

---

# BIOTECNOLOGIE DIAGNOSTICHE PER LA DIAGNOSI PRENATALE DI MALATTIE GENETICHE

---

**Rossella Tomaiuolo**

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







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



---

**BIOTECNOLOGIE  
DIAGNOSTICHE PER LA  
DIAGNOSI PRENATALE  
DI MALATTIE GENETICHE**

---

**Rossella Tomaiuolo**

***Dottoranda: Rossella Tomaiuolo***

*Relatore: Prof. Fabrizio Pane*

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino





## **INDICE**

### **1 Introduzione**

1.1 La Fibrosi Cistica

1.2 Lo screening molecolare per l'identificazione  
dei portatori sani di CF

1.3 Epidemiologia e detection rate delle mutazioni CF

### **2 Scopo della tesi**

2.1 Caratterizzazione degli alleli portatori di mutazioni non note

2.2 Identificazione di geni modulatori il fenotipo CF

### **3 Materiali e metodi**

3.1 Pazienti

3.2 Strategia d'analisi per la caratterizzazione di mutazioni non  
note

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

### **4 Risultati**

### **5 Conclusioni**

### **6 Bibliografia**

**Appendice I:** Elenco delle pubblicazioni e  
delle comunicazioni orali

**Appendice II:** Pubblicazioni



## Introduzione

La genetica medica è un campo in rapida evoluzione. In alcuni casi, patologie di cui fino a pochi anni fa non si conoscevano i geni-malattia e per cui non erano disponibili né la diagnosi prenatale né alcuna forma di terapia, possono oggi essere diagnosticate e curate.

La disponibilità dei test di diagnostica molecolare permette di poter identificare i portatori sani di alterazioni genetiche e, quando necessario, di programmare la diagnosi prenatale. Lo scopo della diagnostica molecolare effettuata in epoca prenatale è quello di informare in maniera accurata le coppie a rischio di generare un figlio affetto da una determinata malattia genetica ereditaria.

Il numero delle malattie genetiche diagnosticabili in epoca prenatale è costantemente in aumento. Nella Tabella 1 sono riportati esempi di malattie autosomiche recessive, dominanti e legate al sesso più frequenti e sono evidenziate quelle per le cui è disponibile la diagnosi molecolare anche in epoca prenatale (Tabella 1).

### Autosomiche recessive

- |                            |         |
|----------------------------|---------|
| • Fibrosi cistica*         | 1/2500  |
| • Deficit di $\alpha$ 1-AT | 1/3500  |
| • Fenilchetonuria          | 1/10000 |
| • Atrofia muscolo-spinale* | 1/10000 |
| • $\beta$ -talassemia*     | 1/20000 |

### Autosomiche dominanti

- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| • Ipercolesterolemia familiare | 1/500  |
| • Rene policistico             | 1/1000 |
| • Retinite pigmentosa          | 1/4000 |
| • Neurofibromatosi tipo I      | 1/5000 |
| • Distrofia miotonica*         | 1/8000 |

### Legate all'X

- |                                    | maschi | femmine |
|------------------------------------|--------|---------|
| • Emofilia A*                      | 1/500  | rara    |
| • Ittiosi                          | 1/600  | rara    |
| • Sindrome dell'X fragile*         | 1/1500 | 1/2500  |
| • Distrofia muscolare di Duchenne* | 1/3500 | rara    |

\*: disponibile anche l'indagine prenatale

**Tabella 1:** esempi delle più frequenti malattie genetiche ereditarie.

La diagnosi prenatale comprende l'insieme delle procedure che permettono di riconoscere o di escludere la presenza nel feto di anomalie congenite. Secondo le "Linee guida per i test genetici" approvate dal Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie, le principali indicazioni alla diagnosi prenatale rientrano in due categorie:

- presenza di un rischio procreativo prevedibile a priori: età materna avanzata, un genitore portatore di anomalie cromosomiche strutturali, genitori portatori di mutazioni geniche;
- presenza di un rischio fetale evidenziato nel corso della gestazione: malformazioni evidenziate dall'esame ecografico, malattie infettive insorte in gravidanza, positività dei test biochimici per anomalie cromosomiche, familiarità per patologie genetiche.

In alcuni casi, per la diagnosi prenatale sono sufficienti tecniche non invasive di diagnostica per immagini, come l'ecografia fetale, mediante cui è possibile la diagnosi di circa 300 malformazioni fetali. Tuttavia, nella maggior parte dei casi per la diagnostica di laboratorio è necessario prelevare un campione biologico fetale.

I primi dati riportati in letteratura sulla diagnosi prenatale di tipo invasivo risalgono agli anni '60. Da allora l'evolversi della diagnostica per immagini ha permesso di diminuire il rischio di abortività legato al prelievo del materiale fetale. Le tecniche di prelievo di campioni biologici fetali, come l'amniocentesi, la villocentesi e la funicolocentesi, consentono di ottenere materiale biologico fetale, su cui effettuare determinazioni biochimiche, analisi citogenetiche o di diagnostica molecolare. Queste tecniche si differenziano tra loro per l'epoca di effettuazione, per il tipo di tessuto fetale prelevato, per i rischi di complicanze associati (Tabella 2).

	Settimana di gestazione	Tessuto fetale prelevato	Rischio di abortività legato alla tecnica
Villocentesi	9a -11a	Villi coriali	2-3%
Amniocentesi	16a -20a	amniociti	0,5-1%
Cordocentesi	18a	Sangue fetale	3%
Fetoscopia	18a	Pelle o epatociti	3-5%

**Tabella 2:** *tecniche di campionamento del materiale biologico fetale*

Tuttavia, è importante sottolineare che le coppie a rischio riproduttivo prima di affrontare la diagnosi prenatale devono essere sottoposti ad una consulenza genetica multidisciplinare.

La consulenza genetica è un complesso atto medico che ha lo scopo di offrire informazioni mirate alla gestione razionale della patologia.

Mediante l'acquisizione di tutte le informazioni disponibili, in particolare la documentazione clinica relativa alla diagnosi (esami di laboratorio, cartelle cliniche etc...) e le relazioni di parentela, sarà possibile costruire l'albero genealogico della famiglia in esame, per poter definire nel miglior modo possibile l'andamento della malattia e la sua ricorrenza all'interno della famiglia.

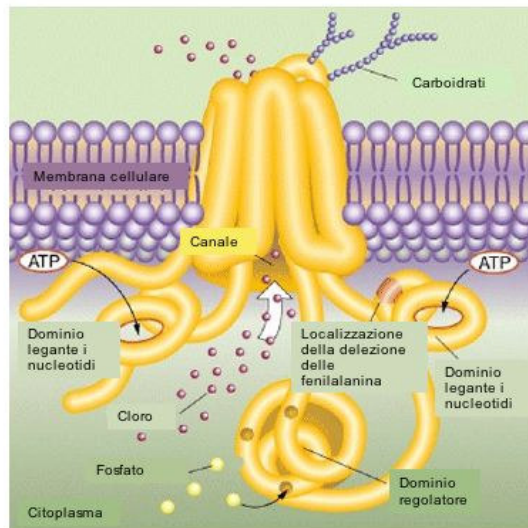
Una volta raccolte le informazioni necessarie si potrà effettuare una prima stima del rischio e della probabilità di sviluppare e di trasmettere la malattia genetica. Successivamente, se necessario, si proporrà al paziente e ai familiari di sottoporsi ad esami mirati al fine di stabilire precisamente l'entità del rischio.

Nel corso della consulenza genetica è importante sottolineare le modalità di trasmissione della malattia e l'importanza dell'analisi molecolare quale unico mezzo per l'identificazione dei portatori sani. I familiari del paziente affetto

devono essere informati sull'importanza di divulgare ai consanguinei l'importanza di effettuare l'analisi molecolare per identificare gli eventuali portatori della malattia.

