



**BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI PER LO
STUDIO DI UN CARRIER DI MEMBRANA
COINVOLTO CON LO SVILUPPO DI
MALATTIE GENETICHE: IL GENE
SLC26A3**

Giuseppe Cardillo

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



**BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI PER LO
STUDIO DI UN CARRIER DI MEMBRANA
COINVOLTO CON LO SVILUPPO DI
MALATTIE GENETICHE: IL GENE
SLC26A3**

Giuseppe Cardillo

Dottorando: Giuseppe Cardillo

Relatore: Prof.ssa Giuliana Fortunato

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino

A mia moglie Manuela

INDICE

Riassunto breve	1
Short summary	2
1. Introduzione	3
1.1 La Cloridorrea Congenita	3
1.1.1 Generalità	3
1.1.2 Caratteristiche cliniche	3
1.1.3 Patogenesi della Cloridorrea	3
1.1.4 Diagnosi e trattamento	4
1.1.5 Nuova terapia sperimentale	4
1.1.6 Gene-malattia e proteina	5
1.1.7 Ruolo dello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ nell'Ileo e nel Colon	9
1.1.8 Epidemiologia della CLD	12
1.2 Scopo del lavoro	14
2. Materiali e Metodi	16
2.1 Pazienti	16
2.2 Strategia d'analisi	17
2.2.1 Estrazione del DNA e PCR	18
2.2.2 Analisi di sequenza	18
2.2.3 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (D-HPLC)	19
2.2.4 Long-PCR analysis e Walking Primer Analysis	19
2.2.5 Analisi Filogenetica	20
2.2.6 Predizione delle variazioni indotte	20
2.2.7 Terapia sperimentale con butirrato	20
3. Risultati	22
3.1 Analisi molecolare del gene SLC26A3	22
3.2 Valutazione della terapia sperimentale con butirrato	29
4. Discussione	30
5. Bibliografia	34
6. Appendice	42

Riassunto breve

La Cloridorrea congenita (CLD) è una rara malattia genetica, a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da diarrea profusa, acida, molto ricca di ioni cloruro, che si manifesta anche durante la vita intrauterina. Il "golden standard" per la diagnosi è la presenza di ploidramnios e distensione delle anse addominali nella vita intrauterina e, nel periodo postnatale, la presenza di diarrea non trattabile, con una concentrazione fecale di cloruro superiore a 90 mMol che supera la somma delle concentrazioni degli ioni sodio e potassio (gap cationico), assenza di bicarbonato e alta acidità della massa fecale. La terapia si basa sulla somministrazione orale di elettroliti. La malattia è ben nota in tre aree geografiche: Finlandia, Polonia e penisola Arabica, dove effetti fondatore, isolamento geografico e alto tasso di endogamia hanno favorito la propagazione di alleli malattia. In tutte le altre aree geografiche si hanno solo casi sporadici. La malattia è causata da mutazioni nel gene SLC26A3 che codifica per uno scambiatore anionico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, espresso dalle cellule caliciformi dell'intestino. A tutt'oggi, sono note circa una trentina di mutazioni a carico del gene SLC26A3 e causative di malattia. Da studi recenti, si è scoperto che la proteina SLC26A3 è un interattore della proteina CFTR, responsabile del cotrasporto di cloruro e bicarbonato in vari organi e apparati, molto nota perché il suo malfunzionamento determina una gravissima patologia nota come Fibrosi Cistica (CF). In questo studio sono stati analizzati 7 pazienti affetti da CLD e i loro genitori: di questi 2 sono di origine italiana, uno è originario dello Zimbabwe, 3 sono di origine marocchina e uno è di origine statunitense. Per la prima volta sono stati studiati soggetti di origine italiana e uno di origine sud-africana. Inoltre, su uno dei pazienti di origine italiana è stata provata una nuova terapia sperimentale a base di butirrato. L'analisi molecolare ha permesso la completa caratterizzazione delle famiglie ed ha mostrato la presenza di ben 10 nuove varianti mai descritte in precedenza, di cui 7 esoniche, 2 introniche e una macrodelezione di un intero esone. L'analisi filogenetica mostra che sono stati colpiti tutti amminoacidi altamente conservati. La terapia sperimentale somministrata ad uno dei pazienti di origine italiana si è rivelata efficace, priva di effetti collaterali e a basso costo, aprendo così una nuova strada al trattamento farmacologico di questi pazienti. Obiettivi futuri sono: la caratterizzazione molecolare di un numero più ampio di pazienti per una maggiore comprensione delle correlazioni genotipo-fenotipo; la somministrazione della nuova terapia ad un numero più ampio di pazienti per verificarne l'effettiva efficacia; l'avviamento di uno studio di caratterizzazione molecolare di pazienti CF per indagare l'eventuale compartecipazione del gene SLC26A3 nella patogenesi di questa malattia.

Short summary

Congenital chloride diarrhea or chloride losing diarrhea (CLD) is an autosomal recessive disease characterized by watery, acidic diarrhea, high concentration of chloride in the stools, that appears since the intrauterine life. The “gold standard” for diagnosis is polyhydramnios and dilated intestinal loops during intrauterine period and, after the birth, the presence of very acid, untreatable diarrhea, increased chloride levels (>90 mMol) that exceeds the sum of fecal sodium and potassium (cationic gap), and absence of bicarbonate in the stools. The therapy is based on oral electrolytes supplementation. The disease is known very well in three geographic areas: in Finland, Poland and Saudi Arabia, where founder effects, geographic separation and a high rate of consanguineous marriage allowed the propagation of disease-alleles. In other geographic areas CLD is a sporadic disease. The disease is caused by mutations in SLC26A3 gene that encodes for an anionic $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, expressed by intestinal goblet cells. At the date, about thirty disease-causing mutations are known. Recent studies showed that SLC26A3 protein is an interactor of CFTR protein, responsible of chloride and bicarbonate cotransport in many organs and apparatus, and very known because its loss of function provoke a severe disease known as Cystic Fibrosis (CF). In this study we analyzed 7 CLD patients and their parents: two are from Italy, one is from Zimbabwe, three are from Morocco and one is from USA. This is the first study performed on CLD patients from Italy and southern Africa. Furthermore, one of the Italian patients was treated with a novel therapy based on butyrate. Molecular analysis allowed the complete characterization of families and showed 10 novel gene variants, not previously described, of which 7 in the exons, 2 in the introns and one whole exon macrodeletions. Phylogenetic analysis showed that involved amino acids are highly conserved. The new experimental therapy tested on one of the Italian CLD patients was effective, without side effects and low cost. This opens a new way for the pharmacological treatment of CLD patients. Future goals are: molecular characterization of a wider cohort of patients to understand genotype-phenotype correlations; testing of the butyrate therapy on a more large number of patients to verify the true efficacy; the starting of a molecular characterization study of CF patients to test the involvement of SLC26A3 in the pathogenesis of this disease.

1. Introduzione

1.1 La Cloridorrea Congenita

1.1.1 Generalità

La Cloridorrea Congenita (Chloride Losing Diarrhea, CLD, OMIM #214700) è stata descritta per la prima volta nel 1945 da due autori indipendenti: Gamble e Darrow (Gamble et al., 1945; Darrow, 1945). Circa 25 anni più tardi, nel 1971, uno studio genetico effettuato su 14 famiglie finlandesi e su 12 famiglie di altra origine etnica ha dimostrato che la CLD era ereditata come carattere autosomico recessivo (Norio et al., 1971).

1.1.2 Caratteristiche cliniche

La principale caratteristica clinica della CLD è una diarrea cronica, con un'alta concentrazione di Cl^- , che richiede una terapia a vita (Holmberg et al., 1977a). La diarrea generalmente inizia durante il periodo prenatale e sfocia in polidramnios spesso associato a nascita prematura. Il peso e l'altezza alla nascita sono normali per l'età gestazionale (Holmberg et al., 1977a). I nati presentano distensione addominale e mancanza di meconio, che può indurre un sospetto di ostruzione intestinale e portare ad un'inutile laparotomia (Langer et al., 1991). La diarrea voluminosa, che può essere confusa con le urine, causa, nei primissimi giorni di vita, un'eccessiva perdita di peso con una severa disidratazione e un mancato accrescimento dei bambini. Rapidamente s'instaurano anche ipocloridemia e iponatremia, seguite poco dopo da ipocaliemia, iperbilirubinemia e alcalosi metabolica (Norio et al., 1971; Holmberg et al., 1977a; Holmberg, 1986). Gli episodi di iponatremia possono provocare ritardo mentale e psicomotorio (Holmberg, 1986). I livelli sierici di Na^+ , comunque, si normalizzano dopo il periodo neonatale. In aggiunta all'alta concentrazione di Cl^- , nelle feci si rileva anche una bassa concentrazione di HCO_3^- e un basso pH, mentre nelle urine, a causa della massiccia perdita fecale, i livelli di Cl^- sono bassissimi o addirittura non rilevabili (Holmberg et al., 1977a). La maggior parte dei pazienti non trattati muore durante il primo mese di vita. Alcuni riescono a sopravvivere senza trattamento ma soffrono di disidratazione ipocloridemica cronica che causa ritardo di crescita e sviluppo. Inoltre, la cronica ipovolemia, insieme con il danno acuto della disidratazione e l'anuria in pazienti con inadeguata terapia, provoca un blocco renale precoce, istologicamente caratterizzata da iperplasia iuxtaglomerulare, ialinizzazione dei glomeruli, depositi di Ca^{2+} e cambi vascolari simili a quelli prodotti dall'ipertensione (Holmberg et al., 1977b). L'iperplasia iuxtaglomerulare provoca un aumento di escrezione di renina e aldosterone, inducendo ipocaliemia e ipercaluria, simulando la sindrome di Bartter. Inoltre, la cronica contrazione dello spazio intravascolare può provocare gotta (Nuki et al., 1991).

1.1.3 Patogenesi della Cloridorrea

Nella CLD, la causa della malattia è un difettoso o assente meccanismo di scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Holmberg et al., 1975) nell'ileo e nel colon. Il difetto nell'assorbimento del Cl^- causa ipocloridemia e un gran quantitativo di Cl^- è trattenuto nel lume intestinale,

che provoca una diarrea osmotica. Contemporaneamente, la secrezione di HCO_3^- è assente, facendo aumentare l'alcalinità intracellulare e l'acidità del contenuto intestinale. Sebbene lo scambiatore Na^+/H^+ di per sé sia funzionante, la mancanza dello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ inibisce l'assorbimento di Na^+ (Holmberg, 1978). L'iponatremia e l'ipovolemia cronica inducono un secondario iperaldosteronismo e iperreninemia che aumentano la perdita e la deplezione di K^+ , che aumenta l'alcalosi metabolica (Holmberg, 1978).

1.1.4 Diagnosi e trattamento

Una anamnesi positiva per polidramnios e nascita prematura, unite ad una diarrea acquosa e voluminosa, dovrebbero orientare verso una diagnosi di CLD. Se i disturbi elettrolitici sono corretti dalla terapia, il rilevamento di un'alta concentrazione fecale di Cl^- (al di sopra di 90 mMol) conferma la diagnosi (Holmberg, 1986). Dopo il periodo neonatale, la concentrazione fecale di Cl^- supera la somma delle concentrazioni fecali di Na^+ e K^+ , generando un gap cationico, sebbene la concentrazione di Cl^- possa essere bassa a cause della severa disidratazione e della disturbata omeostasi elettrolitica (Holmberg, 1978). È possibile una diagnosi precoce, in periodo prenatale, mediante ecografia, sulla base della distensione delle anse intestinali (Kirkinen and Jouppila, 1984).

Lo scopo della terapia è il raggiungimento di un equilibrio dei fluidi e degli elettroliti, che si ottiene mediante il continuo rimpiazzamento delle perdite diarroiche di acqua, Cl^- , Na^+ e K^+ . Nel caso dei neonati, la supplementazione si ottiene mediante somministrazione endovenosa, mentre nei bambini e negli adulti si utilizza una somministrazione orale (Holmberg, 1986). La somministrazione orale si basa sulla diffusione passiva degli elettroliti attraverso l'epitelio dell'intestino tenue che è più permeabile. Il dosaggio di NaCl e KCl è regolato in modo da mantenere normale il pH del sangue ed osservare escrezione di Cl^- nelle urine (Holmberg, 1986). Un adeguato trattamento corregge tutte le anomalie di elettroliti ed ormoni, evitando le lesioni renali (Holmberg, 1986) ed i bambini crescono e si sviluppano normalmente. Sfortunatamente, la terapia non limita la severità della diarrea e altri approcci terapeutici, che utilizzano acetazolamide e colestiramina, hanno prodotto analoghi risultati (Brocklehurst et al., 1978; Clark et al., 1997). L'omeprazolo, un inibitore di pompa protonica, è stato proposto per il trattamento della CLD per la sua capacità di ridurre la secrezione gastrica di Cl^- (Aichbichler et al., 1997). Il suo utilizzo in una coorte più ampia di pazienti CLD non ha prodotto i risultati sperati (Höglund et al., 2001a). Inoltre, questa terapia è costosa e poco adatta per un trattamento cronico.

1.1.5 Nuova terapia sperimentale

Recentemente, l'utilizzo dell'amido amilasi resistente ha riscosso notevole interesse nel trattamento delle patologie diarroiche (Ramakrishna et al., 2000; Alam et al., 1997; Alam and Ashraf, 2003). Una volta arrivato nel colon, l'amido amilasi resistente è fermentato dalla flora residente in acidi grassi a catena corta (Short Chain Fatty Acids, SCFA), quali acetato, propionato e butirato (Topping and Clifton, 2001). Come già noto, gli SCFA hanno una grande capacità di stimolare il riassorbimento di ioni e acqua; forniscono energia e inducono un effetto trofico sulla mucosa dell'intestino (Binder and Mehta, 1989; Sellin and De Soigne, 1998; Rabbani et al., 1999; Topping and Clifton, 2001). Inoltre, è stato osservato che gli SCFA, in particolare il butirato, sono avidamente assorbiti dalla mucosa intestinale e che questo processo è responsabile del trasporto di Na^+ e Cl^- attraverso due differenti meccanismi: in primo luogo mediante gli scambiatori $\text{Cl}^-/\text{butirrato}$ e Na^+/H^+ e, in

secondo luogo, attraverso la up-regolazione degli scambiatori $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ (Kunzelmann and Mall, 2002). Studi effettuati sul porcellino d'India hanno dimostrato un ruolo fondamentale dello scambiatore $\text{SCFA}/\text{HCO}_3^-$ per la formazione e il mantenimento di un microambiente di pH sulla superficie della mucosa del colon (Genz et al., 1999). Infine, il butirrato è in grado di limitare la secrezione di Cl^- attraverso l'inibizione dell'attività del cotrasportatore $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (Resta-Lenert et al., 2001). Sulla scorta di queste informazioni, il nostro gruppo ha avanzato l'ipotesi che il butirrato potesse essere usato nel trattamento di pazienti CLD, e dopo uno studio di un anno, si è dimostrata la sua efficacia nel ridurre la diarrea e nel normalizzare l'omeostasi degli elettroliti (Berni Canani et al., 2004), come sarà descritto nel capitolo dei Risultati.

