microsatellites, *i.e.*, intron 1 Dde I and exon 8 (RY)n, can be involved in processes of homologous recombination (3).

Thus, linkage analysis is a rapid and inexpensive procedure but it is not totally reliable for a variety of reasons: i) a percentage of families carry non-informative loci; ii) recombinant events can occur between the polymorphic locus and *F9* mutations and this is more frequent with extragenic markers; iii) the high incidence of germline mutations (one-third of HB cases) means that linkage analysis is not suitable in families with only a sporadic case of HB; and iv) linkage analysis requires the proband and other key members of the family. Consequently, linkage analysis is giving way to the direct search for *F9* mutations in most molecular laboratories.

Molecular Diagnosis of Haemophilia B: Gene-Scanning and Direct Sequencing

The *F9* gene includes only eight exons, the largest of which spans not more than 1935 bp. Thus, the gene can be analysed with only 10–12 PCR amplifications. Several scanning or direct sequencing procedures have been developed over the last decade. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) revealed *F9* gene mutations in 91% of 44 French HB patients. Comparable results were obtained by direct sequencing (22). In another study, DGGE scanning of the *F9* gene, including the promoter and the exon-flanking regions, in 70 HB families from the Rhone Alpes in France, had a mutation detection rate of 97% vs. 100% obtained with direct sequencing (23). Similarly, the single strand conformation analysis has been used to scan for the *F9* gene in French (24) and Canadian (25) HB patients. The authors of all the aforementioned studies concluded that scanning techniques are sufficiently sensitive, but the procedures are time-consuming and cannot be automated.

The increasing availability of automated direct sequencing and the gradual decrease of costs, associated to the low frequency of HB, led to a large series of studies in many ethnic groups based on direct sequencing (26–30). These studies invariably demonstrated the high detection rate of direct sequencing. In addition, rapid protocols have been set up whereby all fragments can be amplified under the same PCR conditions (31). However, as yet direct sequencing is too expensive to be used for routine analyses (32).

Denaturing reverse-phase high performance liquid chromatography (D-HPLC) seems to be a promising gene-scanning tool because it is very sensitive and the post-PCR analysis can be automated. It has been used to scan genes bearing such heterogeneous mutations as the *cystic fibrosis transmembrane regulator* (*CFTR*) and *factor 8* (*F8*), and several other disease genes (33–37). We recently set up a procedure for the screening of the whole *F9* gene by D-HPLC (38) and analysed a cohort of 18 unrelated patients from southern Italy bearing HB in whom direct sequencing identified an *F9* mutation in all cases. This D-HPLC protocol had a detection rate of 100% in the 18 HB patients examined; furthermore, it is reproducible, rapid (*i.e.*, less than 5 hours because all *F9* fragments are amplified with a single PCR programme), cost-effective (about USD 25 to scan the whole *F9* gene excluding instrument and personnel costs), and easy to perform. The most critical point to establish is the optimal melting temperature. In most cases, a large spectrum of run temperatures must be used with large DNA fragments that have various melting domains with different temperatures (33). Figure 3 shows the effect of run temperature on D-HPLC revelation: the profile of the DNA sample bearing the mutation (R248Q of the proximal fragment of exon 8) differs very little from the wild-type DNA samples analysed at the temperature indicated by the software (*i.e.*, 54 °C, panel A). Differences in profiles were more evident at 55 °C and 56 °C (panels B and C, respectively); the optimal revelation of the mutation (four peaks) was obtained at 57 °C (panel D).

tively); revelation of the mutation was optimal (four peaks) at 57 °C (panel D).

Other factors impinging on the protocol are the pronounced heterogeneity of *F9* mutations and the frequent occurrence of new mutations. In our study of 18 HB patients from southern Italy we identified two novel mutations (38). The identification of a novel mutation in an HB patient does not automatically mean that it is the disease-causing mutation. To establish whether or not a mutation is disease-causing, one must: i) verify that the mutation is present in all affected cases of the family and no other mutations are present within the *F9* gene; ii) evaluate the type of mutation. Nonsense mutations, frameshifts, or deletions are more likely causative of disease than missense mutations; iii) analyse a number of normal alleles from the same ethnic group to ensure that the mutation is not a polymorphic variant; and iv) evaluate the risk that a mutation can be disease-causing from the level of evolutionary conservation and from the degree of homology with FVII, FX, and protein C of the FIX-involved amino acid. Furthermore, the specific function of several FIX amino acids (*i.e.*, residues involved in FIX cleavage or in the interaction of FIX with FVIII, *etc.*) is well known (see review, ref. 3).