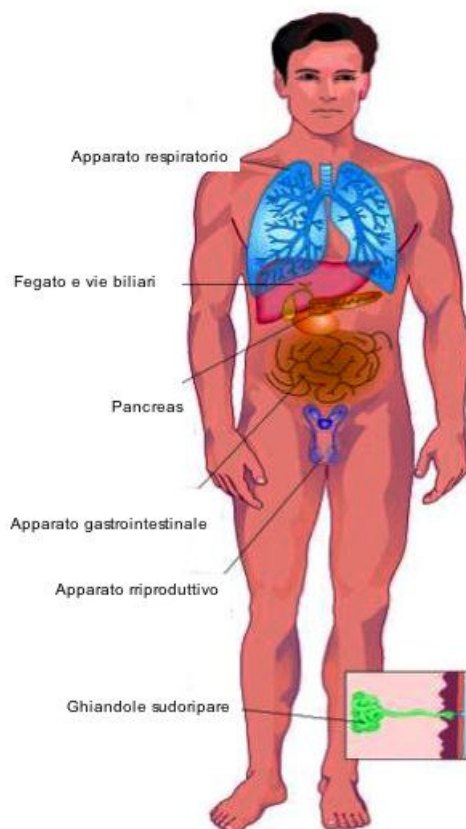
## 1.1 La Fibrosi Cistica

La Fibrosi Cistica (CF) è la malattia genetica, cronica, evolutiva, 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 (Figura 1).



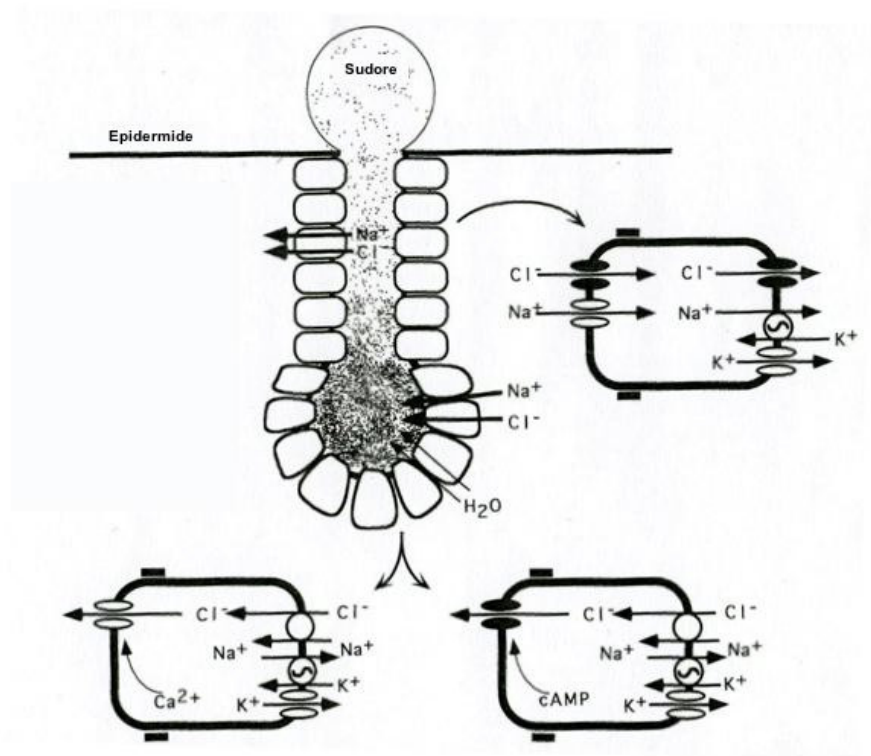
**Figura 1:** rappresentazione schematica della proteina canale CFTR

Nei soggetti normali, i secreti salini vengono idratati e fluidificati poiché 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 (Figura 2). 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.



**Figura 2:** organi ed apparati coinvolti nella Fibrosi Cistica

Inoltre, a livello delle ghiandole sudoripare è compromesso il riassorbimento di ioni cloro e sodio (Figura 3).



**Figura 3:** schema dei meccanismi di escrezione e riassorbimento degli ioni a livello della ghiandola sudoripara.

Infatti, i pazienti CF, eliminano nel sudore una quantità eccessiva di  $\text{NaCl}$ , che può essere dosato, mediante stimolazione delle ghiandole sudoripare con pilocarpina (test del sudore). Il test del sudore ha un altissima specificità e sensibilità (99,9%) per la diagnosi di FC quando eseguito con il metodo di Gibson e Cooke.

Il test consiste nel prelievo di una piccola quantità di sudore dalla parte volare dell'avambraccio, dopo stimolazione iontoforetica con pilocarpina, e nel successivo dosaggio del cloro (Figura 4).

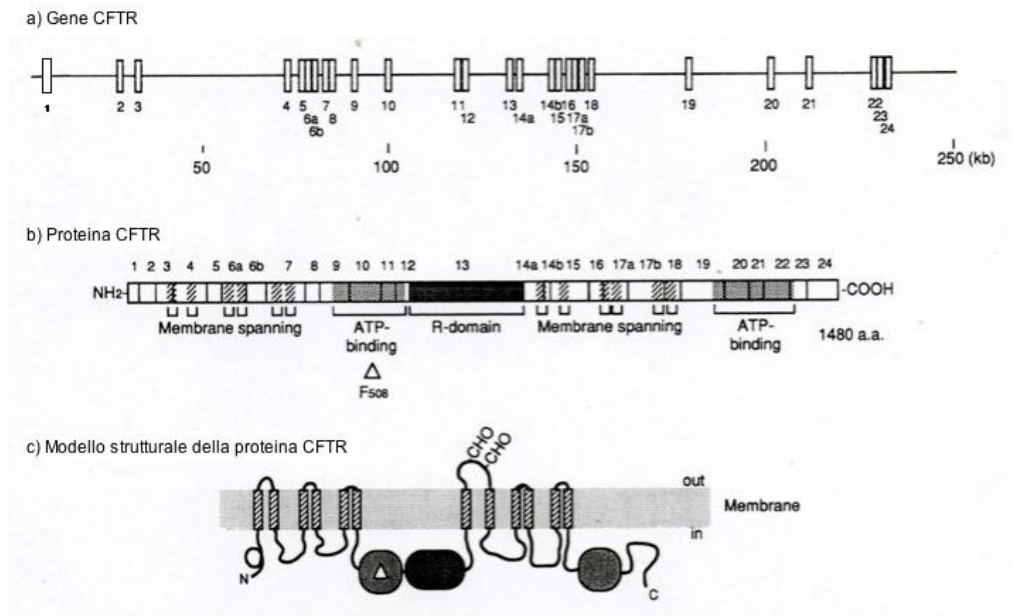


**Figura 4:** *test del sudore effettuato con la metodica di Gibson e Cooke.*

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 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 (Figura 5).



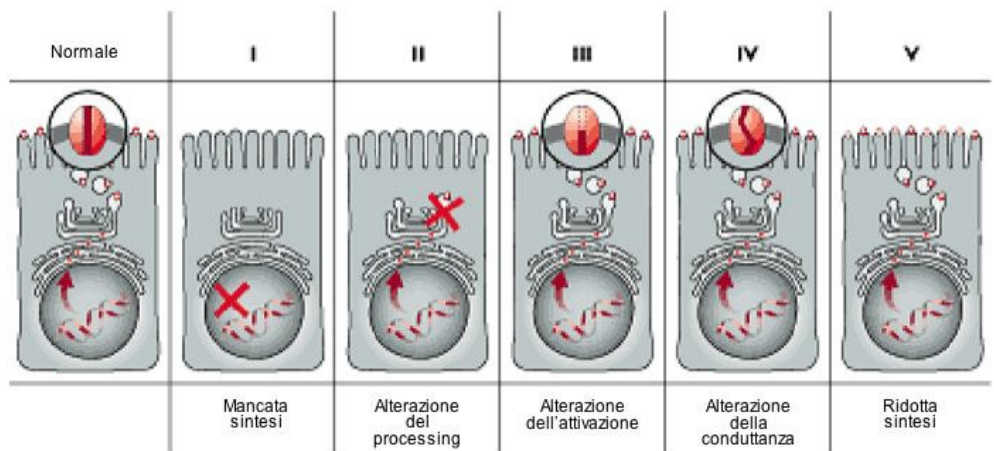
**Figura 5:** dal gene alla proteina CFTR

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. La classe 1 comprende le mutazioni che inducono un difetto della produzione della proteina.



La classe 2 include le mutazioni che alterano il "processing" della proteina. 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. 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. La classe 5 comprende, infine, mutazioni in siti di "splice" che riducono il numero ma non la funzionalità della proteina CFTR (Figura 6).



**Figura 6:** rappresentazione schematica delle 5 classi di mutazioni del gene CFTR

## 1.2 Lo screening molecolare per l'identificazione dei portatori sani di CF

Oltre l'80% dei pazienti affetti da CF nasce in famiglie senza precedenti casi della malattia. Mediante programmi di screening di popolazione, orientati all'identificazione dello stato di portatore sano per CF, è possibile avere informazioni in epoca pre-concezionale sul rischio residuo di generare un figlio affetto dalla malattia.