1.1.6 Gene-malattia e proteina

La ricerca del gene CLD è iniziata con un'analisi di linkage che poneva il gene malattia sul cromosoma 7 nella regione q31. La regione 7q31 era già nota per contenere un gene implicato nello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, il gene Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR), il cui malfunzionamento provoca la Fibrosi Cistica (CF). All'inizio, proprio per la mappatura in questa regione, si pensava che la CLD fosse una forma atipica di CF, ma uno studio più attento dei marcatori permise di stabilire che i due geni erano contigui, ma distinti (Kere et al., 1993). Uno studio di linkage disequilibrium genetico su una popolazione di Finlandesi ridefinì la localizzazione del gene CLD (Höglund et al., 1995) e fu costruita una mappa per identificare il gene responsabile della CLD (Höglund et al., 1996a). Il gene Down Regulated in Adenoma (DRA) mappava nella regione più critica suggerita dall'analisi di linkage (Höglund et al., 1995). Inizialmente, era stato clonato come un putativo gene oncosoppressore, a causa della sua espressione down-regolata nell'adenoma e nel carcinoma del colon (Schweinfest et al., 1993). Inoltre, la sua espressione era limitata alle cellule calciformi dell'epitelio intestinale (Schweinfest et al., 1993). La proteina mostrava un'omologia di sequenza per la famiglia dei trasportatori di solfato. Oltre a DRA anche un altro gene mappava nella zona critica: PRKAR2B, che codifica per una subunità regolatoria della Proteina Chinasi A (Solberg et al., 1992). Entrambi i geni avevano posizione e funzione rilevanti per porli come geni candidati (Höglund et al., 1996a), sebbene la possibile partecipazione di DRA nel trasporto anionico lo rendesse un candidato molto attraente per la CLD. Infatti, il ritrovamento di mutazioni missense e frameshift in 32 pazienti finlandesi e 4 polacchi confermarono l'identificazione di DRA come gene-malattia della CLD (Höglund et al., 1996b). Il clonaggio e il sequenziamento del gene DRA (Haila et al., 1998) ha rivelato che esso è composto da 21 esoni che ricoprono circa 39 kb di DNA genomico. Gli esoni e gli introni coprono un range che va, rispettivamente, da 55 a 234bp e da 105 a 9850 bp. Tutti i siti di splicing sono conformi alle sequenze dei donatori e accettori di splicing trovate in altri geni dei mammiferi (Stephens and Schneider, 1992). Seicento basi al 5' del sito d'inizio del cDNA pubblicato (Schweinfest et al., 1993) hanno evidenziato elementi regolativi putativi per la trascrizione tra cui 3 siti per il fattore di trascrizione AP-1; 3 siti per il fattore di trascrizione eritroide specifico GATA-1; 2 CCAAT box e una TATA box 33 bp prima del putativo sito d'inizio della trascrizione.

La sua "Open Reading Frame" di 764 amminoacidi predice una proteina di 84.5 kDa (Haila et al., 1998). Lo studio delle sequenze genomiche e proteiche mostra un modello a 10, 12 o 14 α -eliche transmembranarie (Figura 1), anche se il più accreditato, per la sua maggiore diffusione in natura, è il modello a 12 eliche (Bissig et al., 1994; Bairoch and Apweiler, 1996; Byeon et al., 1996). Sempre l'analisi di

Figura 1: Modelli a 10, 12 e 14 α -eliche ipotizzati per la proteina DRA (tratta da Haila et al., 1998).

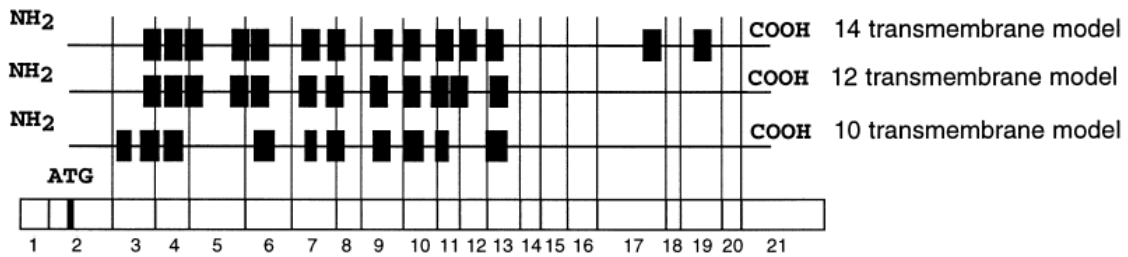
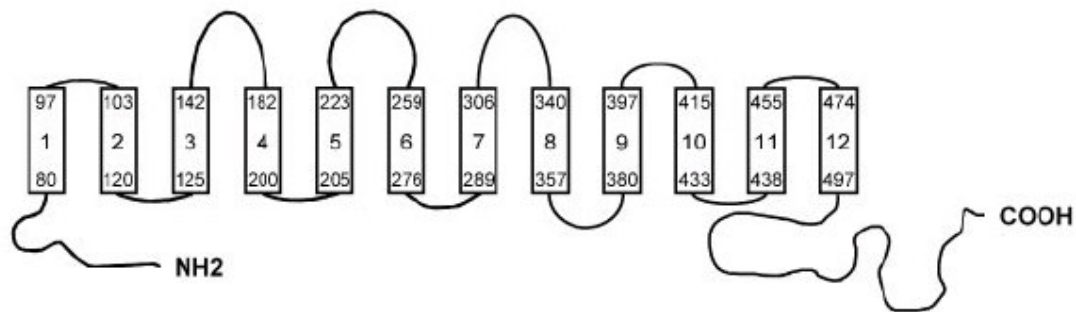
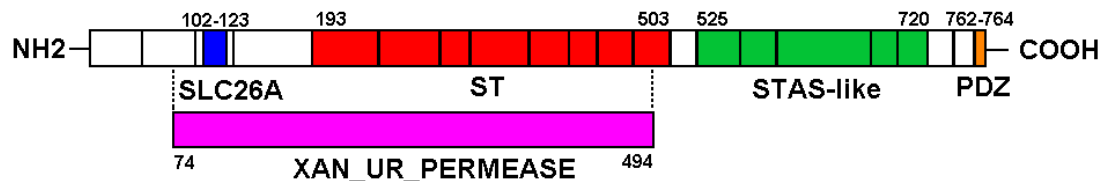


Figura 2: Modello a 12 α -eliche (tratta da Mäkelä et al., 2002).



sequenza mostra 5 potenziali siti per glicosilazioni N-linked (Figura 2; Byeon et al., 1996; Höglund et al., 1996b). Il trascritto di DRA è prevalentemente espresso nel sistema digestivo, dove è particolarmente abbondante nel duodeno e nel colon (Jacob et al., 2002). La proteina è collocata sulla membrana apicale sia delle cellule di superficie, sia delle cellule della cripta (Moseley et al., 1999). Espressione extraintestinale è stata dimostrata nel pancreas (Greeley et al., 2001), nell'epitelio dottale delle vescicole seminali (Haila et al., 2000) e nella trachea (Wheat et al., 2000). La proteina è stata classificata come 3° membro della famiglia SLC26 (Solute Linked Carrier), una famiglia genica relativamente giovane di scambiatori ionici altamente versatili. Attualmente, circa 10 proteine sono state incluse in questa famiglia (Mount and Romero, 2004). Una lista parziale dei processi fisiologici nei quali questi scambiatori giocano un ruolo cruciale include lo sviluppo scheletrico, la sintesi degli ormoni tiroidei, il trasporto accoppiato transepiteliale di NaCl, l'escrezione di bicarbonato nella porzione distale del tubulo renale e la secrezione di bicarbonato da parte del pancreas (Mount and Romero, 2004). Gli scambiatori SLC26 trasportano un considerevole numero di anioni monovalenti e bivalenti come SO_4^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, Cl^- , I^- , HCOO^- , OH^- e HCO_3^- (Mount and Romero, 2004). I singoli paraloghi differiscono significativamente nella specificità anionica: ad esempio, mentre lo scambiatore SLC26A6 (alias PAT1 o CFEX) è in grado di trasportare tutti i precedenti anioni, lo scambiatore SLC26A4 (alias Pendrina) trasporta gli anioni monovalenti come Cl^- , I^- e HCOO^- ma non quelli bivalenti come SO_4^{2-} e $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$. Diversi paraloghi si occupano dello scambio Cl^-/OH^- o $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Mount and Romero, 2004). Quando è stata effettuata una comparazione diretta, le proteine SLC26 sembrano essere degli scambiatori molto più efficienti per la coppia $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anziché Cl^-/OH^- (Mount and Romero, 2004). Una caratteristica delle proteine SLC26 è la relativamente bassa conservazione tra gli ortologi murini e umani: la

Figura 3: Domini funzionali previsti per la proteina SLC26A3 (adattata da Mäkelä et al., 2002).



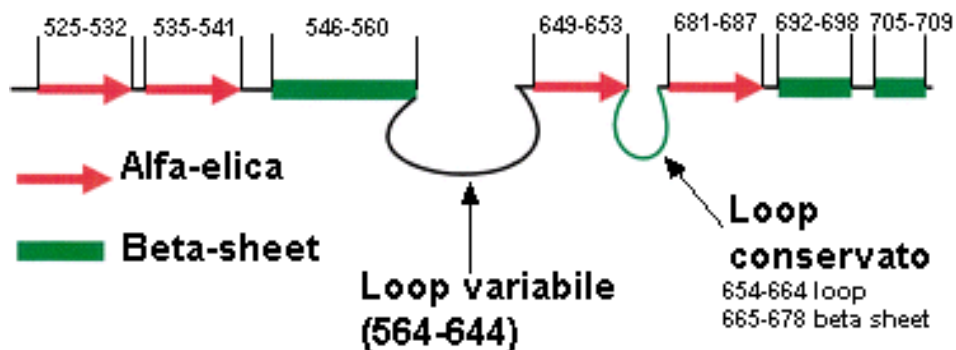
percentuale d'identità varia da un basso 76% (SLC26A8) ad un alto 95% (SLC26A5), contro una mediana riportata in letteratura dell'86% tra ortologi murini ed umani. Nel caso della proteina SLC26A3 l'identità è dell'80%. La maggior parte dell'omologia tra gli scambiatori SLC26 si ritrova all'interno del core idrofobico dei domini transmembrana (Figura 3; Dominio XAN_UR_Permease). Una regione di omologia coinvolge 22 amminoacidi della sequenza consenso al trasporto dei solfati (Prosite, PS01130, SLC26A; Figura 3). Sebbene non tutti i mammiferi si conformino all'esatta sequenza consenso, questa regione contiene molti residui invariati, presumibilmente critici per il trasporto anionico. La Tabella 1 riporta le sequenze amminoacidiche di questa regione nei vari paraloghi della famiglia SLC26.

Tabella 1: Comparazione delle sequenze amminoacidiche della regione di consenso al trasporto del solfato nei vari paraloghi della famiglia SLC26.

Proteina	Sequenza
SLC26A1 (SAT-1)	PIYSLYTSFFANLIYFLMG
SLC26A2 (DTDST)	PVYGLYTSFFASIIYFLLG
SLC26A3 (DRA)	PVYGLYASFFPAIIYLFFG
SLC26A4 (Pendrina)	VGYGLYSAFFPILTYFIFG
SLC26A5 (Prestina)	PIFGLYSSFYPVIMYCFLG
SLC26A6 (PAT-1)	PVFGLYSSFYPVFIYFLFG
SLC26A7	PVFGLYGSLFPAAIYAIFG
SLC26A8 (TAT-1)	PLNIAYAAFCSVVIYVIFG
SLC26A9	AVNGLYSSFPLLTYYFFLG
SLC26A11	PQYGLYSAFMGCFVYFFLG

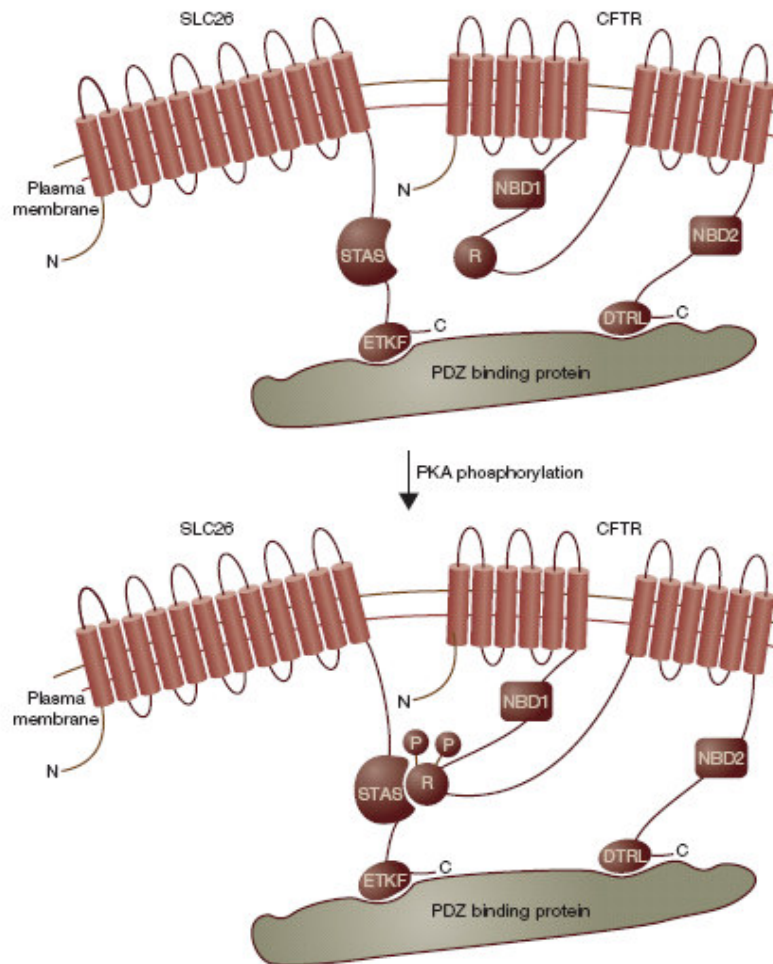
C'è un secondo cluster di residui invariati nella porzione C-terminale del core idrofobico delle proteine, in un segmento conservato definito da Saier et. al. nel 1999. Questa regione include la tripletta -NQE-, residui 372-374 di SLC26A3, che è conservativamente variabile solo in SLC26A8 (alias TAT-1), in cui si ritrova la tripletta -NQD-. La regione citoplasmatica C-terminale di tutte e 10 le proteine include il dominio "STAS-like" (Sulfate Transporter and Anti Sigma), chiamato così per l'omologia tra la famiglia genica SLC26 e gli antagonisti batterici del fattore anti-sigma. Le caratteristiche strutturali sono state predette sulla base dell'analisi NMR del fattore anti-sigma SPOIIAA. Esso contiene un caratteristico "α-helical handle", un foglietto β e due loop di cui uno altamente conservato (Figura 4; Mount and Romero, 2004). Infine, 5 delle 10 proteine della famiglia SLC26 (SLC26A3, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8 e SLC26A9) terminano con un motivo PDZ di classe I (Songyang et al., 1997). Per quanto riguarda la proteina SLC26A3, come recentemente dimostrato, il dominio "STAS-like" ed il dominio PDZ hanno un ruolo