The direct search for *F9* mutations has several advantages but not all laboratories are equipped for gene scanning techniques or for direct gene sequencing. A reasonable approach would seem to be that first-level laboratories perform linkage diagnosis and samples from non-informative families be tested in reference laboratories that use gene scanning procedures.

The direct identification of *F9* mutations permits more effective genetic counseling and could cast light on genotype-phenotype correlations, with particular regard to the risk of developing the FIX inhibitor (10). The inhibitor is an anti-FIX antibody that occurs in about 6% of HB patients after treatment with FIX and

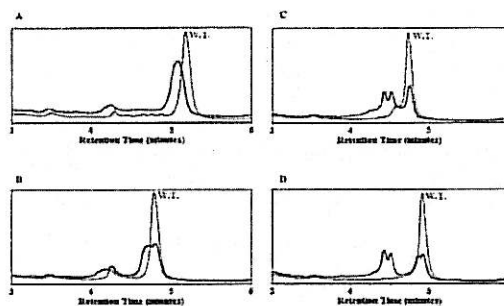


Figure 3 The effect of run temperature on the D-HPLC revelation of the *F9* mutation. The profile of the DNA samples bearing the mutation (R248Q within the proximal fragment of exon 8) is not different from the wild-type (W.T.) DNA samples at the run temperature suggested by the software (*i.e.*, 54 °C, panel A). The differences in the profile become more evident at 55 °C and 56 °C (panels B and C, respectively); the optimal revelation of the mutation (four peaks) was obtained at 57 °C (panel D).

can be strongly suspected in HB patients in whom the prolonged aPTT is not corrected by the addition of normal plasma. The appearance of the inhibitor is an immune response to the exogenous protein (FIX). In fact, the inhibitor is frequently found in HB patients bearing severe mutations and in whom < 1% of FIX is produced. However, the inhibitor is not present in all patients bearing the same *F9* mutation nor in all HB-affected members of the same family. This suggests that the appearance of the FIX inhibitor could be mediated by factors other than *F9* mutations, possible candidates being genes involved in the immune response, at least for HA (39). In this context, modifier genes inherited independently from the disease gene can modulate the clinical expression of other monogenic diseases *e.g.*, cystic fibrosis (40).

Haemophilia B Treatment: From Pioneering Blood Transfusion to Gene Therapy

In 1940, *The Lancet* reported the case of a haemophilic patient successfully treated by fresh blood transfusion after surgery (2). Over the next three decades, porcine and bovine plasma, then crude human plasma concentrates and factor VIII-rich cryoprecipitates, and later, lyophilised coagulation factors, were used to treat haemophilia. Although these products improved patient survival, it became dramatically evident they entailed a risk of severe viral infections.

Toward the end of the century, the spread of blood-borne pathogens was reduced with the advent of FIX concentrates purified by a monoclonal antibody (41) or pretreated with detergents and nanofiltration (42). The results on animal models encouraged the use of recombinant FIX in humans. Brinkhous *et al.* (43) demonstrated the efficacy of recombinant FIX in dog models, and preclinical studies also demonstrated the lower thrombogenic potential of recombinant FIX (44). In the last 5 years, various clinical trials (45, 46) concurred on the comparable haemostatic activity of FIX concentrates and recombinant FIX, underlying the viral safety but the lower recovery of the latter. It was recently found that intratracheal administration of recombinant FIX in dogs was associated with high biologically active FIX levels in blood (47). Time will tell whether this is a therapeutic option in humans.

The problem of HB therapy is not fully resolved by the use of recombinant FIX. Different types of recombinant FIX are available or under study, some of which contain pasteurized human albumin or bovine proteins and could potentially transmit prions and other unknown animal-borne agents. Furthermore, the use of recombinant FIX in HB patients bearing severe mutations can be associated with the production of antibodies against the exogenous protein. Therapeutic approaches that include less immunogenic FIX molecules, or immunomodulant therapies to be associated to recombinant FIX, are under study (48).

HB seems a prime target for gene therapy (49, 50). Indeed, it is a single-gene disease and there is no precise

regulation on the amount of the protein necessary to prevent bleeding (49). Furthermore, the *F9* gene is relatively small and it is not necessary to produce the biologically active protein in a specific tissue/organ (49, 50). Finally, unlike other genetic diseases, it is very easy to monitor the effects of gene therapy in HB by testing the levels of circulating FIX that are well-related to the clinical expression of the disease (49).