Tuttavia, alcuni dati dimostrano che seguendo il modello dello screening a cascata sarebbe identificato solo l'8-24% di tutte le coppie di portatori. Pertanto, è stato suggerito lo screening dei portatori CF nella popolazione generale.

Lo screening del portatore può essere programmato in differenti gruppi di persone, ad esempio nelle coppie con una gravidanza in atto (screening in gravidanza o pre-natale), nelle coppie prima della gravidanza (screening pre-concezionale), nei bambini in età scolare (screening scolare) e nei neonati (screening neonatale). Ogni approccio ha i suoi pro e contro.

Lo screening dei portatori non è consigliato se effettuato nei neonati o nei bambini in età scolare, sia per il lungo lasso di tempo che intercorre da quando ci si impadronisce dell'informazione a quando questa diventa utile sia per il fatto che i soggetti testati non possono decidere da sé se conoscere o meno il loro stato di portatore.

Lo screening in gravidanza pur avendo il vantaggio pratico che la maggior parte delle donne in gravidanza è in contatto con un medico, ha lo svantaggio di imporre tempi ristretti per le decisioni che riguardano la diagnosi prenatale. Lo screening pre-concezionale è considerato in tutto il mondo essere la più appropriata strategia per lo screening del portatore.

I programmi di screening genetico dovrebbero essere presi in considerazione quando il beneficio dell'informazione supera gli aspetti potenzialmente nocivi di ordine psicosociale, etico, legale ed economico. Uno dei principali problemi tecnici che si hanno nella messa a punto dello screening del portatore CF è che il test per l'identificazione del portatore non è sensibile al 100%, poiché non tutte le mutazioni del gene CFTR sono conosciute. Inoltre, data l'estrema variabilità del quadro clinico della malattia,

riscontrata anche in soggetti con lo stesso genotipo, pur conoscendo le mutazioni, non sempre è possibile effettuare valutazioni prognostiche accurate.

### 1.3 Epidemiologia e detection rate delle mutazioni CF

A causa dell'elevato numero di mutazioni fin ora identificate nel gene CFTR, nella maggior parte dei casi, piuttosto che uno studio sistematico del gene, per l'analisi molecolare, si esegue lo studio di un pannello di mutazioni determinato in base all'area geografica di provenienza del paziente (indagini di primo livello). Questi pannelli permettono di identificare mutazioni in circa il 70-80% degli alleli dei pazienti CF, ma questa ridotta "detection rate" non costituisce un grosso limite diagnostico, giacché la diagnosi della malattia è basata su criteri clinici e sul test del sudore.

Tuttavia, anche se si effettua l'analisi dell'intera regione codificante del gene CFTR, mediante DGGE, DHPLC o sequenziamento diretto (indagini di secondo livello), in circa il 10% degli alleli CF non vengono identificate mutazioni.

Conoscere l'epidemiologia delle mutazioni responsabili della Fibrosi Cistica (CF) in una determinata popolazione è di fondamentale importanza ai fini della diagnosi molecolare e della consulenza genetica, in quanto rende possibile calcolare il rischio residuo, per una coppia, di generare un figlio affetto e per il singolo individuo di conoscere il rischio residuo di essere portatore sano di una malattia genetica. Inoltre, l'identificazione delle mutazioni del gene CFTR contribuisce a migliorare le conoscenze sulla patogenesi della malattia e in alcuni casi permette la previsione dell'espressione clinica della malattia (correlazione genotipo-fenotipo).

## 2 Scopo della tesi

Al momento presso il Laboratorio di diagnostica molecolare di Fibrosi Cistica del Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche dell'Università "Federico II" di Napoli sono in atto progetti di ricerca multicentrici mirati:

- alla caratterizzazione degli alleli CF non ancora identificati mediante la messa a punto di protocolli per l'identificazione di grossi riarrangiamenti del gene CFTR e delle mutazioni localizzate nelle regioni non codificanti del gene
- allo studio di geni modulatori, cioè geni ereditati indipendentemente dal gene CFTR, che quando alterati sono in grado di modulare il quadro clinico della malattia.

Tutte queste informazioni potranno contribuire in maniera essenziale nella diagnostica molecolare, poichè da un lato sarà possibile aumentare la "detection rate" e dall'altro si potranno effettuare valutazioni prognostiche sempre più accurate.

### 2.1 Caratterizzazione degli alleli portatori di mutazioni non note

Il 10% circa degli alleli CF della nostra popolazione resta ancora non caratterizzato dopo l'analisi molecolare dell'intera regione codificante del gene CFTR.

Negli ultimi 5 anni, diversi studi hanno descritto pazienti CF con macroriarrangiamenti del gene CFTR in omozigosi.

Nei pazienti CF con mutazioni non identificate potrebbe essere presente questo tipo di mutazioni, che non è possibile analizzare mediante le tecniche di scanning utilizzate comunemente in laboratorio (ad es. DGGE, DHPLC), quando sono in eterozigosi.

Tra i grandi riarrangiamenti del gene CFTR sono state descritte le macrodelezioni. Comportano la perdita di uno o più esoni, per cui quasi sempre la proteina che ne deriva è tronca o assente.

Le macrodelezioni sono più frequenti in alcune regioni del DNA dove sono presenti specifiche sequenze (ad esempio

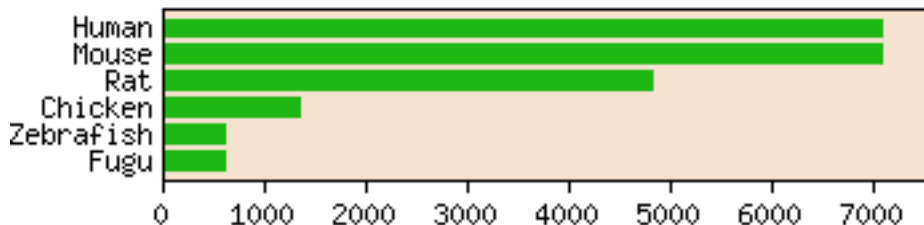
ripetizioni di brevi sequenze uguali) che facilitano la rottura e quindi la ricombinazione genica. I punti di rottura sono definiti "breakpoint". E' oggi disponibile un database, continuamente aggiornato, di tutti i breakpoint del genoma umano.

Le macrodelezioni sono state riscontrate in geni-malattia responsabili di malattie genetiche ereditarie nonché di alcuni tumori. Nel caso della CF e di numerose altre malattie ereditarie le macrodelezioni sono a tutti gli effetti mutazioni germinali, ereditate da un genitore e trasmissibili alla progenie.

Le macrodelezioni sinora identificate nel gene CFTR consistono nella mancanza di uno o più esoni del gene; le più diffuse macrodelezioni sinora identificate coinvolgono da uno a 5 esoni (ad esempio: esone 2 e 3; esoni dal 14b al 17b; esoni dal 17a al 18; esoni 22 e 23; esoni dal 22 al 24). La conseguenza di questo tipo di mutazione è la sintesi di una proteina tronca o incompleta e quindi priva di attività biologica, pertanto questo tipo di mutazioni vanno classificate come mutazioni "severe", e presumibilmente hanno lo stesso effetto fenotipico delle mutazioni di classe 1 e 2, come la F508del.

L'altro spunto di ricerca riguarda l'identificazione di mutazioni introniche e di mutazioni nelle regioni regolatorie del gene CFTR in soggetti affetti da CF, in cui non sono state ancora riscontrate alterazioni del gene CFTR.

L'analisi comparativa dei genomi di varie specie animali (Homo Sapiens, Topo, Ratto, Pollo, Zebrafish, Fugu) ha reso evidente la presenza di sequenze strettamente conservate nel corso dell'evoluzione e disperse in tutto il genoma (Figura 7).



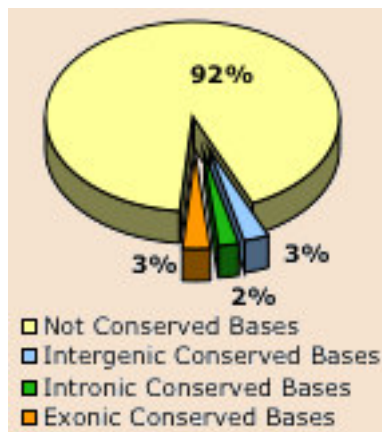
**Figura 7:** CST in Homo Sapiens, Topo, Ratto, Pollo, Zebrafish, Fugu

In particolare, l'analisi della comparazione di sequenze tra il

genoma umano e quello murino, effettuata utilizzando il tool bioinformatico BLASTZ, ha permesso di identificare numerose regioni genomiche conservate denominate Conserved Sequence Tags (CST), la cui lunghezza supera i 100 bp e la cui omologia tra i due genomi è circa del 70%.