Figura 4: Il dominio STAS-like (adattata da Mount and Romero, 2004).



fondamentale nella sua attivazione e nella secrezione del bicarbonato (Figura 4). Tale meccanismo secretorio richiede la presenza della proteina CFTR, un canale per il $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ATP-gated, regolato dalla fosforilazione mediata dalla Proteina Kinasi A (PKA), ed è espresso sulla membrana apicale delle cellule dell'epitelio polmonare, epatico, pancreatico, intestinale, genitale ed epidermico. Quando CFTR non funziona, si produce uno squilibrio nel trasporto dei sali e dei fluidi con conseguente iperviscosità dei secreti dei tessuti dai quali è espresso, generando una patologia nota come Fibrosi Cistica (CF). Per lungo tempo si è pensato che il difetto principale nella CF fosse un ridotto trasporto epiteliale del Cl^- . Studi recenti hanno modificato questa visione dimostrando che il difetto principale della CF non è una mancanza del trasporto di Cl^- in sé, ma un problema che riguarda la secrezione dei fluidi bicarbonato-mediata, causato dall'incapacità dei mutanti di CFTR di attivare lo scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Choi et al., 2001). Studi successivi dello stesso gruppo (Ko et al., 2002) hanno esteso il collegamento tra CFTR e HCO_3^- , dimostrando che CFTR specificamente up-regola l'attività di tre membri della famiglia della SLC26. Fondamentalmente, questi studi hanno dimostrato che il trasporto del Cl^- e la modulazione dello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sono attività distinte e separate di CFTR. In uno studio recentissimo si è avuta chiara evidenza di una diretta interazione molecolare tra CFTR e SLC26A3 (Ko et al., 2004). Il legame tra i due trasportatori risulta in un'unica, reciproca up-regolazione delle loro attività di trasporto, cosa che spiega come mai la secrezione di fluidi e bicarbonato dipenda dall'espressione di entrambe le proteine. Gli autori hanno usato una serie di eleganti esperimenti molecolari, biochimici e elettrofisiologici per dimostrare che l'interazione tra CFTR e i membri della famiglia SLC26 è mediata dal legame del dominio regolatorio (R) di CFTR e il dominio "STAS-like" di SLC26. L'interazione è aumentata dalla fosforilazione del dominio R da parte della PKA ed è modulata da proteine scaffold leganti PDZ (come EBP50 e E3KARP), che legano le due proteine in un unico complesso multimerico (Figura 5). L'interazione non è solo di tipo funzionale. Gli autori dimostrano anche una reciproca regolazione, in base a cui l'espressione di SLC26A3 provoca una nuova up-regolazione dell'attività di CFTR. Inoltre, i livelli di espressione di SLC26A3 è dipendente da CFTR in molte cellule epiteliali (Greeley et al., 2001), suggerendo che CFTR regola l'espressione dei geni SLC26. Esperimenti di patch-clamp mostrano un aumento di 6 volte dell'attività PKA mediata di CFTR in cellule HEK293 che coesprimono scambiatori SLC26 e CFTR, rispetto a cellule che esprimono unicamente CFTR. L'aumento di attività di CFTR richiede un intatto dominio R e un intatto dominio "STAS-like" di SLC26. Il dominio "STAS-like" purificato è capace, da solo, d'indurre l'aumento di attività. Sebbene in questi

Figura 5: Interazione tra un membro della famiglia SLC26 (ad esempio SLC26A3) e CFTR (tratta da Grey, 2004).



esperimenti sono state usate cellule trasfettate in coltura e quindi *in vitro*, simili risultati sono ottenuti in cellule epiteliali native che esprimono livelli fisiologici di CFTR e quindi *in vivo*. L'infusione di domini "STAS-like" ricombinanti nel citoplasma di cellule epiteliali native, induce un'attivazione acuta di CFTR, suggerendo che l'interazione è rilevante dal punto di vista fisiologico. Inoltre, mutazioni nel dominio "STAS-like" di SLC26A3 provocano la completa perdita di funzione (Chernova et al., 2003). Alla luce di queste nuove delucidazioni sui meccanismi molecolari, è possibile che i geni della famiglia SLC26 possano giocare un ruolo nella patogenesi della Fibrosi Cistica.

1.1.7 Ruolo dello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ nell'ileo e nel Colon

L'assorbimento e la secrezione del fluido intestinale sono provocati dal movimento di elettroliti, soprattutto Na^+ e Cl^- , attraverso la membrana cellulare. La permeabilità dell'intestino decresce in direzione distale per cui l'epitelio del colon è scarsamente permeabile. Tutto questo rende altamente necessario un meccanismo di trasporto attivo. Il processo d'assorbimento ha sede soprattutto in corrispondenza dei villi, dove le sostanze che devono essere assorbite sono in stretto contatto con un'area di grande superficie, mentre i processi secretori sono di competenza delle cellule

epiteliali della cripta (Welsh et al., 1982). Vari meccanismi sono coinvolti nell'assorbimento di NaCl nell'epitelio intestinale. Il componente principale è la pompa Na^+/K^+ -ATPasi che stabilisce un gradiente elettrochimico lungo la mucosa intestinale, facendo fuoriuscire simultaneamente 3 ioni Na^+ e facendo entrare 2 ioni K^+ attraverso la membrana basolaterale delle cellule epiteliali (Charney and Donowitz, 1978; Kirk et al., 1980). Questo gradiente elettrochimico fornisce l'energia sufficiente per la traslocazione di Na^+ lungo la membrana apicale delle cellule epiteliali mediata da canali propri del sodio, cotrasportatori Na^+ -dipendenti o scambiatori ionici (Will et al., 1980; Hediger et al., 1987; Orłowski and Grinstein, 1997). Il Cl^- intestinale è assorbito sia in maniera passiva, grazie al gradiente generato dall'assorbimento elettrogenico di Na^+ , sia in maniera attiva, attraverso un sistema di trasporto elettronegativo contro gradiente (Davis et al., 1983). Nell'ileo e nel colon dell'uomo, il sistema di trasporto attivo sembra essere responsabile della maggior parte dell'assorbimento di NaCl. Numerose ricerche indicano che l'assorbimento di NaCl si ha attraverso l'accoppiamento delle attività degli scambiatori Na^+/H^+ e degli scambiatori $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sulla membrana apicale delle cellule epiteliali (Turnberg, 1970; Knickelbein et al., 1985, 1988). Pur essendo legati, i due flussi sono indipendenti l'uno dall'altro. Infatti, HCO_3^- può essere sia assorbito sia secreto attraverso lo scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, ma la direzione non influenza l'attività dello scambiatore Na^+/H^+ (Feldman and Stephenson, 1990). Le proteine scambiatrici Na^+/H^+ sono membri della famiglia SLC9 con almeno 6 membri ben caratterizzati (Orłowski and Grinstein, 1997; Counillon and Pouyssegur, 2000). Sono state identificate tre isoforme dello scambiatore Na^+/H^+ nell'epitelio dell'ileo e del colon, nominate NHE1, NHE2 e NHE3 (da Na^+/H^+ Exchanger). Nel coniglio, NHE1 è ubiquitariamente espressa e localizza sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali ileali di villo e cripta (Yun et al., 1995), gli altri due scambiatori Na^+/H^+ , NHE2 e NHE3, sono stati identificati sulla membrana apicale brush border di cellule intestinali di superficie o cellule epiteliali di villo (Hoogerwerf et al., 1996; Bookstein et al., 1997). In molti tessuti, l'attività di scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ è correlata soprattutto a tre proteine della famiglia AE (da Anion Exchanger; alias SLC4), chiamate AE1, AE2 e AE3 (Alper, 1991). L'espressione intestinale è stata studiata per tutte e tre le proteine (Alper et al., 1999; Rajendran et al., 1999). La proteina AE2 localizza sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali superficiali (Alper et al., 1999). Lo scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ è sostanzialmente inibito dalla deplezione di Na^+ , il che suggerisce una stretta associazione tra lo scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e l'assorbimento accoppiato di NaCl nella porzione distale del colon di ratto (Rajendran et al., 2000). Le cellule della cripta esprimono la proteina CFTR, che è strettamente correlata alla secrezione di bicarbonato nelle linee cellulari umane del dotto pancreatico CFPAC-1 (Shumaker et al., 1999). Nella porzione prossimale del duodeno di topi knockout per CFTR, la secrezione di HCO_3^- è assente. I membri della famiglia SLC26 che specificamente si occupano dello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (SLC26A3, SLC26A6, SLC26A8) partecipano a questo meccanismo di assorbimento, potenziando l'azione di CFTR e permettendo la regolazione fine della concentrazione anionica nei secreti salini (Figura 6). Sebbene la maggior parte delle cellule siano localizzate in un ambiente con osmolarità pressoché costante, le cellule di un epitelio di trasporto, come le cellule intestinali, sono soggette a rapidi cambi del volume cellulare. L'attivazione dello scambio Na^+/H^+ provoca un'alcalinizzazione intracellulare e una parallela attivazione dello scambiatore accoppiato $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Ericson and Spring, 1982). Il risultato netto è un accumulo intracellulare di K^+ , Na^+ , e Cl^- e quindi un rigonfiamento della cellula. In aggiunta, la Na^+/K^+ -ATPasi si attiva per sostituire lo

Figura 6: Modello di scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ proposto per la regolazione delle concentrazioni anioniche nel secreto pancreatico (tratta da Ko et al., 2004).

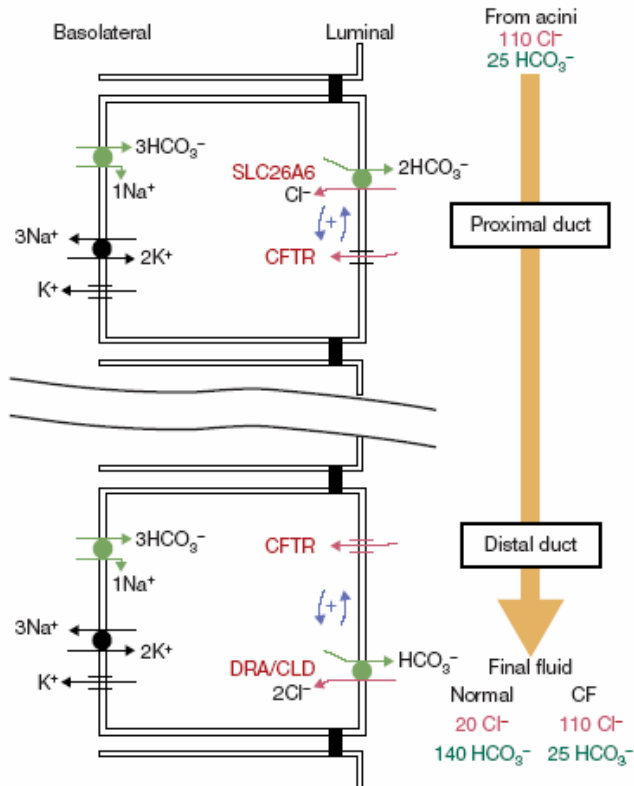
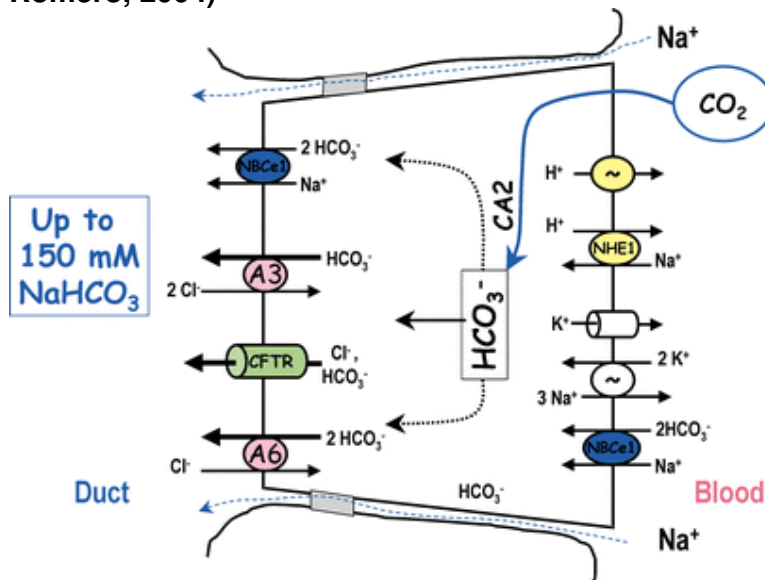


Figura 7: Modello di risposta cellulare all'alcalinizzazione (tratta da Mount and Romero, 2004)



ione Na^+ accumulato con lo ione K^+ (Figura 7). Il pH intracellulare (pHi) è finemente regolato per rimanere all'interno di un preciso range fisiologico, per assicurare una corretta funzionalità dei processi biologici. Nelle cellule dell'epitelio intestinale, la regolazione del pHi è controllata da un continuo traffico transepiteliale di ioni e altri equivalenti acido/base (Boron, 1986). Una singola cellula utilizza simultaneamente molteplici meccanismi di regolazione del pHi, che possono essere divisi in "acid loaders" e "acid extruders". In molti tipi cellulari, gli scambi accoppiati Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sono "pHi-sensitive" e, oltre alla regolazione basale del pHi, svolgono funzioni, rispettivamente, di "acid extruding", per il recupero da un carico acido, e "acid loading", per il recupero da un carico alcalino (Simchowicz and Roos, 1985; Jentsch et al., 1986; Paradiso et al., 1987; Boyarsky et al., 1990; Stuenkel et al., 1988; Sundaram et al., 1991).