A main problem of gene therapy is the efficiency and safety of the vectors. Retroviruses, adenoviruses, and parvoviruses are the most widely used vectors for gene therapy (50). Parvoviruses and adeno-associated viruses used for gene therapy have a wide range of hosts, are scarcely immunogenic, and are not pathogenic. An excellent review on their use in gene therapy can be found in (51). After encouraging results obtained in mice and dog models, the first trials in humans demonstrated the absence of germline transmission of vector sequences and some FIX expression in the first patients treated by intramuscular injection (49, 50).

Studies with animal models have been conducted in an attempt to increase the safety and efficacy of HB gene therapy. For instance, the group of Rodriguez (52) produced FIX *in vitro* in the megakaryocytic compartment of stably transfected human EL cells. Furthermore, the long-term transgene expression of FIX was obtained using the transposon gene-transfer technology in mice (53). These and similar approaches could make the use of viral vectors obsolete.

Lastly, much hope is being placed on foetal gene therapy. In an attempt to prevent the fatal haemorrhage during childbirth or during the first days of life, which can be associated with HB, Schneider *et al.* (54) administered *F9*-carrying adenoviral vectors in the amniotic cavity of late gestation mouse fetuses and found that satisfactory levels of FIX were present at birth. The same group found that administration of *F9*-carrying adenovirus by the intramuscular, intraperitoneal, and intravascular routes in late-gestation mouse fetuses resulted in satisfactory FIX levels at birth (55). These results are very encouraging in terms of prenatal gene therapy in cases of human haemophilia.

Conclusion and Perspectives

Due to its severe clinical manifestations haemophilia has been known for more than 2000 years, but it is only in the last 20 years, with the progress of biochemical and genetic techniques, that the mechanisms underlying the disease have been clarified, and the diagnosis of HB is now based on solid laboratory evidence. Standardised methods for PT, aPTT and FIX analyses are available in all laboratories.

The life-expectancy and the reproductive fitness of haemophilic patients have greatly improved and will improve further in the next few years thanks to the use of less immunogenic recombinant FIX and to gene therapies. These therapies will modify the genetics of haemophilia, allowing each mutation to spread along a larger number of generations and thus increasing the

prevalence of HB carriers and patients in the population, requiring large-scale carrier and prenatal diagnosis.

The direct search for F9 mutations by direct gene sequencing is the reference diagnostic procedure, but scanning methods, including the novel D-HPLC procedure described by our group (38), represent a cheaper and faster alternative. The laboratories that do not have access to direct gene sequencing can use linkage diagnosis, and "farm out" unresolved cases to more specialised laboratories. Of course, the improvement of molecular genetics is an ongoing process; interlaboratory quality control programmes and the standardisation of laboratory procedures are the next challenges in this area.

The best approach to HB patients and families is close collaboration between physicians and laboratory experts. Multidisciplinary genetic counseling for HB, which is the keystone to HB containment (10), will be the main outcome of such collaboration.

Acknowledgements

Grants from MURST (Rome, DM 623/96), CNR (T.P. Biotecnologie), Ministero della Sanità and Regione Campania (L.502/92), Regione Campania (Ricerca Sanitaria Finalizzata) are gratefully acknowledged. We are indebted to Jean Ann Gilder for editing the text.