Le CST identificate sono state raggruppate in un database di sequenze che contiene informazioni riguardanti i principali geni-malattia umani con l'obiettivo di ricavare informazioni utili alla comprensione dei meccanismi molecolari, in alcuni casi ancora sconosciuti, che sono alla base di queste patologie.

È emerso, quindi, che il 40,5% di tali sequenze conservate ricade nelle regioni intrageniche, il 31,8% nelle regioni esoniche e il 27,7% nelle regioni introniche (Figura 8).



**Figura 8:** *percentuale di CST riscontrate nelle regioni intrageniche, nelle regioni esoniche e nelle regioni introniche*

Sono state formulate varie ipotesi sul ruolo delle CST, ad esempio, potrebbero fungere da elementi di controllo e di regolazione dell'espressione genica, essere elementi strutturali cromosomali o rappresentare RNA non codificante.

## 2.2 Identificazione di geni modulatori il fenotipo CF

Per numerose malattie genetiche, originariamente considerate “monogeniche”, negli ultimi anni è emersa la possibilità che l’espressione clinica possa essere modulata da geni differenti dal “gene-malattia”, ereditati indipendentemente, e definiti “geni epistatici”. 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 i geni modulatori 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 potrebbe essere utile per migliorare la capacità prognostica della diagnosi molecolare, poichè sarà possibile avere informazioni anche sulla gravità o sull’espressione clinica della malattia. Ad esempio, pazienti CF portatori dello stesso genotipo oppure risultati omozigoti per una mutazione nonsense possono avere fenotipo eterogeneo. Inizialmente si era pensato al ruolo dei fattori ambientali, tuttavia il fenotipo discordante osservato in fratelli affetti da CF ne ha escluso l’implicazione e ha suggerito che altri geni potessero avere un ruolo importante nel modulare l’espressione della malattia.

Numerosi studi negli ultimi anni hanno messo in evidenza che nei pazienti CF l’espressione respiratoria della malattia e la colonizzazione batterica sono notevolmente variabili come gravità ed esordio. Garred e collaboratori hanno osservato che il decorso del fenotipo polmonare in pazienti affetti da CF varia considerevolmente, anche tra pazienti che presentavano la stessa mutazione del gene CFTR e che ricevevano le stesse cure. Gli Autori trovarono inoltre, che i pazienti portatori di una copia difettiva del gene dell’MBL, avevano un decremento del 25% rispetto ai pazienti omozigoti per il genotipo normale.

Nel nostro gruppo di ricerca, inizialmente, sono stati studiati pazienti affetti da CF, non imparentati tra loro, e caratterizzati da una diversa severità dell’espressione respiratoria ed epatica 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).

Inoltre, sono stati individuati dei 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 cui deficit è associato a malattie epatiche croniche del fegato, e il gene della lectina legante il mannosio (MBL2) ( ).



### 3 Materiali e metodi

#### 3.1 Pazienti

I pazienti inclusi nello studio sono stati reclutati presso alcune strutture di diagnosi e cura dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" di Napoli; sono stati raccolti i dati clinici, di laboratorio e strumentali utili a classificare tali pazienti. Tutti i pazienti hanno rilasciato il consenso informato a prendere parte, in forma anonima allo studio.

Lo studio è stato eseguito su 4 gruppi di pazienti:

- Per valutare la frequenza delle macrodelezioni del gene CFTR sono stati studiati 44 pazienti CF non consanguinei, originari del sud Italia. Precedentemente i pazienti erano stati sottoposti all'analisi delle mutazioni più frequenti nelle aree geografiche di origine e successivamente all'analisi dell'intera regione codificante del gene CFTR. Il sequenziamento diretto in 7 casi non ha permesso di identificare nessuna mutazione, mentre in 39 ha permesso di identificare una sola mutazione. Questo corrisponde ad un totale di 53 alleli CF con una mutazione non nota.
- Per lo studio delle mutazioni nelle regioni regolatorie e nelle regioni introniche è stata selezionata una popolazione di 37 soggetti affetti da CF, con genotipo non definito anche dopo essere stati sottoposti al sequenziamento di tutte le regioni codificanti del gene CFTR. In seguito è stato selezionato un gruppo di controllo costituito da 33 soggetti con genotipo noto, tra cui 20 soggetti omozigoti per la mutazione F508del (10 con fenotipo grave e 10 con fenotipo lieve); 13 soggetti con entrambe le mutazioni note, di cui una è una macrodelezione; infine 20 soggetti non affetti da CF (fratelli sani di affetti con genotipo definito).
- Per lo studio dei geni modulatori il fenotipo polmonare sono stati selezionati 80 pazienti affetti da

CF di cui 50 presentavano un'espressione polmonare severa e 30 lieve. L'espressione polmonare è stata valutata sulla base degli indici di funzionalità respiratoria (FEV e FVC); è stato inoltre valutato se i pazienti fossero colonizzati da *Pseudomonas aeruginosa* o da altri patogeni a livello respiratorio e, in caso positivo, a che età era insorta la colonizzazione. Oltre che ai pazienti, lo studio è stato esteso ad 89 soggetti di controllo, adulti, non affetti da CF, che all'accurata anamnesi personale non riferivano episodi di infezioni di particolare severità.

- Per lo studio dei geni modulatori il fenotipo epatico sono stati selezionati 109 pazienti affetti da CF di cui 61 presentavano espressione epatica severa e 48 non presentavano alcun disordine epatico. Oltre che ai pazienti, lo studio è stato esteso a 60 soggetti di controllo, adulti, non affetti da CF.

### 3.2 Strategia d'analisi per la caratterizzazione di mutazioni non note

I pazienti affetti dalla forma classica di CF con una o entrambe le mutazioni del gene CFTR non definite dopo l'analisi per le mutazioni più frequenti nelle regioni del sud Italia, che è effettuato con kit commerciali basati su RDB (indagini molecolari di primo livello), sono stati avviati ad uno screening di secondo livello che prevede l'analisi mediante DGGE o il sequenziamento diretto del gene CFTR.

Gli alleli non definiti dopo l'analisi di secondo livello sono stati inseriti nel protocollo che comprende l'analisi per MLPA, per la ricerca di riarrangiamenti, o l'analisi delle regioni introniche o regolatorie per i difetti di splicing del gene.

Per poter eseguire uno screening rapido ed economico mediante PCR del riarrangiamento, sono state disegnate coppie di primer che ne delimitano il breakpoint.

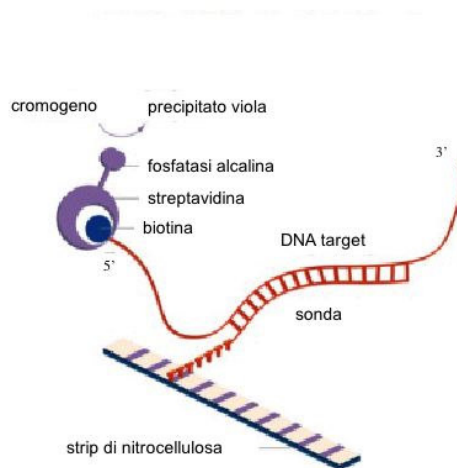
#### *Estrazione del DNA*

Da ogni paziente sono stati prelevati 9 mL di sangue periferico in provette contenenti EDTA. Il DNA è stato estratto dai

leucociti utilizzando il kit commerciale “Nucleon BACC2” della “Amersham Life Science” e successivamente è stato quantizzato mediante lettura spettrofotometrica. Dai campioni “tal quali” sono state preparate delle aliquote di lavoro con una concentrazione di DNA pari a 60 ng/ $\mu$ L.

### *Analisi delle mutazioni del gene CFTR mediante reverse dot-blot*

Nel nostro laboratorio sono routinariamente analizzate 57 mutazioni del gene CFTR mediante reverse dot-blot, con un detection rate di circa l'87% nell'area regionale della Campania, Basilicata e Molise. Le principali fasi della metodica sono schematizzate nella figura 9.