1.1.8 Epidemiologia della CLD

Dalla prima descrizione di CLD ad opera di Gamble et al. e Darrow nel 1945, approssimativamente 200 casi di CLD sono stati riportati in tutto il mondo, e circa 50 di essi in Finlandia (Norio et al., 1971, 1973; Holmberg et al., 1977a; Holmberg, 1986). Altre aree ad alta frequenza includono la Polonia, l'Arabia Saudita e il Kuwait (Tomaszewski et al., 1987; Lubani et al., 1989; Shaltout et al., 1989; Khan and Yaish, 1992; Kagalwalla, 1994). La più alta incidenza è stata riportata nei territori arabi dove i matrimoni tra consanguinei sono comuni. In Arabia Saudita è stato stimato che la CLD colpisce 1:5.000 nuovi nati (Kagalwalla, 1994), mentre in Kuwait la frequenza stimata è 1:3.200 (Badawi et al., 1998). Nelle province più orientali della Finlandia, l'incidenza è 1:20.000 nuovi nati, mentre in Polonia il disordine è molto più raro con un'incidenza stimata intorno a 1:200.000 (Höglund et al., 1998a). Inoltre, casi sporadici sono stati descritti in molti differenti gruppi etnici e popolazioni, tra cui paesi Europei, Stati Uniti d'America, Canada, Argentina, Australia, molti paesi Asiatici e del Medio Oriente. La diarrea acuta nella prima infanzia è un sintomo molto comune ed è un contribuente primario al carico di malattie presenti nel mondo (Murray and Lopez, 1997) ed è responsabile di circa un quarto dei decessi tra i bambini sotto i 5 anni nei paesi in via di sviluppo. Per questo, la stima dell'incidenza della CLD è molto difficile. Inoltre, molti pazienti sono affetti da forme lievi che spontaneamente correggono con una dieta ricca di cibi salati. Anche questi soggetti rimangono non diagnosticati. Fino ad oggi sono state identificate circa 30 mutazioni diverse (Mäkelä et al., 2002). Tre di esse, a causa di un effetto fondatore, si ritrovano nel 47-98% degli alleli mutati, a seconda delle rispettive aree ad alta frequenza. Pazienti provenienti da diverse popolazioni sono portatori di uno spettro relativamente ampio di mutazioni. Molti casi sporadici non hanno precedenti casi sospetti di CLD nella famiglia, e l'analisi del DNA mostra mutazioni non precedentemente caratterizzate nel gene SLC26A3. L'isolamento etnico o la consanguineità sono associate a mutazioni in omozigosi, di solito confinate nella singola famiglia (mutazioni private). Tutto questo ha fatto presupporre che mutazioni del gene SLC26A3 non sono eventi rari.

In Finlandia, l'area ad alta incidenza coincide con la parte centro-orientale del paese, colonizzata da un limitato numero di famiglie nel XVI secolo (Mäkelä et al., 2002). In seguito, un effetto "collo di bottiglia" ha ridotto il pool di alleli tra i coloni e l'isolamento geografico, linguistico e culturale, insieme con un'espansione della popolazione durante il XVIII secolo portarono ad un arricchimento di certi alleli, come la mutazione p.V317del nel gene SLC26A3 (de la Chapelle, 1993; Höglund et al., 1996b). Ancora oggi, le radici di un neonato finlandese con la CLD possono essere poste in queste regioni e la mutazione p.V317del rappresenta quasi l'unica

Tabella 2: Elenco delle mutazioni riscontrate nel gene SLC26A3

Cambio Nucleotidico	Cambio Amminoacidico	Tipo di Mutazione	Esone colpito	Dominio colpito
145-157del13	K49LfsX8	Frameshift	3	Proteina tronca
177-178insC	I60HfsX11	Insertion	3	Proteina tronca
268-269insAA	G91KfsX3	Insertion	3	Proteina tronca
344delT	I115TfsX19	Frameshift	4	Proteina tronca
358 G>A	G120S	Missense	4	SLC26A; 2 ^a Elica TM
371 A>T	H124L	Missense	4	SLC26A; 3 ^a Elica TM
392 C>G	P131R	Missense	5	Xan Ur Permease
559 G>T	G187X	Nonsense	5	Proteina tronca
571-2 A>G		Splicing	IVS5	
571-1 G>T		Splicing	IVS5	
616 T>C	S206P	Missense	6	ST; 5 ^a Elica TM
3.5kb deletion		Frameshift	7-8	
915 C>A	Y305X	Nonsense	8	Proteina tronca
921 T>G	C307W	Polimorfismo	8	
949-951delGTG	V317del	In frame deletion	8	ST
1299G>A	A433A	Polimorfismo	11	
1306 C>T	Q436X	Nonsense	11	Proteina tronca
1312-1 G>A		Splicing	IVS11	
1314 C>T	S438S	Polimorfismo	12	
1386 G>A	W462X	Nonsense	12	Proteina tronca
1403 A>T	D468V	Missense	12	ST
1408-1 G>A		Splicing	IVS12	
1342-1343delTT	L448KfsX9	Frameshift	12	Proteina tronca
1487 T>G	L496R	Missense	13	ST; 12 ^a Elica TM
1515-2delA		Splicing	IVS13	
1516delC	P506QfsX30	Frameshift	14	Proteina tronca
1548-1551 delAACC	N518SfsX17	Frameshift	14	Proteina tronca
1579- 1581delTAT	Y527del	In frame deletion	14	STAS-like
1609delA	I537FfsX39	Frameshift	15	Proteina tronca
1631 T>A	I544N	Missense	16	STAS-like
1661 G>A	R554Q	Polimorfismo	15	
2024- 2025insATC	675-676insI	In frame insertion	18	STAS-like
2104-2105 delGGins29		In frame InsDel	19	STAS-like
2116delA	S706AfsX6	Frameshift	19	Proteina tronca

mutazione finlandese CLD associata (Mäkelä et al., 2002). Con la più recente emigrazione, la mutazione p.V317del si è trasferita fuori dalla Finlandia, divenendo responsabile di circa l'88% degli alleli mutati in Svezia (Höglund et al., 1998a). In Polonia, gli studi genetici hanno rivelato almeno 3 simili, ma più recenti e locali effetti fondatori, che, insieme con la predominante c.2025insATC (circa 50% di frequenza) hanno portato l'incidenza della CLD a 1:200.000 nuovi nati (Höglund et al., 1998a). Tutti gli effetti fondatore polacchi sono relativamente recenti, poiché ognuno di loro ha una distribuzione geografica caratteristica e un ben conservato aplotipo associato. Nessuna delle mutazioni polacche è stata ritrovata al di fuori del paese. Sporadici case-reports indicano, comunque, che la CLD è nota nei paesi confinanti con la Polonia. Queste poche diagnosi di CLD sono state effettuate soprattutto in immigrati di origine turca, indiana o araba (Höglund et al., 2001b). L'alto tasso di endogamia ha portato all'arricchimento di un singolo allele mutante in certe tribù dell'Arabia Saudita e nel Kuwait (Höglund et al., 1998a). Qui, la mutazione p.G187X è responsabile di circa il 90% dei casi studiati e, come accennato all'inizio del paragrafo, la frequenza è più alta che altrove (Kagalwalla, 1994; Badawi et al., 1998). Come c'era da aspettarsi, la mutazione p.G187X si è incominciata a diffondere fuori dai territori arabi, ed è stata recentemente ritrovata in due pazienti CLD della Gran Bretagna (Höglund et al., 1998b). Sebbene i primi due pazienti con CLD descritti da Gamble et al. e Darrow nel 1945 fossero di origine europea, meno di 20 pazienti nativi europei (escludendo i finlandesi e i polacchi) sono stati descritti in letteratura. Un recente studio di diagnosi molecolare effettuata su pazienti tedeschi e, olandesi, con una nota connessione a paesi arabi, ha mostrato un'unica mutazione distinta sia dalle mutazioni polacche, sia da quelle arabe (Mäkelä et al., 2002). L'analisi molecolare effettuata su pazienti CLD ha permesso d'individuare una zona del gene molto prona ad eventi mutazionali (Mäkelä et al., 2002). In questa zona, che va dal nucleotide 1299 al nucleotide 1661 e che codifica per la parte prossimale della coda intracellulare, contiene poco più della metà delle mutazioni registrate fino ad oggi (Tabella 2). Le mutazioni di frameshift (delezioni e inserzioni) sono l'evento mutazionale più frequente (30%). Gli eventi di transizione e di trasversione hanno praticamente la stessa frequenza, rispettivamente 47% (7/15) e 53% (8/15). Nella sequenza codificante di 2295 bp ci sono 155 dinucleotidi CG e solo quattro eventi di transizione cadono in corrispondenza di uno di questi dinucleotidi, meccanismo compatibile con una deaminazione spontanea della 5-metilcitosina (p.G120S, p.A433A, p.S438S, p.R554Q). Un singolo hotspot mutazionale sembra risiedere al codone 120, dove la mutazione c.358G>A (p.G120S) è stata trovata in tre famiglie diverse e non correlate tra di loro. In queste famiglie, gli aplotipi associati alla mutazione sono totalmente diversi e questo conferma la suscettibilità alla mutazione (Höglund et al., 1998a, 1998b, 2001b). Gli altri tre cambi in corrispondenza di un dinucleotide CG cadono nella regione hotspot, ma non sono causativi di malattia (p.A433A, p.S438S, p.R554Q). Ne consegue che l'ipermutabilità di un dinucleotide CG, che genera una mutazione causativa di malattia, deve essere un evento piuttosto raro.

1.2 Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato la caratterizzazione molecolare di sei famiglie in cui erano presenti uno o più bambini affetti da CLD. L'analisi molecolare ha lo scopo di correlare l'alterazione genica non solo alla conseguente variazione strutturale della proteina ma anche con i singoli fenotipi. Lo studio è stato effettuato impiegando l'analisi dei 21 esoni del gene utilizzando il sequenziamento diretto che è

attualmente la tecnica più sensibile per la ricerca di mutazioni in geni noti. Inoltre, alcune mutazioni riscontrate sono state caratterizzate utilizzando tecniche di D-HPLC, Long-PCR e Walking Primer Analysis. Per la prima volta, sono stati caratterizzati pazienti CLD italiani e sud africani.

Un ulteriore scopo dello studio è stata la sperimentazione di una nuova terapia a base di butirrato su uno dei bambini del sud-Italia affetti da CLD.

2. Materiali e Metodi

2.1 Pazienti

Abbiamo studiato i seguenti pazienti CLD: due pazienti non correlati provenienti dal sud Italia; un paziente nato negli USA da genitori dello Zimbabwe e appartenenti a due gruppi etnici differenti; una paziente nata negli USA da genitori di origine europea e portoricana; due fratelli nati nel nord Italia da genitori provenienti dal Marocco; una paziente nata nel centro Italia da genitori sempre di origine marocchina. Prima d'iniziare l'analisi molecolare, i genitori sono stati informati sullo scopo, i metodi e i possibili risultati di uno studio sul DNA e hanno dato il loro consenso informato per iscritto.

Il primo paziente è un maschio di 11 anni, con una storia di ricorrenti occlusioni intestinali e diarrea cronica, ricoverato in ospedale per un sospetto di pseudo ostruzione cronica e idiopatica dell'intestino. Il paziente è il terzo figlio di genitori non consanguinei del sud Italia, i suoi due fratelli sono sani e l'anamnesi familiare esclude altri casi di diarrea cronica. Durante la gravidanza, l'ecografia mostrò dilatazione delle anse intestinali e polidramnios. A due giorni dalla nascita fu sottoposto ad intervento chirurgico per sospetta ostruzione intestinale. Successivamente, sviluppò diarrea con lieve alcalosi metabolica indotta dalla disidratazione e ben corretta con supplementazione orale di NaCl e KCl. In seguito ad un ricovero all'età di 11 anni, il paziente mostrava segni di distensione addominale, lieve disidratazione e alcalosi metabolica. Altezza e peso erano nella norma, così come i test di laboratorio routinari, inclusi i livelli sierici di elettroliti, aldosterone, renina e bilirubina. Le concentrazioni fecali di Cl^- , Na^+ e K^+ erano, rispettivamente, 161, 59 e 27 mM, evidenziando una concentrazione di cloruro suggestiva di CLD accompagnata da gap cationico. Dopo l'analisi molecolare (vedi Risultati) il paziente è stato trattato con successo con una nuova terapia a base di acido butirrico (Berni Canani et al., 2004).

Il secondo paziente è un maschio di 5 anni con diarrea cronica sviluppata fin dal primo mese di vita. I suoi genitori erano cugini di primo grado provenienti dal sud Italia, i suoi tre fratelli erano in buona salute e l'anamnesi familiare esclude altri casi di diarrea cronica. Durante la gravidanza, l'ecografia mostrò dilatazione delle anse intestinali e polidramnios. All'età di due settimane, la distensione addominale e l'assenza di meconio fecero avanzare l'ipotesi di sindrome di Hirschsprung, esclusa dalla negatività degli accertamenti strumentali. Successivamente, il bambino sviluppò diarrea cronica con urgenza e incontinenza. Anche in questo caso, al ricovero in ospedale, a parte una lieve disidratazione e distensione addominale, gli esami di laboratorio routinari non mostrarono nulla di significativo se non una leggera iperkaluria (107 mmol/24h; v.r. 30-90 mmol/24h) e una marcata ipocloruria (6 mmol/24h v.r. 150-250 mmol/24h). Le concentrazioni fecali di Cl^- , Na^+ e K^+ erano, rispettivamente, 180, 64 e 35 mM, evidenziando una concentrazione di cloruro suggestiva di CLD accompagnata da gap cationico.