References

- Rosner F. Hemophilia in the Talmud and Rabbinic writings. *Ann Int Med* 1969; 70:833-7.
- Ingram GIC. The history of haemophilia. *J Clin Pathol* 1976; 29:469-79.
- Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55:127-44.
- Feng J, Drost JB, Scaringe WA, Liu Q, Sommer SS. Mutations in the factor IX gene (F9) during the past 150 years have relative rates similar to ancient mutations. *Hum Mutat* 2002; 19:49-57.
- Bottema CD, Ketterling RP, Li S, Yoon HS, Phillips JA III, Sommer SS. Missense mutations and evolutionary conservation of amino acids: evidence that many of the amino acids in factor IX function as "spacer" elements. *Am J Hum Genet* 1991; 49:820-38.
- Ketterling RP, Vielhaber E, Li X, Drost J, Schaid DJ, Kasper CK, *et al.* Germline origins in the human F9 gene: frequent G:C→A:T mosaicism and increased mutations with advanced maternal age. *Hum Genet* 1999; 105:629-40.
- Giannelli F, Anagnostopoulos T, Green PM. Mutation rates in humans. II. Sporadic mutation-specific rates and rate of detrimental human mutations inferred from hemophilia B. *Am J Hum Genet* 1999; 65:1580-7.
- Sommer SS, Scaringe WA, Hill KA. Human germline mutation in the factor IX gene. *Mut Res* 2001; 487:1-17.
- Chen SW, Pellequer JL, Schved JF, Giansily-Blaizot M. Model of a ternary complex between activated factor VII, tissue factor and factor IX. *Thromb Haemost* 2002; 88: 74-82.
- Tagariello G, Belvini D, Salvato R, Are A, De Biasi E, Goodeve A, *et al.* Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. *Haematologica* 2000; 85:525-9.
- Giannelli F, Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Winship PR, Ferrari N, *et al.* Characterisation and use of an intragenic polymorphic marker for detection of carriers of haemophilia B (factor IX deficiency). *Lancet* 1984; 1:239-41.
- Grunebaum L, Cazenave JP, Camerino G, Kloepfer C, Mandel JL, Tolstoshev P, *et al.* Carrier detection of hemophilia B by using a restriction site polymorphism associated with the coagulation factor IX gene. *J Clin Invest* 1984; 73: 1491-5.
- Reiss J, Neufeldt U, Wieland K, Zoll B. Diagnosis of haemophilia B using the polymerase chain reaction. *Blut* 1990; 60:31-6.
- Lehesjoki AE, Rasi V, de la Chapelle A. Hemophilia B: diagnostic value of RFLP analysis in 19 of the 20 known Finnish families. *Clin Genet* 1990; 38:187-97.
- Caprino D, Aquila M, Mori PG. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia B with more advanced techniques. *Ann Hematol* 1993; 67:289-93.
- Goodeve AC, Chuansumrit A, Sasanakul W, Isarangkura P, Preston FE, Peake IR. A comparison of the allelic frequencies of ten DNA polymorphisms associated with factor VIII and factor IX genes in Thai and Western European populations. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5:29-35.
- Shetty S, Ghosh K, Bhide A, Mohanty D. Carrier detection and prenatal diagnosis in families with haemophilia. *Natl Med J India* 2001; 14:81-3.
- De la Salle C, Wu Q, Baas MJ, Hanauer A, Ruan C, Cazeneuve JP. Common intragenic and extragenic polymorphisms of blood coagulation factors VIII and IX are different in Chinese and Caucasian populations. *Clin Genet* 1990; 38:434-40.
- Chan VV, Yip B, Tong TM, Chan TP, Lau K, Yam I, *et al.* Molecular defects in haemophilia B: detection by direct restriction enzyme analysis. *Br J Haematol* 1991; 79:63-9.
- Van-de-Water NS, Ridgway D, Ockelford PA. Restriction fragment length polymorphisms associated with the factor VIII and factor IX genes in Polynesians. *J Med Genet* 1991; 28:171-6.
- Figueiredo MS, Bowen DJ, Silva Junior WA, Zago MA. Factor IX gene haplotypes in Brazilian blacks and characterization of unusual Dde I alleles. *Br J Haematol* 1994; 87: 789-96.
- Tartary M, Vidaud D, Piao Y, Costa JM, Bahnak BR, Fressinaud E, *et al.* Detection of a molecular defect in 40 of 44 patients with haemophilia B by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Br J Haematol* 1993; 84:662-9.
- Attali O, Vinciguerra C, Trzeciak MC, Durin A, Pernod G, Gay V, *et al.* Factor IX gene analysis in 70 unrelated patients with haemophilia B: description of 13 new mutations. *Thromb Haemost* 1999; 82:1437-42.
- Aguilar-Martinez P, Romey MC, Schved JF, Gris JC, Demaille J, Claustres M. Factor IX gene mutations causing haemophilia B: comparison of SSC screening versus systematic DNA sequencing and diagnostic applications. *Hum Genet* 1994; 94:287-90.
- Poon MC, Anand S, Fraser BM, Hoar DI, Sinclair GD. Hemophilia B carrier determination based on family-specific mutation detection by DNA single-strand conformation analysis. *J Lab Clin Med* 1993; 122:55-63.
- Liu J, Xiang H, Liu L. [Study on factor IX gene mutation in 74 haemophilia B patients]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2001; 22:467-9.
- Ivaskevicius V, Jurgutis R, Rost S, Muller A, Schmitt C, Wulff K, *et al.* Lithuanian haemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *Br J Haematol* 2001; 112:1062-70.
- Jaloma-Cruz AR, Scaringe WA, Drost JB, Roberts S, Li X,