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

*Le regioni del gene CFTR, dove sono localizzate le mutazioni da analizzare, sono amplificate simultaneamente mediante l'impiego di specifiche coppie di oligonucleotidi. Dopo la PCR, l'amplificato viene denaturato e posto su una striscia di nitrocellulosa su cui sono presenti le sonde mutazioni da testare. Tramite una reazione colorimetrica (biotina-streptavidina) si forma un precipitato scuro che permette di visualizzare, per ogni tratto di DNA, una o due bande colorate che consentiranno di stabilire la presenza o meno della mutazione testata e lo stato di omozigosi o eterozigosi*

Per questa analisi sono utilizzati 3 kit commerciali: INNO-LiPA *CFTR* 19 e INNO-LiPA *CFTR* 17+Tn e INNO-LiPA *CFTR* Italian Regional prodotti dalla Innogenetics. Le reazioni di amplificazione sono eseguite su Thermal Cycler 9600 e 9700 della Applied Biosystems. Per le reazioni post PCR è utilizzata l'apparecchiatura automatizzata "AutoLiPA", anch'essa commercializzata dall'Innogenetics. Le mutazioni analizzate sono riportate nella tabella 3.

Inno-LiPA <i>CFTR</i> 19	Inno-LiPA <i>CFTR</i> 17	Inno-LiPA <i>CFTR</i> Italian Regional
F508del	Q552X	1259insA
G542X	621+1G>T	4016insT
N1303K	3849+10kbC>T	4382delA
W1282X	2183AA>G	852del22
G551D	394delTT	D579G
1717-1G>A	2789+5G>A R1162X	G1244E
R553X	3659delC	G1349D
<i>CFTR</i> dele2,3(21kb)	R117H	I502T
I507del	R334W	L1065P
711+1G>T	R347P	R1158X
3272-26A>G 3905insT	G85E	T338I
R560T	1078delT	S549R(A>C)
1898+1G>A S1251N	A455E	991del5
I148T	2143delA 711+5G>A	D1152H
3199del6 3120+1G>A	polyTn	1898+3A>G, R1070Q
		R1066H
		R347H
		621+3A>G
		R334Q
		E217G

**Tabella 3**

*Analisi delle mutazioni del gene CFTR mediante sequenziamento diretto*

Il sequenziamento diretto dei 27 esoni del gene *CFGR* è stato effettuato mediante procedura di Sanger modificata. Nella tabella 4 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.

Esone	Sequenza dei primer	T° A.	bp
1	GAGAAAGCCGCTAGAGCAA (CF1F) TCCTTTACCCCAAACCCAAC (CF1R)	55 °C	394
2	TCCAAATCTGTATGGAGACCAA (CF2F) TCAGTGTGAAAATGAGATGTTCC (CF2R)	55 °C	603
3	TCTGGCTGAGTGTGGTGT(CF3F) TTTGGAGTTGGATTCATCCTTT(CF3R)	55 °C	399
4	AAACTTGTCTCCACTGTTGC(CF4F) GGCCTGTGCAAGGAAGTATT(CF4R)	55 °C	453
5	GTGCCTAGATGCTGGGAAAT(CF5F) AAAACCCGCCTTCCAGTT(CF5R)	55 °C	393
6a	TGCTATGTGCTCCATGTAATGA(CF6AF) TGCATAGAGCAGTCCTGGTT(CF6AR)	55 °C	415
6b	TGCCATCTGTTGAATAAAAG(CF6BF) CCCATGAAAGTGAATTTGTGC(CF6BR)	55 °C	411
7	TTCCATTCCAAGATCCCTGA(CF7F) GCACATTTTTGCAAAGTTCA(CF7R)	55 °C	404
8	GAATCCTAGTGCTTGGCAAAT(CF8F) GATCCTCCTCCAGTTCTACCA(CF8R)	55 °C	404
9	GGCCATGTGCTTTTCAAACCT(CF9F) CTCCAAAAATACCTTCCAGCA(CF9R)	55 °C	389
10	TGAATCCTGAGCGTGATTTG(CF10F) TTCATGTGTTTGAAGCTTCTT(CF10R)	55 °C	435
11	GAAGGAAGATGTGCCTTTCAA(CF11F) CCAAGATACGGGCACAGATT(CF11R)	55 °C	395
12	TCAGTGAATCGATGTGGTGAC(CF12F) ATGAGGCGGTGAGAAAAGGT(CF12R)	55 °C	419
13-1	TCATGCTATCAGAATTCACAAGG(CF13F1) GGGAGTCTTTTGCACAATGG(CF13R1)	56 °C	575
13-2	CTGGAGAGTTTTGGGGAAAAA(CF13F2) AAATACCCCCAAGCGATGTA(CF13R2)	56 °C	449
14a	CAATGGTGGCATGAAACTGT(CF14AF) GTGGTTCTACTTGTGATTTTTTCAG(CF14AR)	55 °C	437
14b	TGGCTTTCTTGTGAGGTTCA(CF14BF) TGCTTGGGAGAAATGAAACA(CF14BR)	55 °C	446
15	GTCGCCAAATAACGATTTCC(CF15F) AGGTTCAACAAAGGGCACAT(CF15R)	55 °C	406
16	TTTGGTTCTGAATGCGTCT(CF16F) GGCCAGGTAAGCAGTTCTGA(CF16R)	55 °C	388
17a	CTCACCAACATGTTTTCTTTGA(CF17AF) CCAAAATGAAGTCACATGGTCA(CF17AR)	55 °C	399
17b	GAATGGCACCAGTGTGAAAA(CF17BF) CAATCTGTGTGCATCGGTTT(CF17BR)	55 °C	682
18	TGTGCCCTAGGAGAAGTGTG(CF18F) TGACAGATACACAGTGACCCTCA(CF18R)	55 °C	335
19	GCCCGACAAATAACCAAGTG(CF19F) GCAAGCAGTGTTCAAATCTCA(CF19R)	55 °C	399
20	CCAATTCCTTATGGCCAGTT(CF20F) TGGCTAAGTCCTTTTGTCTCA(CF20R)	55 °C	408
21	TGATGGTAAGTACATGGGTGTTTC(CF21F) GGAGCCATACCAGTGAGGAG(CF21R)	57 °C	578
22	TCAAATGGTGGCAGGTAGTG(CF22F) TACCATGAAGCAGGCATAA(CF22R)	55 °C	382
23	CCCATGGTTGAAAAGCTGAT(CF23F) TGAGTAAAGCTGGATGGCTGT(CF23R)	55 °C	417
24	GCCTTCTGTCCAGATCTCA(CF24F)	60 °C	362

GAGCAAATGTCCCATGTCAA(CF24R)		
-----------------------------	--	--

Le condizioni di amplificazione per i 27 esoni variano per la temperatura di annealing (T° A.) che è determinata dagli oligonucleotidi utilizzati, che sono specifici per ogni esone da analizzare. Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:

95°C x 5'	
95°C x 30" T° A. x 30" 72°C x 20"	35 cicli
72°C x 5'	

#### *Analisi delle macrodelezioni del gene CFTR mediante PCR quantitativa*

Il DNA di ogni paziente è stato analizzato mediante un kit commerciale basato su PCR quantitativa seguita da elettroforesi capillare (MLPA SALSA kit, MRC-Holland, The Netherlands) (3). La tecnica MLPA (multiplex ligation-dependent probe assay) permette di analizzare i 27 esoni del gene CFTR mediante l'amplificazione sequenza specifica e simultanea effettuata con un set di 44 probe sintetiche.

La tecnica MLPA può essere così schematizzata:

- 1) denaturazione del DNA: 98°C per 5'
- 2) ibridazione con i SALSA-probe: i probe ibridizzano alla sequenza da analizzare mediante un'incubazione di 16 ore a 60°C.
- 3) reazione di ligasi: la ligasi termostabile (Ligasi 65) si attiva a 54°C per 15' e si inattiva una volta raggiunti i 98°C.
- 4) reazione di amplificazione:

95°C x 5'	
95°C x 30" 60°C x 30" 72°C x 60"	35 cicli
72°C x 20'	

- 5) analisi mediante elettroforesi capillare: si utilizza Rox 500 come standard interno.

Con questo metodo, il numero di copie della sequenza target è confrontato con quello di un campione di controllo; la presenza di una macrodelezione comporta una riduzione del 35-50% dell'area del picco relativa al prodotto di amplificazione della sequenza target. Inoltre i dati ottenuti sono confrontati con quelli di un campione eterozigote per una macrodelezione del gene CFTR, di un campione wild-type ed, infine, di un controllo negativo. Nella figura 10 è riportato un esempio della macrodelezione dell'esone 2 in omozigosi in confronto con l'elettroferogramma di un campione wildtype.