Il terzo paziente è un maschio di 6 mesi nato ad Indianapolis (Indiana, USA) da genitori non consanguinei provenienti dallo Zimbabwe; in particolare, il padre appartiene all'etnia Shamza del nord Zimbabwe e la mamma all'etnia Gushu ngo del centro Zimbabwe. Un altro fratellino era in buona salute e l'anamnesi familiare era negativa per altri episodi di diarrea cronica. Durante la gravidanza, l'ecografia mostrò

una possibile ostruzione intestinale e polidramnios. All'età di cinque settimane, fu ricoverato per accertamenti su una possibile sindrome di Hirschsprung o una ostruzione intestinale, entrambe escluse dalla negatività degli accertamenti strumentali. All'età di 3 mesi un nuovo ricovero mostrava segni di scarso accrescimento. I test di laboratorio mostrarono una moderata ipoelettrolitemia; i livelli fecali di Cl^- , Na^+ e K^+ erano, rispettivamente, 95, 18 e 68 mM, evidenziando una concentrazione di cloruro suggestiva di CLD accompagnata da gap cationico.

La quarta paziente è una bambina di 10 anni, nata a New Haven (Rhode Island, USA) da genitori non consanguinei di origini portoricana ed europea. Durante la gravidanza, l'ecografia mostrò dilatazione delle anse intestinali e polidramnios. A tre settimane, la bambina mostrava segni di alcalosi metabolica ed in base ai valori fecali degli elettroliti, purtroppo non più disponibili, fu fatta una diagnosi di CLD. La bambina ha quindi iniziato la supplementazione di NaCl e KCl dalla nascita ed è in buona salute.

Il quinto ed il sesto paziente sono due maschi di 16 e 12 anni, nati nel nord Italia da genitori marocchini e cugini di primo grado. Per entrambi, durante la gravidanza, l'ecografia mostrò dilatazione delle anse intestinali e polidramnios. Nel maggiore la diarrea si è presentata fin dalla nascita, con una severa distensione addominale e assenza di meconio. Dopo nove mesi fu ricoverato per una disidratazione severa e alcalosi metabolica. I livelli sierici mostravano una moderata ipoelettrolitemia e i livelli urinari di cloruro non erano rilevabili (acloruria). I livelli fecali di Cl^- , Na^+ e K^+ erano, rispettivamente, 145, 105 e 25 mM, evidenziando una concentrazione di cloruro suggestiva di CLD accompagnata da gap cationico. Il minore dei due fu diagnosticato alla nascita. I livelli fecali di Cl^- , Na^+ e K^+ erano, rispettivamente, 146, 135 e 8 mM.

Il settimo paziente è una bambina di 3 mesi, nata nel centro Italia da genitori marocchini e cugini di primo grado. Durante la gravidanza, l'ecografia mostrò dilatazione delle anse intestinali e polidramnios. A due settimane, la bambina mostrava segni di alcalosi metabolica ed in base ai valori fecali degli elettroliti, purtroppo non più disponibili, fu fatta una diagnosi di CLD. La bambina ha quindi iniziato la supplementazione di NaCl e KCl dalla nascita ed è in buona salute.

2.2 Strategia d'analisi

Per effettuare lo screening del gene SLC26A3 abbiamo utilizzato la seguente strategia:

- Estrazione del DNA dal sangue periferico dei pazienti;
- Amplificazione PCR dei 21 esoni del gene;
- Analisi diretta della sequenza nucleotidica con il metodo di Sanger modificato dei 21 esoni del gene;
- Screening in D-HPLC su una popolazione sana del sud Italia, delle mutazioni trovate e non precedentemente descritte;
- Long-PCR per la conferma di delezione dell'esone 18 nel secondo paziente;
- Walking Primer Analysis per l'identificazione dei breakpoint;
- Interpretazione dei risultati e comparazione con sequenze ortologhe.

2.2.1 Estrazione del DNA e PCR

Da ogni paziente sono stati prelevati 5 mL di sangue periferico in provette Vacutainer contenenti EDTA per impedirne la coagulazione. Il DNA è stato estratto dai leucociti utilizzando il kit commerciale "Nucleon BACC2" (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Per ogni campione è stato quantizzato il DNA estratto mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm. Dai campioni "tal quali" sono state preparate delle aliquote di lavoro con una concentrazione di DNA pari a 60 ng/ μ L. Per l'amplificazione PCR, abbiamo utilizzato dei primers precedentemente descritti (Haila et al., 1998) che permettono l'utilizzo di un unico protocollo. Le PCR sono state condotte in un volume finale di 50 μ L, utilizzando le seguenti condizioni:

Materiale	Produttore	Concentrazione Finale
DNA	-	180 ng
HotMasterMix buffer 2,5x	Eppendorf Italia, Milano	1x
Primer Forward	Ceinge – Biotecnologie avanzate scarl	400 nM
Primer Reverse	Ceinge – Biotecnologie avanzate scarl	400 nM

Le PCR sono state eseguite su Thermal cycler 9700 e 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con il seguente protocollo touchdown:

Temperatura	Tempo	Cicli
94 °C	3 minuti	1
94 °C	20 secondi	} 14
62 °C -0,5 °C ∇ ciclo	40 secondi	
72 °C	45 secondi	
94 °C	20 secondi	} 25
55 °C	40 secondi	
72 °C	45 secondi	
72 °C	7 minuti	1

2.2.2 Analisi di sequenza

L'analisi di sequenza è stata eseguita secondo la metodica BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystem). Tutti i frammenti di PCR sono stati sequenziati con gli stessi primers utilizzati nel processo di amplificazione. I campioni ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare su 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state allineate e confrontate con la sequenza del gene depositata in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=51493052&itemID=1280&view=growthparts>) utilizzando il programma SeqMan 4.00 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

2.2.3 Denaturing High Performance Liquid Chromatography (D-HPLC)

Abbiamo analizzato gli esoni nei quali sono state riscontrate mutazioni puntiformi in 100 soggetti sani di controllo, non imparentati tra di loro, utilizzando il D-HPLC Wave Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500 (Transgenomic, Omaha, NE, USA). I campioni di PCR sono stati mischiati con un amplificato PCR di un campione wild type controllato per sequenza, denaturati a 95 °C per 5 minuti e lasciati a temperatura ambiente per 45 minuti per permettere la formazione degli eteroduplex. Un'aliquota di 8 µL è stata caricata su una colonna C18 a fase inversa preriscaldata (DNASep 4.5 x 50 mm; Transgenomic). La temperatura per la separazione ottimale degli eteroduplex è stata calcolata mediante l'utilizzo del software Wavemaker 4.1.40 (Transgenomic). DNA è stato fluito dalla colonna con un gradiente lineare di acetonitrile (ACN, Transgenomic) in un tampone 0.1 mM trietilammina acetato (TEAA, Transgenomic) pH 7.0, ad un flusso costante di 0.9 ml/min. Il gradiente è stato formato mescolando il tampone A (0.1 mM TEAA) e il tampone B (0.1 mM TEAA, 25% v/v ACN). Il gradiente analitico dura 4 minuti e il tampone B è stato aumentato con una velocità di 2% al minuto. Per ogni frammento, la concentrazione iniziale del tampone B è stata aggiustata in maniera tale da ottenere un tempo di ritenzione di 4-5 minuti. La colonna è stata quindi lavata con 100% tampone B per 30 secondi ed equilibrata alle condizioni iniziali per 6 secondi prima di procedere con una successiva iniezione. L'eluizione del DNA è stata monitorata mediante rivelatore UV a 260 nm.

2.2.4 Long-PCR analysis e Walking Primer Analysis

Abbiamo utilizzato il kit Expand Long Template PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germania) per verificare l'estensione della delezione comprendente l'esone 18 ritrovata nel paziente 2. Abbiamo utilizzato il primer forward dell'esone 17 ed il primer reverse dell'esone 19 perché, dalle precedenti amplificazioni esone specifiche, sapevamo che tali esoni erano integri. Il frammento atteso era di circa 6300 bp. Le PCR sono state condotte in un volume finale di 50 µL, utilizzando le seguenti condizioni:

Materiale	Produttore	Concentrazione Finale
DNA	-	480 ng
Buffer 3	Roche	1x
dNTP	Amersham	500 µM
Primer Forward	Ceinge – Biotecnologie avanzate scarl	300 nM
Primer Reverse	Ceinge – Biotecnologie avanzate scarl	300 nM
Enzyme mix	Roche	0.75 µL

Le PCR sono state eseguite su Thermal cycler 9700 e 2720 (Applied Biosystems) con il seguente protocollo:

Temperatura	Tempo	Cicli
94 °C	2 minuti	1
94 °C	10 secondi	} 9
55 °C	30 secondi	
68 °C	4 minuti	
94 °C	10 secondi	} 31
55 °C	30 secondi	
68 °C	4 minuti + 20 secondi ∇ ciclo	
68 °C	7 minuti	1

Con la Long-PCR analysis, oltre al paziente affetto, sono stati testati i genitori ed un soggetto di controllo non affetto dalla malattia. Il prodotto di amplificazione è stato controllato mediante elettroforesi su gel d'agarosio 0,8% in tampone TBE 1x, colorazione con bromuro d'etidio e utilizzando, come marcatore di riferimento, il DNA Marker III (Roche).

La Walking Primer Analysis per identificare i punti di rottura è stata eseguita su entrambi i filamenti e su entrambe le direzioni utilizzando il sequenziamento automatico. La ricerca di elementi di sequenza ripetuti è stata effettuata utilizzando il web service RepeatMasker.

2.2.5 Analisi Filogenetica

Per saggiare il grado di conservazione filogenetica degli amminoacidi mutati di DRA, abbiamo recuperato dalla banca dati del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) le sequenze di 10 ortologi. In particolare, abbiamo utilizzato le sequenze di *Homo Sapiens* (accession number: NP_000102), *Pan Troglodytes* (a.n.: XP_527858), *Rattus Norvegicus* (a.n.: AAK83221), *Mus Musculus* (a.n.: NP_067328), *Canis Familiaris* (a.n.: XP_540380), *Oryctolagus Cuniculus* (a.n.: AAK00897), *Gallus Gallus* (a.n.: XP_415945), *Xenopus Laevis* (a.n.: AAP37475), *Caenorhabditis Elegans* (a.n.: NP_491138) e *Drosophila Melanogaster* (a.n.: NP_651810). Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma MegAlign 4.00 (DNASTAR Inc.) che si avvale dell'algoritmo Clustal V (Higgins and Sharp, 1989).

2.2.6 Predizione delle variazioni indotte

Per avere un'idea delle variazioni strutturali indotte dalla variazioni riscontrate, abbiamo utilizzato il programma Protean 4.00 (DNASTAR Inc.)

2.2.7 Terapia sperimentale con butirato

Il paziente n°1 è stato sottoposto ad una nuova terapia sperimentale a base di butirato. Durante tutto lo studio, il paziente ha continuato con la supplementazione orale di NaCl/KCl e ha seguito una dieta libera. Il butirato è stato somministrato utilizzando una formulazione orale in capsule gastro-resistenti, disponibile in commercio (Butyric acid complex; Natur Bio Care, Legnago, Italy). La formulazione

orale contiene butirrato di calcio e magnesio. La nuova terapia è incominciata con la somministrazione di 50 mg/kg/die di butirrato, somministrato in due dosi, per la durata di una settimana. Successivamente, sono stati effettuati aumenti di 25 mg/kg/die. Per ogni settimana di terapia, ma anche nella settimana precedente l'inizio della terapia, sono stati misurati quotidianamente: il volume delle feci, il numero degli stimoli evacuatori, la concentrazione degli elettroliti nel siero e nelle feci. Una volta raggiunta la posologia ottimale, la somministrazione è continuata per un anno, allo scopo di valutare eventuali effetti collaterali.

3. Risultati

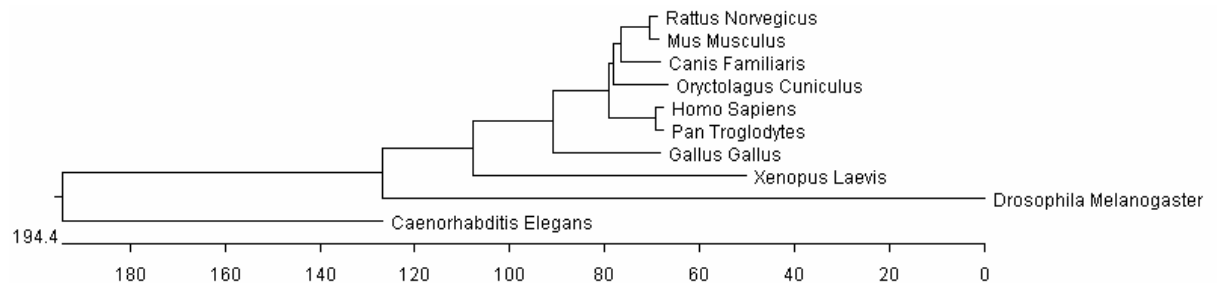
3.1 Analisi molecolare del gene SLC26A3

La Tabella 3 mostra le percentuali d'identità (matrice triangolare superiore) e divergenza (matrice triangolare inferiore) tra i 10 ortologhi, calcolati dal software MegAlign. Lo stesso software genera l'albero filogenetico mostrato in Figura 6.

Tabella 3: Percentuali d'identità e divergenza tra gli ortologhi della proteina DRA in 10 specie diverse.

		% IDENTITÀ										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1			96.2	80.7	80.2	78.7	78.2	63.3	40.6	20.5	16.3	Homo Sapiens
2	3.1			80.4	79.9	79.0	78.1	62.9	41.2	20.6	17.5	Pan Troglodytes
3	21.4	21.6			96.3	84.1	81.5	64.9	41.5	20.7	14.3	Rattus Norvegicus
4	21.6	21.8	3.8			83.9	81.4	65.0	41.3	20.6	14.6	Mus Musculus
5	22.5	22.8	15.7	16.2			79.7	66.7	37.2	19.8	17.5	Canis Familiaris
6	24.7	24.5	20.5	20.7	21.7			65.0	40.2	20.3	17.2	Oryctolagus Cuniculus
7	47.8	48.8	45.7	45.4	41.9	44.9			40.8	21.8	14.9	Gallus Gallus
8	95.7	94.9	95.8	96.3	100.0	101.8	99.5			16.6	16.9	Xenopus Laevis
9	192.5	195.1	190.5	191.8	195.0	195.7	189.2	222.0			14.6	Caenorhabditis Elegans
10	184.4	180.0	191.0	194.2	189.1	186.7	185.8	193.6	262.0			Drosophila Melanogaster
		% DIVERGENZA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

Figura 6: Albero filogenetico della proteina DRA generato in base alle sequenze dei 10 ortologhi.