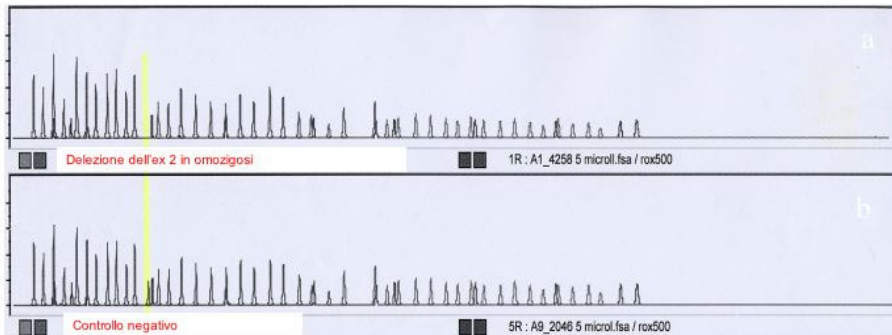


Figura 10: elettroferogramma dei 27 esoni del gene CFTR.

I breakpoint delle macrodelezioni dele14b-17b, dele22-24, dele17a-18 sono stati confermati mediante PCR e sequenziamento automatico. Nella tabella 5 sono riportate le

sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per ciascuna macrodelezione, con le relative temperature di annealing (T° A.).

	<b>Sequenze dei primer</b>	<b>T° A.</b>
dele 14b-17b	IVS14A-921: ATTTGTTTCCTTAGCCAAATGT IVS17B+397R:GGAATCTATTAATTTTGAAGCT	51°C
dele 22-24	IVS-3940F21:GGATTCTGCTGCCACAGATCACTA TAG+3303R: TGAGGGAGGTCTTTGGGGAGATA	67°C
dele 17a-18	4134Fintr16: TGGAGGAGGTGAAAGTGACC CST4148R: CCAGGAAAGGCTACTTGTGC	54°C

Tabella 5

Le condizioni di amplificazione variano per la temperatura di annealing (T° A.) che è determinata dagli oligonucleotidi utilizzati, che sono specifici per ogni breakpoint da analizzare. Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:

94°C x 90"	
94°C x 30" T° A. x 30" 65°C x 60"	35 cicli
72°C x 5'	

*Analisi diretta delle CST del gene CFTR mediante sequenziamento automatico.*

Mediante l'impiego di specifiche coppie di primers sono amplificati e quindi sequenziati con procedura di Sanger e sequenziamento automatico le 56 CST del gene "CFTR". Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:

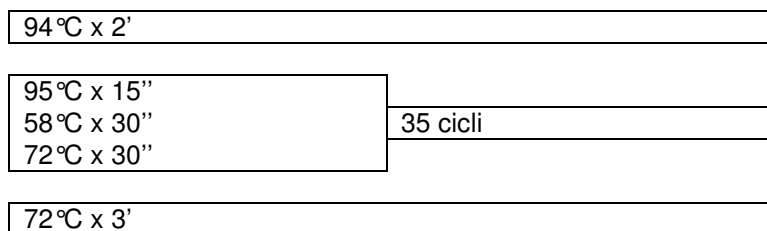
94°C x 90'	
94°C x 30" 54°C x 30" 65°C x 60"	35 cicli
65°C x 5'	



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

#### *Analisi diretta delle mutazioni del gene HFE mediante reverse dot-blot*

Nel nostro laboratorio sono routinariamente analizzate 12 mutazioni del gene HFE: V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P, P160delC mediante reverse dot-blot. Le principali fasi della metodica sono schematizzate nella figura 9. Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:



#### *Analisi mediante PCR e sequenziamento diretto dell'intero gene dell'alfa 1 antitripsina*

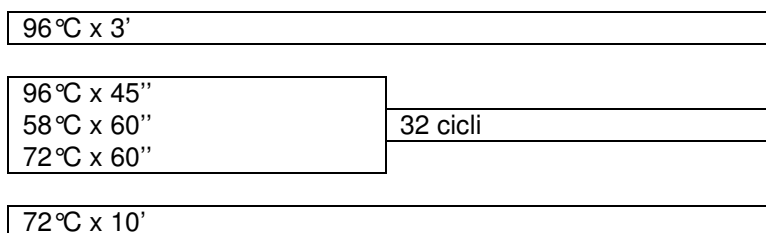
Il sequenziamento diretto degli esoni del gene dell'alfa 1 antitripsina (SPE) è stato effettuato mediante procedura di Sanger modificata. Nella tabella 6 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per ciascun esone, con le relative temperature di annealing (T° A.) e la lunghezza in bp relativa al prodotto amplificato.

	<b>Sequenze dei primer</b>	<b>bp</b>
Spe 2 A	TCATCATGTGCCTTGACTCG GGTATAGGCTGAAGGCGAAC	280
Spe 2 B	CCACCATGATCAGGATCACC TCCACTAGCTTCAGGCCCTC	382
Spe 2 C	CAATGGCCTGTTCTCAGC GCCAAGGAGAGTTCAAGAACTG	357
Spe 3	TCTTCCAAACCTTCACTCACC TTCTTGGTCACCCTCAGGTT	393
Spe 4	GAACAAGAGGAATGCTGTGC GGTGCAACAAGGTCGTC	270

Spe 5 A	GCCTTACAACGTGTCTCTGC GATAGACATGGGTATGGCCTC	162
Spe 5 B	GAAAGGGACTGAAGCTGCTG GTTGAGGAGCGAGAGGCAG	219

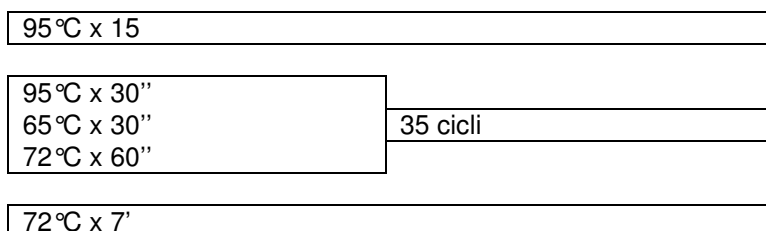
Tabella 6

Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:



*Analisi diretta delle varianti alleliche del gene MBL mediante reverse dot-blot*

Nel nostro laboratorio sono routinariamente analizzate le varianti alleliche: -550G>C, -221G>C, +4C>T, R52C, G54D, G57E mediante reverse dot-blot. Le principali fasi della metodica sono schematizzate nella figura 9. Il programma di amplificazione è costituito dalle seguenti fasi:



## 4. Risultati

In una prima fase dello studio è stata valutata la frequenza delle macrodelezioni del gene CFTR in 44 pazienti CF non consanguinei, originari del sud Italia. Precedentemente i pazienti erano stati sottoposti all'analisi delle mutazioni più frequenti nelle aree geografiche di origine e successivamente all'analisi dell'intera regione codificante del gene CFTR. Il sequenziamento diretto in 7 casi non ha permesso di identificare nessuna mutazione, mentre in 39 ha permesso di identificare una sola mutazione. Questo corrisponde ad un totale di 53 alleli CF con una mutazione non nota. Lo studio ha identificato cinque diverse macrodelezioni del gene CFTR (dele 2-3, dele 14b-17b, dele 17a-17b-18, dele 22-23 e dele 22-23-24).

L'analisi del breakpoint effettuata con sequenziamento diretto del gene ha confermato la presenza delle mutazioni precedentemente identificate, e l'analisi di linkage ha confermato che le mutazioni non hanno origine ricorrente.

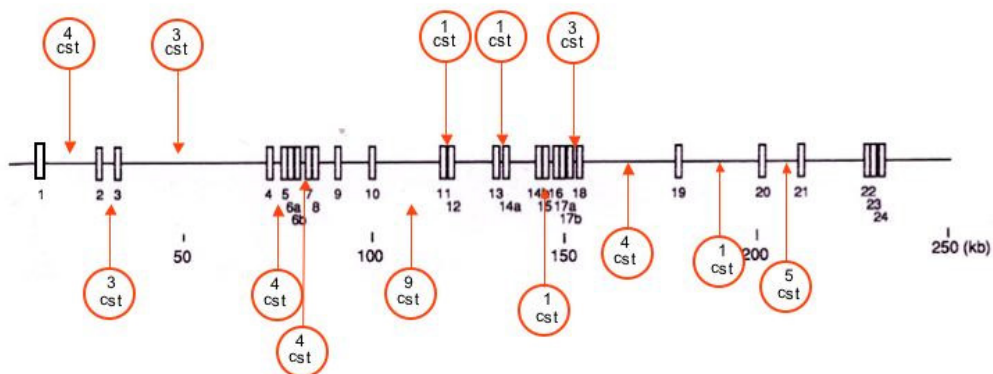
La frequenza totale delle macrodelezioni nei 53 alleli con mutazioni non note è del 32.1%. Considerando che gli alleli non noti rappresentano l'8.5% di tutti gli alleli CF nella nostra popolazione, l'incidenza di macrodelezioni è di circa il 2.7% di tutte le mutazioni CF.