L'analisi di sequenza dell'intera regione codificante del gene SLC26A3 nel paziente n°1 ha mostrato due mutazioni missense, non precedentemente descritte, in eterozigosi composta. La prima mutazione è la trasversione c.1484A>C nell'esone 13, che porta alla sostituzione della Glutamina 495 con una Istidina (Figura 7, pannello A). La mutazione è presente, in eterozigosi, nel padre del soggetto. L'altra mutazione è la trasversione c.1640C>A nell'esone 15, che porta alla sostituzione dell'Alanina 547 con un Glutammato (Figura 7, pannello B). La mutazione è presente, in eterozigosi, nella mamma del soggetto. Nessuna altra variante è stata identificata negli esoni del gene SLC26A3 del paziente. Dall'analisi DHPLC (Figura 7, pannello A e B) entrambe le mutazioni sono risultate assenti nei 100 soggetti sani di controllo testati. L'analisi filogenetica mostra che la Glutamina 495 è conservata in 5 specie su 10, mentre l'Alanina 547 è conservata in 7 specie su 10 (Tabella 4).

Figura 7: Elettroferogrammi e Cromatogrammi DHPLC delle due mutazioni identificate nel paziente n° 1. Il pannello A mostra la mutazione c.1484A>C; il pannello B mostra la mutazione c.1640C>A.

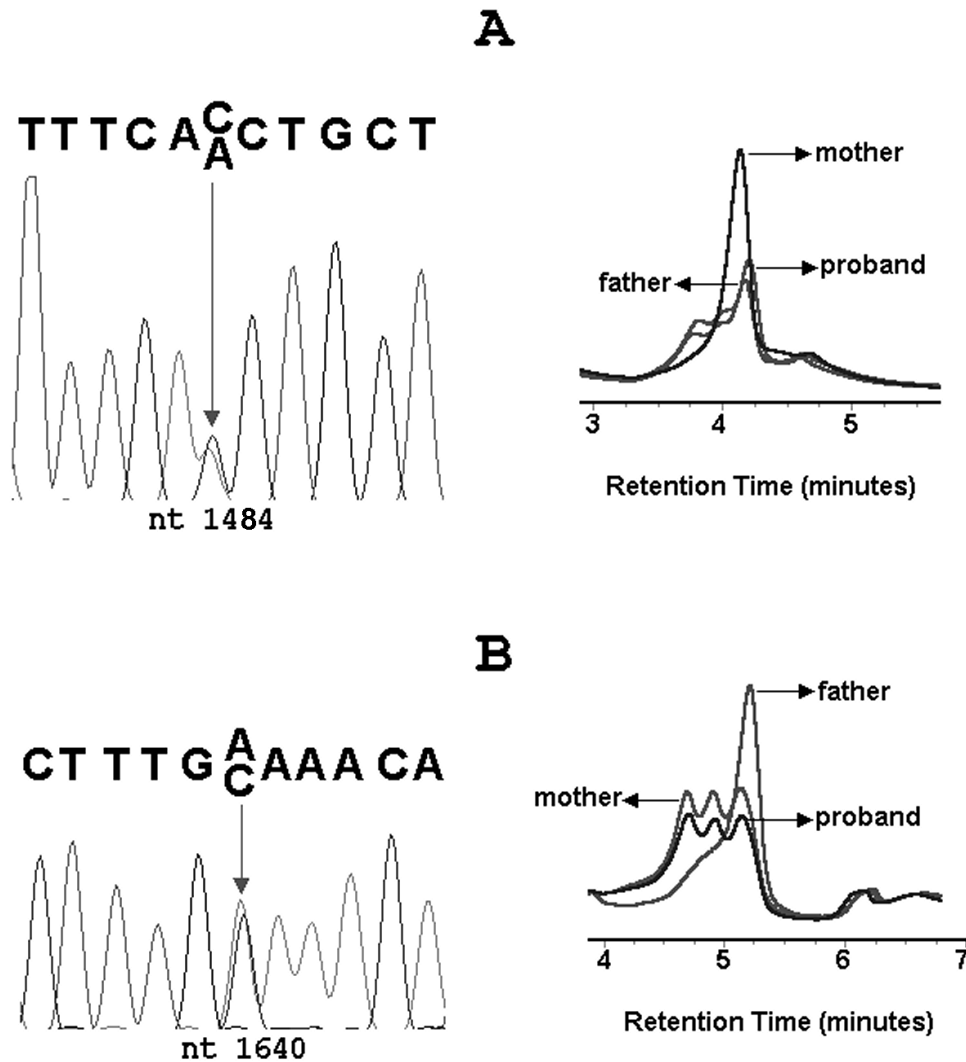


Tabella 4: Analisi filogenetica degli amminoacidi Q495 e A547.

Specie	Sequenza	
Homo Sapiens	LGLAASVAF Q LLTIVFRTQF	FRCPSPIYF A NIGFFRRKLI
Pan Troglodytes	LGLAASVAF Q LLTIVFRTQF	FRCPSPIYF A NIGFFRQKLI
Rattus Norvegicus	LGLAASVAF Q LLTIVFRTQF	FRCPSPIYF A NIGFFRQKLI
Mus Musculus	LGLAASVAF Q LLTIVFRTQF	FRCPSPIYF A NIGFFRQKLI
Canis Familiaris	LGLAASVAF Q LLTIVFRTQF	FRCPSPIYF A NIHFFKQKLI
Oryctolagus Cuniculus	LGLAASVAF E LLTIVFRTQF	FRCPAPIYF A NIGFFKQKLI
Gallus Gallus	IGLATAVAF E LLTVVIRSQI	FKCSSPIFF A NIIEFFKEKLI
Xenopus Laevis	LGLLCGLMF G LFTVILRIQF	IRFSSGIFY G NVDSLKNGIK
Caenorhabditis Elegans	LRNRAK Q CF R -----PAHW	FRFDSPYF G NSEMFVRKIH
Drosophila Melanogaster	IGIMVAIGV N LLFILYYAAR	-RC---LIF P SVEFVRNMVL

Dall'analisi effettuata con Protean, si nota che la sostituzione con Istidina non altera la probabilità che la zona si strutturi in α -elica, ma altera notevolmente la distribuzione di carica (Tabella 5).

Tabella 5: Alterazione della distribuzione di carica indotta dalla mutazione p.Q495H

Residuo	Alpha Regions	Densità di carica	Residuo	Alpha Regions	Densità di carica
Val492	A		Val492	A	
Ala493	A		Ala493	A	
Phe494	A		Phe494	A	
Gln495	A		His495	A	
Leu496	A		Leu496	A	
Leu497			Leu497	A	
Thr498			Thr498		+
Ile499			Ile499		+
Val500		+	Val500		+
Phe501		+	Phe501		+
Arg502		+	Arg502		+
Thr503		+	Thr503		+
Gln504		+	Gln504		+
Phe505		+	Phe505		+
Pro506		+	Pro506		+
Lys507		+	Lys507		+
Cys508		+	Cys508		+
Ser509		+	Ser509		+
Thr510			Thr510		+
Leu511			Leu511		+
Ala512			Ala512		+
Asn513			Asn513		+
Ile514		+	Ile514		+
Gly515		+	Gly515		+
Arg516		+	Arg516		+

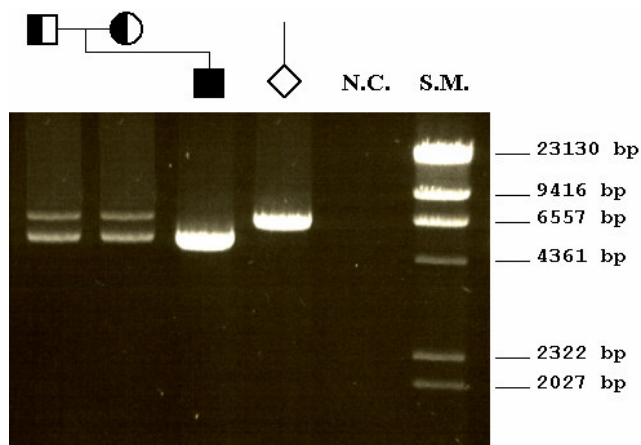
L'analisi effettuata con Protean sulla mutazione p.A547 ha fornito risultati analoghi:

Tabella 6: Variazioni indotte dalla mutazione p.A547E

Residuo	Surface Probability	Densità di carica	Residuo	Surface Probability	Densità di carica
Cys540	0,67	+	Cys540	0,67	+
Pro541	0,54	+	Pro541	0,54	+
Ser542	0,43		Ser542	0,43	+
Pro543	0,70		Pro543	0,70	
Ile544	0,46		Ile544	0,78	-
Tyr545	0,55		Tyr545	0,94	-
Phe546	0,25		Phe546	0,43	-
Ala547	0,35		Glu547	0,60	-
Asn548	0,19		Asn548	0,33	-
Ile549	0,19		Ile549	0,33	
Gly550	0,38		Gly550	0,38	+
Phe551	0,46	+	Phe551	0,46	+
Phe552	0,30	+	Phe552	1,30	+
Arg553	1,09	+	Arg553	1,09	+
Arg554	0,88	+	Arg554	0,88	+
Lys555	1,70	+	Lys555	1,70	+
Leu556	0,88	+	Leu556	0,88	+
Ile557	0,33		Ile557	0,33	+
Asp558	0,16	-	Asp558	0,16	+
Ala559	0,17	-	Ala559	0,17	
Val560	0,33	-	Val560	0,33	-
Gly561	0,31		Gly561	0,31	-
Phe562	0,25		Phe562	0,25	
Ser563	0,66		Ser563	0,66	+
Pro564	0,47	+	Pro564	0,47	+
Leu565	0,44	+	Leu565	0,44	+

L'analisi di sequenza della regione codificante del gene SLC26A3 nel paziente n°2 non ha mostrato alcuna variante; comunque, l'esone 18 non mostra alcun segnale di amplificazione, facendo sospettare una delezione in omozigosi. Per escludere una mutazione puntiforme nei siti d'attacco dei primers, sono stati sintetizzati dei primers più esterni, ma anche in questo caso l'amplificazione fallisce. La riamplicazione dei campioni di DNA, ottenuti dal paziente e dai genitori, utilizzando la tecnica della Long-PCR (Figura 8), conferma la presenza di una macrodelezione in omozigosi nel paziente, ed in eterozigosi nei genitori (cugini di primo grado). La macrodelezione dell'esone 18 non è stata precedentemente descritta. La Walking Primer analysis ha evidenziato entrambi i punti di rottura: il primo punto è localizzato 151 basi prima dell'inizio dell'esone 18 (c.2008-151); il secondo si trova 1546 basi dopo la fine dell'esone (c.2061+1546), in una sequenza SINE/ALU (PB1 repeat). Considerando che l'esone 18 è di 55 bp, la grandezza della delezione è di 1752 bp. La delezione coinvolge anche tre sequenze LINE (L2 repeat).

Figura 8: Long PCR dell'esone 18 nel paziente n°2 (lane 3) e nei suoi genitori (lane 1 e 2). Nella lane 4 è presente un amplificato ottenuto da un soggetto di controllo sano, nella lane 5 un controllo negativo (acqua) e nella lane 6 il marcatore di peso molecolare.



L'analisi di sequenza della regione codificante del gene SLC26A3 nel paziente n°3 ha mostrato diverse varianti geniche, tutte in omozigosi e mai descritte precedentemente: la transizione c.1529C>T nell'esone 14, che porta alla sostituzione della Treonina 510 con una Metionina (p.T510M) e la transizione c.1960T>C nell'esone 15, che porta alla sostituzione della Serina 654 con una Prolina (p.S654P). Inoltre, sono state identificate due varianti introniche: c.1234-11dupT nell'introne 10 e c.1515-79delTGinsAAACTAACC AAA nell'introne 13. Tutte le varianti sono presenti in eterozigosi nei genitori. L'analisi filogenetica mostra che la Treonina 510 è conservata in 8 specie su 10 ed è vicina ad una Leucina conservata in tutte le specie; la Serina 654 è conservata in 6 specie su 10 (Tabella 7).

Tabella 7: Analisi filogenetica degli amminoacidi T510 e S654.

Specie	Sequenza	
Homo Sapiens	FRTQFPKCSTLANIGRTNIY	SLHSLILDFSAVSFLDVSSV
Pan Troglodytes	FRTQFPKCSTLANIGRTNIY	SLHSLILDFSAVSFLDVSSM
Rattus Norvegicus	FRTQFPKCSTLANIGRTNIY	SLHSLILDFSAVSFLDISSM
Mus Musculus	FRTQFPKCSTLANIGRTNIY	SLHSLILDFSAVSFLDVSSM
Canis Familiaris	FRTQFPKCTTLANVGRSNIY	SLHSLILDFSAVSFLDVSSM
Oryctolagus Cuniculus	FRTQFPKCTTLANIGRSNIY	SLHSLILDFSAVSFLDVSSM
Gallus Gallus	IRSQIPSCSTLANVGRSNIY	DIHSIVLDFSAVSFLDFSAM
Xenopus Laevis	LRIQFPSCHSLGNLPGTEIY	FIHSIILDFGHVNFLDVVAV
Caenorhabditis Elegans	-PAHWADSSLLGRITGTNHY	LDEK-----HAEPE
Drosophila Melanogaster	YYAARPK-VTLEQLETQQGI	-----

L'analisi con Protean ha fornito i seguenti risultati:

Tabella 8: Variazioni indotte dalla mutazione p.T510M

Residuo	Idrofilicità	Surf. Prob.	Distr. di carica	Residuo	Idrofilicità	Surf. Prob.	Distr. di carica
Pro506	1,16	0,76	+	Pro506	0,87	0,76	+
Lys507	0,23	0,64	+	Lys507	-0,06	0,44	+
Cys508	-0,04	0,61	+	Cys508	-0,33	0,42	+
Ser509	-0,04	0,4	+	Ser509	-0,33	0,27	+
Thr510	-0,23	0,32		Met510	-0,52	0,22	
Leu511	-0,37	0,42		Leu511	-0,66	0,29	
Ala512	-0,3	0,31		Ala512	-0,59	0,21	
Asn513	0,06	0,42		Asn513	-0,23	0,42	
Ile514	0,36	0,73	+	Ile514	0,07	0,73	+
Gly515	-0,22	1,16	+	Gly515	-0,22	1,16	+
Arg516	0,34	0,51	+	Arg516	0,34	0,51	+
Thr517	0,98	1,13	+	Thr517	0,98	1,13	+

Tabella 9: Variazioni indotte dalla mutazione p.S654P

Resid.	β Reg.	Antig. Ind.	Idrofil.	Surf. Prob.	Resid.	β Reg.	Antig. Ind.	Idrofil.	Surf. Prob.
Leu649	B	-6	-116	33	Leu649	B	-6	-116	33
Ile650	B	-6	-116	21	Ile650	B	-6	-107	21
Leu651	B	-6	-93	21	Leu651	B	-6	-84	24
Asp652	B	-6	-176	26	Asp652	B	-6	-167	3
Phe653	B	-6	-176	27	Phe653		-6	-167	32
Ser654	B	-3	-164	45	Pro654		-6	-156	52
Ala655	B	-6	-157	23	Ala655	B	-6	-148	27
Val656	B	-6	-76	22	Val656	B	-6	-67	25
Ser657	B	-3	-161	27	Ser657	B	-6	-152	27
Phe658	B	-6	-121	2	Phe658	B	-6	-112	2
Leu659	B	-6	-121	36	Leu659	B	-6	-121	36

L'analisi di sequenza della regione codificante del gene SLC26A3 nel paziente n°4 ha mostrato due mutazioni, non precedentemente descritte, in eterozigosi composta. La prima mutazione è la c.614delT nell'esone 6, che provoca un frameshift con terminazione precoce della traduzione (p.L205RfsX28). La seconda mutazione è la transizione c.1312T>C nell'esone 12, che porta alla sostituzione della Serina 438 con una Prolina (p.S438P). In questo caso, non è stato possibile ricercare la presenza delle mutazioni nei genitori, i cui campioni di sangue non ci sono pervenuti. L'analisi filogenetica mostra che la Serina 438 è conservata in 8 specie su 10 e si trova in un tratto particolarmente conservato (Tabella 10).