I risultati ottenuti dimostrano che l'approccio molecolare prescelto è estremamente efficace e sarebbe auspicabile la sua estensione a tutti i pazienti CF non caratterizzati, poichè l'analisi delle macrodelezioni del gene CFTR, potrebbe far aumentare significativamente la "detection rate" dell'analisi molecolare per CF.

L'identificazione dei meccanismi di base implicati nello splicing e lo studio delle alterazioni patologiche connesse è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche. La corretta regolazione dello splicing del gene CFTR avviene attraverso una complessa interazione tra elementi in cis (Exonic and Intronic Splicing enhancer/silencer) con trans-acting factors (fattori dello splicing). Mutazioni esoniche o introniche possono inaspettatamente modificare lo splicing e causare la malattia. Ad esempio, l'esclusione dell'esone 9 (exon skipping) è stata associata a forme di CF con espressione

fenotipica variabile. Tale risultato indica che le mutazioni introniche potrebbero causare CF agendo sullo splicing e pertanto dovrebbero essere considerate potenzialmente patogene negli screening genetici.

Per questo motivo sono state studiate le regioni non codificanti del gene CFTR per la caratterizzazione delle CST riscontrate, e che ricadono sia negli esoni sia negli introni. Da circa un anno è in corso l'analisi delle 56 CST introniche del gene CFTR in soggetti affetti da CF, in cui non sono state ancora riscontrate alterazioni del gene CFTR, con lo scopo di evidenziare eventuali alterazioni molecolari e spiegarne il significato (Figura 9).



**Figura 9:** localizzazione delle CST introniche del gene CFTR

I DNA dei 37 soggetti affetti da CF e dei 33 soggetti con genotipo noto sono stati analizzati seguendo un protocollo sperimentale, messo a punto nel nostro laboratorio, che si basa sull'amplificazione e il successivo sequenziamento delle CST del gene CFTR.

Attualmente sono state realizzate tutte le 5040 sequenze previste per il completamento dello studio, per il 70% di esse è già

disponibile il risultato. I risultati preliminari suggeriscono che il 40% delle regioni fin ora completamente studiate non varia in tutti i soggetti studiati. Al contrario, alcune delle CST in esame ha una estrema variabilità sia nei soggetti con genotipo non noto, sia nei soggetti di controllo. In altre invece sono state riscontrate variazioni di sequenza significative per i soggetti con genotipo non noto, ma non per i soggetti di controllo. Dato l'alto numero di dati in possesso fino ad ora, stiamo allestendo un database che contenga, per ogni soggetto in studio, informazioni circa le variazioni di sequenza identificate nelle CST, dati clinici ed elettroferogrammi, al fine di compiere agevolmente indagini statistiche sulla nostra popolazione.

Al termine dell'elaborazione del database ci si propone di allestire studi in vivo per le variazioni di sequenza delle CST di nostro interesse, al fine di confermare l'ipotetica alterazione del trascritto del gene CFTR dovute a variazioni di tali sequenze conservate.

Il secondo spunto di ricerca riguardante i geni modulatori il fenotipo è articolato in due fasi. In primo momento sono stati studiati i geni candidati a modulare il fenotipo respiratorio (MBL) e successivamente sono stati studiati i geni candidati a modulare il fenotipo epatico (HFE, SPE, MBL2).

L'analisi delle tre mutazioni dell'esone 1 del gene MBL è stata effettuata innanzitutto nella popolazione di controllo sana, costituita da 89 soggetti non imparentati. Sono stati identificati 35 alleli mutati (19,7%); in particolare 11 alleli presentavano la mutazione R52C, 23 alleli erano mutati in G54D e un solo allele risultava portatore della mutazione G57E. Nel complesso il 4.5% della popolazione risultava omozigote mutata per uno dei tre loci e il 30% risultava eterozigote per uno di essi. I pazienti affetti da CF sono stati suddivisi in base al fenotipo; dal confronto tra i due gruppi è risultato che i 30 pazienti con fenotipo polmonare lieve 10/60 alleli risultavano mutati (16.6%) laddove nel sottogruppo di pazienti con fenotipo severo abbiamo identificato 22 alleli mutati su 100 (22.0%).

Dai nostri dati emerge che non esistono differenze significative nella distribuzione delle mutazioni del gene MBL tra i pazienti CF e la popolazione di controllo sana; inoltre, che la

differenza non è statisticamente significativa tra i pazienti con fenotipo polmonare severo e lieve. 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. MBL è stato considerato come un possibile gene modulatore il fenotipo polmonare nei pazienti CF.

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.

## 5. Conclusioni

Estendere le conoscenze sulla patologia molecolare da un lato consente di delineare meglio le mutazioni italiane e dall'altro di aumentare in maniera consistente il potere predittivo del test molecolare.

In primo luogo è di fondamentale importanza effettuare l'analisi molecolare nelle coppie a rischio per prevenire la nascita di un soggetto affetto. Nelle malattie autosomiche recessive, come la Fibrosi Cistica, per ogni gravidanza, una coppia di portatori ha una probabilità su quattro di generare un figlio affetto, una probabilità su quattro che non sia sano, 2 probabilità su 4 che sia portatore sano.

Inoltre, conoscere il genotipo dei pazienti è di enorme importanza per la prevenzione della malattia in epoca prenatale nel resto della famiglia, in quanto è possibile identificare con certezza i consanguinei che sono portatori sani ed estendendo l'analisi ai relativi partner di evidenziare coppie a rischio. Nei casi in cui venga identificato un portatore sano (che quindi è carrier di una delle due mutazioni presenti nel paziente) è opportuno estendere l'analisi al partner, utilizzando, anche in questo caso, tecniche di analisi molecolare altamente predittive.

Una volta identificato un paziente CF è opportuno definirne il genotipo CFTR non tanto ai fini diagnostici o prognostici del paziente, ma per estendere l'analisi ai consanguinei. Infatti, attraverso un'adeguata consulenza genetica multidisciplinare, è utile proporre ai consanguinei del paziente di sottoporsi all'analisi molecolare per identificare i portatori sani della malattia, che possono essere identificati nel caso della CF esclusivamente attraverso l'analisi molecolare, ricercando le mutazioni già identificate nel paziente.

Per questo motivo, nel caso in cui esista una chiara sintomatologia clinica, ma non viene evidenziata la presenza di nessuna mutazione dopo l'analisi di primo livello si procede al sequenziamento diretto dei 27 esoni del gene CFTR, con il quale è possibile raggiungere un detection rate di circa il 90%. Tuttavia, pur compiendo uno studio su tutte le regioni codificanti del gene CFTR, nel 10% circa degli alleli CF non vengono identificate mutazioni.

Le condizioni in cui può essere utile effettuare la ricerca delle macrodelezioni con finalità diagnostica dovrebbero essere quelle in cui è necessaria una elevata detection rate, ad esempio nei partner di soggetti portatori di una mutazione CFTR: in tal caso è necessario escludere la presenza di mutazioni con la massima certezza possibile. Viceversa, l'analisi potrà essere meno utile nella fase diagnostica di malattia che, come già ricordato è basata sulla clinica e sul test del sudore, e, più di recente sullo screening neonatale.

La ricerca delle macrodelezioni del gene CFTR andrà effettuata come indagine di terzo livello, dopo aver testato le mutazioni più frequenti nell'ambito etnico-geografico e dopo aver effettuato una procedura di scanning genomico per evidenziare eventuali altre mutazioni nel gene.

Gli studi mirati alla caratterizzazione delle regioni introniche del gene CFTR per ora hanno prodotto risultati preliminari, tuttavia sarà interessante comprenderne il ruolo biologico anche mediante l'analisi computazionale per rivelare la presenza di eventuali motivi regolatori per l'espressione genica o per la struttura della cromatina che potrebbero ricadere in queste regioni.

Lo studio dei geni modulatori il gene CFTR, è stato effettuato mediante l'approccio del gene candidato, ovvero mediante studi di associazione di geni coinvolti nei processi fisiologici della proteina CFTR.