Tabella 10: Analisi filogenetica dell'amminoacido S438.

Specie	Sequenza
Homo Sapiens	IGFLLAPLQK S VLAALALGNLK
Pan Troglodytes	IGFLLAPLQK S VLAALALGNLK
Rattus Norvegicus	IGFLLQPLQK S VLAALALGNLK
Mus Musculus	IGFLLQPLQK S VLAALALGNLK
Canis Familiaris	LGFLLEPLQK S VLAALALGNLK
Oryctolagus Cuniculus	IGFLLEPLQK S VLSALALGNLK
Gallus Gallus	IGFLLAPLQK S VLASLALGNLK
Xenopus Laevis	LGQFLQPLQK S VLAIVISNLK
Caenorhabditis Elegans	SDFHLLRVEE I EFCGL--CELR
Drosophila Melanogaster	LTEYIAFIPK A VLAIIISAVI

L'analisi con Protean ha mosrato i seguenti risultati:

Tabella 11: Variazioni indotte dalla mutazione p.S438P

Residuo	Alpha Regions	Idrofil.	Surf. Prob.	Residuo	Alpha Regions	Idrofil.	Surf. Prob.
Ala433	A	-73	35	Ala433		-73	35
Pro434	A	-69	84	Pro434	A	-6	84
Leu435	A	-84	137	Leu435	A	-76	158
Gln436	A	-84	101	Gln436	A	-76	116
Lys437	A	-62	54	Lys437	A	-53	62
Ser438	A	-62	66	Pro438	A	-53	76
Val439	A	-122	38	Val439		-113	44
Leu440	A	-1	16	Leu440	A	-91	18
Ala441	A	-181	12	Ala441	A	-172	12
Ala442	A	-22	13	Ala442	A	-211	13
Leu443	A	-19	16	Leu443	A	-19	16

L'analisi di sequenza della regione codificante del gene SLC26A3 nei pazienti n°5 e 6 ha mostrato la presenza della transversione c.559G>T, che porta alla formazione di un codone di stop al posto della Glicina 187 (p.G187X), in omozigosi. La mutazione è portata in eterozigosi dai genitori (cugini di primo grado). La mutazione è descritta come frequente nella popolazione di origine araba (Kagalwalla, 1994; Badawi et al., 1998)

L'analisi di sequenza della regione codificante del gene SLC26A3 nel paziente n°7 ha mostrato la mutazione c.1758delG, nell'esone 16, precedentemente non descritta. La mutazione provoca un frameshift con terminazione precoce della traduzione (p.L586FfsX4). La mutazione è portata in eterozigosi in entrambi i genitori (cugini di primo grado).

3.2 Valutazione della terapia sperimentale con butirrato

Durante la terapia con butirrato somministrata al paziente n°1, si è osservato una progressiva riduzione a valori normali sia del numero di stimoli, sia nel volume fecale (Figura 9). Si è osservata anche un miglioramento nel materiale fecale che non appariva più liquido, come nella settimana precedente alla terapia, ma formato. Alla dose di 100 mg/kg/die si è osservata una virtuale normalizzazione, per cui non è stato necessario un ulteriore incremento nella dose somministrata. Come mostrato nella Figura 10 si è ottenuta anche una riduzione delle perdite elettrolitiche fecali. I valori degli elettroliti nel siero si sono normalizzati fin dalla prima settimana di terapia, alla dose di 50 mg/kg/die (dati non mostrati). Successivamente alle prime tre settimane di terapia, il paziente ha assunto la dose di 100 mg/kg/die per un anno e non è stato riportato alcun effetto collaterale. La concentrazione degli elettroliti nel siero è rimasta costantemente all'interno degli intervalli fisiologici e non si sono registrati episodi di disidratazione. Inoltre, per la prima volta, il paziente ha potuto frequentare regolarmente la scuola per un intero anno scolastico.

Figura 9: Numero di stimoli e volume fecale (mL) in funzione della somministrazione di butirrato (Tratta da Berni Canani et al., 2004)

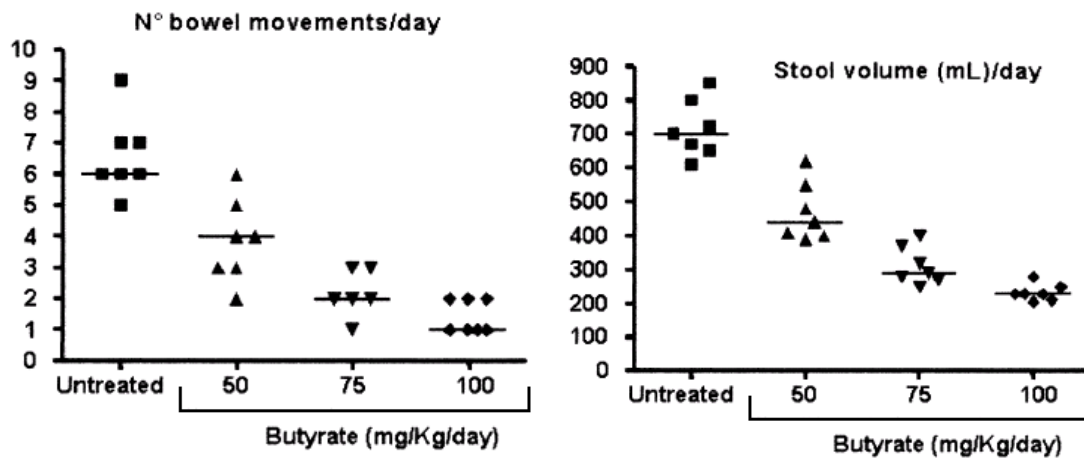
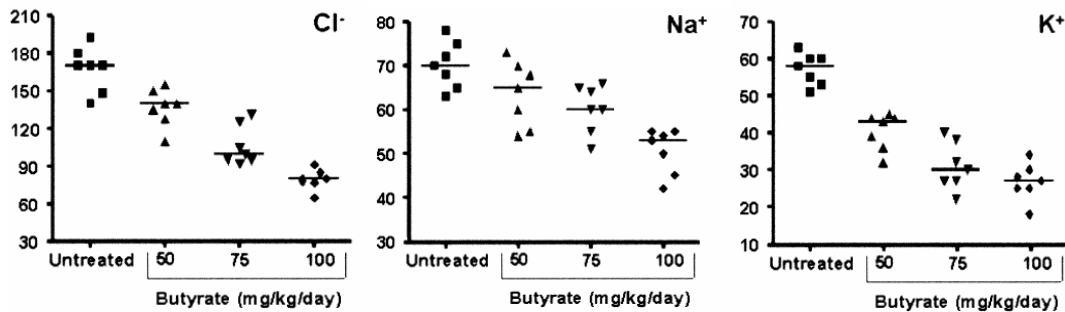


Figura 10: Concentrazione degli elettroliti fecali (mMol) in funzione della somministrazione di butirrato (Tratta da Berni Canani et al., 2004)



4. Discussione

Il paziente n°1 è portatore di due varianti, non precedentemente descritte, in eterozigosi composita: la c.1484A>C (p.Q495H) e la c.1640C>A (p.A547E). Entrambe le varianti identificate cadono nel tratto hotspot caratteristico di molti casi di CLD (Mäkelä et al., 2002). L'assenza di entrambe le varianti in 200 alleli di soggetti normali e non imparentati tra di loro, il grado di conservazione filogenetica di entrambi gli amminoacidi (Tabella 4) e l'assenza di altre variazioni nel gene supportano fortemente l'ipotesi che le due varianti siano causative di malattia. In accordo con il modello a 12 α -eliche transmembrinarie, la Glutamina 495, un amminoacido polare neutro, dovrebbe essere coinvolta nella formazione della dodicesima elica (da M474 a L497; Figura 2). Il tratto di proteina in cui si trova sembra essere filogeneticamente ben conservato (Tabella 4). La sua sostituzione con l'Istidina, che è un amminoacido polare basico, potrebbe alterare il core idrofobico ed impedire il corretto folding dell'elica, considerando anche la diversa distribuzione di carica introdotta dall'Istidina (Tabella 5). Inoltre, tra le mutazioni già descritte come causative di malattia c'è la p.L496R, che aggiungerebbe un'ulteriore prova della criticità del tratto in cui si trova la Glutamina 495. Anche la sostituzione dell'Alanina 547 con un Glutammato coinvolge due amminoacidi dalle caratteristiche chimico-fisiche molto differenti. L'Alanina 547 è il secondo amminoacido del primo β -sheet del dominio "STAS-like" (Figura 4). Secondo la classificazione di Chou e Fasman mentre l'Alanina è un debole formatore di β -sheet, il Glutammato è, invece, un forte interruttore. Come nel caso precedente, abbiamo l'induzione di una diversa distribuzione di carica. L'Alanina è un amminoacido apolare alifatico, mentre il Glutammato è un amminoacido polare acido, carico negativamente, che altera notevolmente la distribuzione delle cariche e la possibilità che gli amminoacidi si estroflettano dal core idrofobico per andare sulla superficie. Probabilmente, il dominio "STAS-like" viene completamente destrutturato, abolendo la funzione di trasporto (Chernova et al., 2003; Gray, 2004; Ko et al., 2004). Anche in questo caso, ci sono forti probabilità che la variante p.A547E sia causativa di malattia. Il fenotipo del paziente n°1 mostra un fenotipo lieve, con una diagnosi fatta in età avanzata (11 anni), privo di una serie di elementi tipici della CLD come la ipoelettrolitemia, la disidratazione severa e l'alta bilirubinemia (Norio et al., 1971; Holmberg et al., 1977a; Holmberg, 1986). La nuova terapia somministrata al paziente apre nuovi scenari farmacologici per la CLD. I risultati mostrano un'effettiva up-regolazione dell'assorbimento ionico. Attraverso la riduzione della cronica deficienza di Cl^- e la contrazione del volume intravascolare, la terapia con butirrato potrebbe ridurre i rischi di una disidratazione severa ed impedire il danno renale (Holmberg et al., 1977b). È stato dimostrato che gli SCAFs sono assorbiti lungo tutto il tratto intestinale, inducendo assorbimento di ioni e acqua (Schmitt et al., 1976; Kunzelmann and Mall, 2002). L'effetto terapeutico osservato nel paziente potrebbe essere correlata, almeno in parte, alla stimolazione dello scambiatore Cl^- /butirrato (Sellin and De Soigne, 1998; Binder and Mehta, 1989; Kunzelmann and Mall, 2002). In aggiunta, è noto che il butirrato inibisce, in maniera dose specifica, sia la secrezione basale di Cl^- , sia la secrezione AMP mediata. Infine, la terapia ha costi molto bassi, non ha effetti collaterali e non altera altri parametri rilevabili con le routinarie analisi di laboratorio.

Il paziente n°2 è omozigote per una macrodelezione di 1752 bp, che elimina l'esone 18 (55 bp) creando un frameshift con terminazione precoce della traduzione (p.I670MfsX17). In letteratura è riportato un solo altro caso di macrodelezione: due fratelli giapponesi affetti da CLD e portatori di una macrodelezione di 3502 bp che elimina gli esoni 7 e 8 (Höglund et al., 2001b). Nel nostro caso, così come nei fratelli giapponesi, uno dei breakpoint (c.2061+1546) si trova all'interno di una sequenza ALU. La frequenza di macrodelezione potrebbe essere sottostimata perché le attuali tecniche di gene-scanning, compreso il sequenziamento diretto, non permettono di evidenziare macrodelezioni in eterozigosi. È quindi possibile che un certo numero di cromosomi CLD con mutazioni non note siano portatori di macrodelezioni in eterozigosi, come riportato per altre malattie genetiche (Höglund et al., 1998a, 1998b; Diebold et al., 2005). La nuova delezione coinvolge nucleotidi che codificano per il dominio "STAS-like" e per il dominio PDZ e quindi la funzionalità residua della proteina dovrebbe essere nulla. Anche il paziente n°2 sembra essere affetto da una forma lieve, diagnosticata all'età di 5 anni, a dispetto della severità della mutazione riportata. La discordanza tra genotipo severo e fenotipo clinico lieve osservata in questi due pazienti, nonché la risposta alla terapia con butirrato del paziente n°1, lascia intravedere la possibilità che fattori ambientali come la dieta o geni depistatici, ereditati indipendentemente dal gene malattia, possano modulare il fenotipo CLD. Questo è in accordo anche con un lavoro pubblicato in cui si descrive il fenotipo discordante in una coppia di fratelli affetti da CLD (Höglund et al., 2001a).