Questi studi di associazione dimostrano 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 il 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) Gregory RJ, et al. (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 27; 347: 382-6
- 2) Rendine S, et al. (1997) Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet* 61: 411-424
- 3) Wilschanski M, et al. (1995) Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *Journal of Pediatrics* 127: 705-710
- 4) Groman JD et al. (2004) *Am J Hum Genet* 74: 176-179,
- 5) Castaldo G, et al (2000) Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: a case of twin pregnant diagnosis and a review of 5 years experience. *Clin Chim Acta* 298: 121-33.
- 6) Gregory RJ, et al (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 27; 347(6291): 382-6.

- 7) Rendine S, et al (1997) Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet* 61: 411-424.
- 8) Audrezet MP, et al (2004) Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat.* Apr;23(4):343-57.
- 9) Schouten JP, et al (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12):e57.
- 10) Chevalier-Porst F, et al (2005) Identification and characterization of three large deletions and a deletion/polymorphism in the CFTR gene. *Hum Mutat.* May;25(5):504
- 11) Bombieri C. et al. (2005) Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients. *European Journal of Human Genetics*
- 12) Tomaiuolo R., et al. (2003) Molecular diagnosis of Cystic Fibrosis: comparison of four analytical procedures. *Clin Chem Lab Med*; 41:26-32

- 13) Abeysinghe SS., et al. (2004) Gross rearrangements breakpoint database. *Human Mutation* 23:219-221
- 14) Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-1073; Erratum: *Science* 1989;245:143
- 15) Zielenski J., Rozmahel R, Bozon D. et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991;10:214-228
- 16) Castaldo G., Fuccio A., Salvatore D., Raia V., Santostasi T., Leonardi S., Lizzi N., La Rosa M., Rigillo N., Salvatore F. Liver expression in Cystic Fibrosis could be modulated by genetic factors different from the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator genotype. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 94, 294-7.
- 17) Salvatore F., Scudiero O., Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in Cystic Fibrosis: the role of modifier genes. *Am. J. Med. Genet.* 2002;111:88-95 (Review)
- 18) Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, Hehir K, Ostedgaard L, Klinger KW, Welsh MJ, Smith AE. 1990:

Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 27; 347(6291): 382-6.

- 19) Rendine S, Calafell F, Cappello N, Gagliardini R, Caramia G, Rigillo N, Silveti M, Zanda M, Miano A, Battistini F, Marianelli L, Taccetti G, Diana MC, Romano L, Romano C, Giunta A, Padoan R, Pianaroli A, Raia V, De Ritis G, Battistini A, Grzincich G, Japichino L, Pardo F, Piazza A. 1997: Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet* 61: 411-424.
- 20) Castaldo G, Martinelli P, Massa C, Fuccio A, Grosso M, Rippa E, Paladini D, Salvatore F. 2000: Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: a case of twin pregnancy diagnosis and a review of 5 years' experience. *Clin Chim Acta.* 298(1-2):121-33.
- 21) Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE (2003): Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J Biol Chem.* 278(29):26580-8.

- 22) Audrezet MP, Chen JM, Raguenes O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Marechal C, Quere I, Cooper DN, Ferec C. (2004): Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 23(4):343-57
- 23) Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. (2002): Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 22;111(1):88-95.
- 24) Pennacchio LA, Rubin EM. (2001): Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet* 2(2):100-9.
- 25) Boccia A, Petrillo M, di Bernardo D, Guffanti A, Mignone F, Confalonieri S, Luzzi L, Pesole G, Paoletta G, Ballabio A, Banfi S. (2005): DG-CST (Disease Gene Conserved Sequence Tags), a database of human-mouse conserved elements associated to disease genes. *Nucleic Acids Res* 1;33(Database issue):D505-10.

## **Elenco delle pubblicazioni e delle comunicazioni 2002-2005**

### **PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI**

1. Tomaiuolo R., Spina MC., Castaldo G. Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis: Comparison of Four Analytical Procedures. Clin Chem Lab Med 2003 Jan, 41 (1): 26-32. Berlin, Germany
  
2. Castaldo G., Tomaiuolo R., Sanduzzi A., Ponticiello A., Marchetiello I., Salvatore F. Carcinoembryonic antigen mRNA analysis detects micrometastatic cells in blood from lung cancer patients. Eur Respir J. 2003 Sep; 22(3): 418-21. Geneva, Switzerland
  
3. Salvatore D., Tomaiuolo R., Abate R., Vanacore B., Manieri S., Mirauda MP., Scavone A., Schiavo MV., Castaldo G., Salvatore F. Cystic fibrosis presenting as metabolic alkalosis with hypochloremia in a boy with the rare D579G mutation. J Cyst Fibrosis 2004; 3: 135-6. The Hague, The Netherlands
  
4. Castaldo G., Polizzi A., Tomaiuolo R., Cazeneuve C., Girodon E., Santostasi T., Salvatore D., Raia V., Rigillo N., Goossens M., Salvatore F. Comprehensive cystic fibrosis mutation epidemiology and haplotype characterization in southern Italy population. Ann Hum Genet 2004. London, UK

5. Salvatore D., Tomaiuolo R., Vanacore B., Elce A., Castaldo G., Salvatore F. Isolated elevated sweat chloride concentrations in the presence of the rare mutation S1455X: an extremely mild form of CFTR dysfunction? Am J Med Genet 2004
6. Polizzi A., Francavilla R., Castaldo G., Santostasi T., Tomaiuolo R., Manca A., De Robertis F., Mappa L., Oliviero FP., Salvatore F. and Rigillo N. Phenotypic Expression of Genotype-Phenotype Correlation in Cystic Fibrosis Patient Carrying the 852del22 Mutation. Am J Med Genet 2005; 132A: 434-440.

#### **COMUNICAZIONI A CONGRESSI O CORSI**

1. Castaldo G., Tomaiuolo R., Cardillo G., Cantisani M., Martire G. La Biologia molecolare e le indagini genetiche: dal campione al referto. Corso teorico "La Biologia Molecolare e le Indagini Genetiche", 2002, Firenze.
2. Tomaiuolo R., Vanacore B., Calcagno G., Elce A., Castaldo G., Salvatore F. A Novel Automated Procedure for the Analysis of CFTR Microsatellites. 12<sup>th</sup> International Conference on Laboratory Medicine and 9<sup>th</sup> European Conference of Clinical Molecular Biology, 2002, Capri.



3. Tomaiuolo R., Ponticiello A., Perna F., Castaldo G., Sanduzzi A. La genetica dell'ipertensione polmonare primitiva. Convegno Ipertensione Polmonare Primitiva, 2002, Napoli
4. Salvatore F., Tomaiuolo R., Castaldo G. Diagnostica Molecolare in Soggetti Sottoposti a Tecniche di Procreazione Assistita. Terzo Corso Teorico-Pratico di Micromanipolazione, 2002, Napoli.
5. Castaldo G., Tomaiuolo R. L'evoluzione delle tecniche di diagnostica prenatale. La Diagnosi Prenatale dal Laboratorio alla Clinica. Hot topics in Medicina Perinatale, 2004, Napoli.
6. Ruolo patogenetico del gene MDR3 in bambini con colestasi a  $\gamma$ 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
7. Screening di macrodelezioni del gene CFTR in pazienti CF originari del sud Italia. R. Tomaiuolo, B. Vanacore, V. Raia, D. Salvatore, G. Castaldo, F. Salvatore. 37° Congresso

Nazionale SIBIOC (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica). 11-14 ottobre 2005, Roma

8. Varianti geniche di SLC26A3 in pazienti con Fibrosi Cistica con mutazioni non note nel gene malattia. Cardillo G, Tomaiuolo R, Naso B, Raia V, Berni Canani R. Castaldo G, Salvatore F. 37° Congresso Nazionale SIBIOC (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica). 11-14 ottobre 2005, Roma.
  
9. Screening di varianti geniche di geni modulatorin in pazienti con Fibrosi Cistica con fenotipo epatico. R. Tomaiuolo, F. Bellitti, V. Raia, D. Salvatore, G. Castaldo, F. Salvatore. 37° Congresso Nazionale SIBIOC (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica). 11-14 ottobre 2005, Roma.

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI O CORSI SU INVITO

1. Tomaiuolo R., Ponticiello A., Perna F., Castaldo G., Sanduzzi A. La genetica dell'ipertensione polmonare primitiva. Convegno Ipertensione Polmonare Primitiva, 2002, Napoli
2. Tomaiuolo R., Castaldo G. la diagnosi molecolare di micrometastasi. VII Corso di Biologia Cellulare in Pneumologia (BIOCEP). 2004, Napoli
3. III Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani per la Fibrosi Cistica. Verona, 18-19 novembre 2005