Il paziente n°3 è portatore di un genotipo molto complesso. Innanzitutto, egli mostra due nuove varianti entrambe in omozigosi: c.1529C>T (p.T510M) e c.1960T>C (p.S654P). Entrambe le varianti coinvolgono amminoacidi conservati che cadono in tratti altrettanto ben conservati (Tabella 7). Inoltre, la seconda variante coinvolge un amminoacido del dominio "STAS-Like". Noi pensiamo che la seconda sia responsabile del fenotipo CLD, poiché mutazioni che colpiscono il dominio "STAS-like" aboliscono la funzione di trasporto (Chernova et al., 2003; Gray, 2004; Ko et al., 2004). La mutazione c.1960T>C si trova in una sequenza palindromica (c.GACTTTTCAG -> c.GACTTTCCAG), che potrebbe essere più suscettibile ad eventi mutazionali. La Serina 654 è il primo amminoacido del "conserved loop" del dominio "STAS-like" (Figura 4), una zona evidentemente critica per la funzione di trasporto. Dalla classificazione di Chou e Fasman sappiamo che mentre la Serina è un formatore indifferente per i β -sheet, la Prolina, invece, è un forte interruttore. Dall'analisi con Protean (Tabella 9) non si evincono cambi sensibili della distribuzione di carica o della idrofobicità del tratto. Di conseguenza, l'unica ipotesi che possiamo fare è che la Prolina non consenta il corretto folding del loop conservato. Per quanto riguarda la variante c.1529T>C, essa si ritrova nella regione hotspot descritta in letteratura e coinvolge un dinucleotide CG (Mäkelä et al., 2002). L'amminoacido colpito, la Treonina 510, dovrebbe però risiedere nella zona di giunzione tra il dominio ST ed il dominio "STAS-like". Inoltre, considerando che tre transizioni su quattro di dinucleotidi CG nella regione hotspot non sono causativi di malattia, è fortemente probabile che la variante c.1529T>C sia un polimorfismo. L'analisi con Protean (Tabella 8) non mostra alcunché di anormale se non una piccola diversità locale nella probabilità di distribuzione sulla superficie della proteina. Abbiamo escluso la presenza di entrambe le varianti in 200 alleli da soggetti normali provenienti dal sud Italia, ma, per escludere che le varianti possano essere polimorfismi, andrebbe analizzato un largo numero di alleli provenienti da una popolazione dello stesso gruppo etnico di appartenenza del paziente 3. In aggiunta a queste varianti, il paziente è omozigote per due nuove varianti introniche. La

c.1234-11dupT modifica una sequenza di sette T e potrebbe inficiare lo splicing dell'hRNA, come accade per l'allele poly T nella Fibrosi Cistica o per la mutazione c.1066-11G>A nella Fenilchetonuria (Pagani et al., 2000; Mirisola et al., 2001). Bisogna anche dire che, almeno per quanto accade nella Fibrosi Cistica, l'allele più frequente è quello 7T; l'espansione dell'allele a 9T non provoca alterazione dello splicing, mentre la contrazione dell'allele a 5T provoca l'exon skipping dell'esone 9. È verosimile credere che il meccanismo sia lo stesso e che, anche in questo caso, si tratti di un polimorfismo. La seconda variante intronica è la c.1515-79delTGinsAAACTAACCAAA, una variante molto complessa che coinvolge una sequenza palindromica. La ricerca su BLAST e MEGABLAST della sequenza inserita non ha dato alcun risultato. Tutte e quattro le varianti sono presenti, in eterozigosi, nei genitori che non sono consanguinei. I genitori appartengono a due gruppi etnici differenti: la madre è nativa del centro Zimbabwe e appartiene all'etnia Gushu ngo, mentre il padre è nativo del nord Zimbabwe e appartiene all'etnia Shamza. Questo apre una forte possibilità che le varianti descritte possano essere frequenti tra differenti gruppi etnici del sud Africa, a causa di qualche effetto protettore non noto. Inoltre, il fatto che i genitori appartengano a due differenti gruppi etnici sembra escludere un effetto fondatore. La mancanza di notizie storiche, però, non ci consente di concludere che i due gruppi siano effettivamente due gruppi distinti e isolati, senza un comune antecore in cui possano essere insorte le mutazioni.

L'analisi molecolare della paziente n°4, nata da genitori non consanguinei degli Stati Uniti (la mamma è di origini portoricane e il papà è di origini inglesi), ha mostrato un eterozigosi composta di due nuove mutazioni: una è una delezione puntiforme che induce frameshift e terminazione precoce della traduzione (c.614delT), ed è sicuramente causativa di malattia; la seconda è una mutazione missense (c.1312T>C, p.S438P). La seconda mutazione cade nel tratto hotspot descritto in letteratura (Mäkelä et al., 2002) e coinvolge lo stesso codone di un polimorfismo già descritto (c.1314C>T, p.S438S). L'analisi DHPLC non ha mostrato la presenza della mutazione negli alleli provenienti da soggetti sani del sud Italia. L'analisi filigenetica mostra un alto grado di conservazione (Tabella 10). Stando al modello a 12 α -eliche, la Serina 438 dovrebbe essere il primo amminoacido dell'undicesima elica e la sostituzione con la Prolina sicuramente ne impedisce il folding (la Prolina è un forte interruttore delle α -eliche). Dall'analisi con Protean (Tabella 11), sembra che la mutazione induca anche un cambio di idrofobicità negli amminoacidi a valle. Il genotipo putativamente "severo" concorda con il fenotipo osservato nella paziente, diagnosticata a pochi mesi di vita.

I pazienti 5 e 6, di origine marocchina, sono portatori della mutazione p.G187X, ritrovata in oltre il 90% degli alleli di origine araba (Kagalwalla, 1994; Badawi et al., 1998). Anche in questo caso, come riportato in letteratura, siamo in presenza di genitori consanguinei (cugini di primo grado) e l'alto tasso di endogamia favorisce la propagazione dell'allele malattia.

La paziente n°6, anch'essa di origine marocchina e con genitori consanguinei, ha mostrato la presenza di una delezione puntiforme in omozigosi (c.1758delG). La delezione cade in corrispondenza di un dinucleotide CG e genera quasi immediatamente un codone di stop (p.L586FfsX4) che interrompe la proteina all'altezza del loop variabile del dominio "STAS-like". La mutazione si ritrova in eterozigosi nei due genitori.

La prevalenza della CLD è probabilmente sottostimata perché la diarrea è presente in una miriade di altre malattie, malattie congenite incluse (Mäkelä et al.

2002). Inoltre, un certo numero di pazienti CLD con diarrea acuta muoiono senza una diagnosi nei primi mesi di vita (Höglund et al. 2001b; Mäkelä et al. 2002) e questo potrebbe essere particolarmente vero in sud Africa. Per esempio, in Polonia c'è un'alta incidenza di CLD, ma la mutazione più frequente copre solo il 50% degli alleli alterati (Mäkelä et al. 2002); di conseguenza, l'effetto fondatore può giustificare solo una parte dei casi di CLD. Presumibilmente, i medici polacchi sono più attenti ai casi di CLD e quindi solo un piccolo numero di pazienti sfugge alla diagnosi. Nei nostri casi, alcuni pazienti sono stati diagnosticati tardi e, nella maggior parte dei casi, sono state sospettate altre malattie prima di arrivare ad una diagnosi di CLD. Il sequenziamento automatico del gene o il DHPLC possono essere usati per l'analisi dei carrier, per studiare la prevalenza della malattia in diversi gruppi etnici e forniscono un mezzo rapido e a basso costo per studiare pazienti con diarrea cronica che potrebbe essere dovuta a CLD. Questo è particolarmente vero considerando che la CLD potrebbe essere effettivamente trattata con una terapia a basso costo come recentemente riportato dal nostro gruppo (Berni Canani et al., 2004).

Per quanto riguarda le prospettive future, ci sono tre obiettivi primari da raggiungere:

- 1) aumentare la coorte di pazienti da sottoporre ad analisi molecolare per stabilire con maggiore precisione la correlazione genotipo-fenotipo;
- 2) sperimentare la terapia con butirato su un numero più ampio di pazienti CLD, per stabilire se tale cura è effettivamente risolutiva in tutti i casi di CLD;
- 3) incominciare a testare i pazienti con Fibrosi Cistica, sia quelli con forma classica, sia quelli con forma atipica, alla ricerca di eventuali anomalie nei geni della famiglia SLC26 che codificano per proteine interattrici di CFTR.

5. Bibliografia

Aichbichler B.W., Zerr C.H., Santa Ana C.A., Porter J.L., Fordtran J.S. Proton-pump inhibition of gastric chloride secretion in congenital chloridorrhea. *N Engl J Med.* 1997; 336:106–109.

Alam N.H., Meier R., Sarkar S.A., Bardhan P.K., Fuchs G.J., Schneider H., Mahalanabis D., Gyr K. International Center for Diarrhoeal Disease Research. Efficacy of a soluble fiber supplemented oral rehydration solution in the treatment of acute non-cholera diarrhea in children. *Gastroenterology.* 1997; 112: A2.

Alam N.H., Ashraf H. Treatment of infectious diarrhea in children. *Pediatr Drugs.* 2003; 5: 151–165.

Alper S.L. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol.* 1991; 53: 549-64.

Alper S.L. Rossmann H., Wilhelm S., Stuart-Tilley A.K., Shmukler B.E., Seidler U. Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am J Physiol.* 1999; 277: G321-332.

Badawi M.H., Zaki M., Ismail E.A., Majid Molla A. Congenital chloride diarrhoea in Kuwait: a clinical reappraisal. *J Trop Pediatr.* 1998; 44: 296-299.

Bairoch A., Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence bank and its new supplement TREMBL. *Nucl Acids Res.* 1996; 24: 21–25.
Available from: <http://expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html>.

Berni Canani R., Terrin G., Cirillo P., Castaldo G., Salvatore F., Cardillo G., Coruzzo A., Troncone R. Butyrate as an effective treatment of congenital chloride diarrhea. *Gastroenterology.* 2004;127:630-634.

Binder H.J., Mehta P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 989–996.

Bissig M., Hagenbuch B., Stieger B., Koller T., Meier P.J. Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 3017–3021.

Bookstein C., Xie Y., Rabenau K., Musch M.W., McSwine R.L., Rao M.C., Chang E.B. Tissue distribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE2 and NHE4 in rat intestine and kidney. *Am J Physiol.* 1997; 273: C1496-C1505.

Boron W.F. Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Annu Rev Physiol.* 1986; 48: 377-388.

Boyarsky G., Ganz M.B., Cragoe E.J. Jr., Boron W.F. Intracellular-pH dependence of Na-H exchange and acid loading in quiescent and arginine vasopressin-activated mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 5921-5924.

- Brocklehurst J.R., Walker A.C. Cholestyramine in treatment of congenital chloride diarrhoea. *Med J Aust.* 1978; 1: 504–505.
- Byeon M.K., Westerman M.A., Maroulakou I.G., Henderson K.W., Suster S., Zhang X.K., Papas T.S., Vesely J., Willingham M.C., Green J.E., Schweinfest C.W. The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene* 1996; 12: 387–396.
- Charney A.N., Donowitz M. Functional significance of intestinal Na⁺-K⁺-ATPase: in vivo ouabain inhibition. *Am J Physiol.* 1978; 234; E629-E636.
- Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K., Lee M.G., Thomas P.J., Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature.* 2001; 410: 94-97.
- Chernova M.N., Jiang L., Shmukler B.E., Schweinfest C.W., Blanco P., Freedman S.D., Stewart A.K., Alper S.L. Acute Regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 2003; 549: 3-19
- Clark E.B., Vanderhoof J.A. Effect of acetazolamide on electrolyte balance in congenital chloridorrhea. *J Pediatr.* 1997; 91: 148–149.
- Counillon L., Pouyssegur J.: The expanding family of eucaryotic Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *J Biol Chem.* 2000; 275: 1-4.
- Darrow D.C. Congenital alkalosis with diarrhea. *J Pediatr.* 1945; 26: 519-532.
- Davis G.R., Morawski S.G., Santa Ana C.A., Fordtran JS. Evaluation of chloride/bicarbonate. Exchange in the human colon in vivo. *J Clin Invest.* 1983; 71: 201-207.
- de la Chapelle A. Disease gene mapping in isolated human population: the example of Finland. *J Med Genet.* 1993; 30: 857-865.
- Diebold R., Bartelt-Kirbach B., Evans D.G., Kaufmann D., Hanemann C.O. Sensitive detection of deletions of one or more exons in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene by multiplexed gene dosage polymerase chain reaction. *J Mol Diagn.* 2005; 7: 97-104.
- Ericson A.C., Spring K.R. Volume regulation by *Necturus* gallbladder: apical Na⁺-H⁺ and Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁽⁻⁾ exchange. *Am J Physiol.* 1982; 243: C146-150.
- Feldman G.M., Stephenson R.L. H⁺ and HCO₃⁻ flux across apical surface of rat distal colon. *Am J Physiol.* 1990; 259: C35-C40.
- Gamble J.L., Fahey K.R., Appleton J., McLachlan E. Congenital alkalosis with diarrhea. *J Pediatr.* 1945; 26: 509-518.

Genz A.K., von Engelhardt W., Busche R. Maintenance and regulation of the pH microclimate at the luminal surface of the distal colon of guinea-pig. *J Physiol (Lond)*. 1999; 517: 507-519.

Gray M.A. Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nature Cell Biology*. 2004; 6: 292-294.

Greeley T., Shumaker H., Wang Z., Schweinfest C.W., Soleimani M. Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 281: G1301-1308.

Haila S., Höglund P., Scherer S.W., Lee J.R., Kristo P., Coyle B., Trembath R., Holmberg C., de la Chapelle A., Kere J. Genomic structure of the human congenital chloride diarrhea (CLD) gene. *Gene*. 1998; 214: 87-93.

Haila S., Saarialho-Kere U., Karjalainen-Lindsberg M.L., Lohi H., Airola K., Holmberg C., Hastbacka J., Kere J., Höglund P. The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem Cell Biol*. 2000;113: 279-286.

Hediger M.A., Coady M.J., Ikeda T.S., Wright E.M. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature*. 1987; 330: 379-381.

Higgins D.G., Sharp P.M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci*. 1989; 5: 151-153.

Höglund P., Sistonen P., Norio R., Holmberg C., Dimberg A., Gustavson K.H., de la Chapelle A., Kere, J. Fine mapping of the congenital chloride diarrhea gene by linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 1995; 57: 95-102.

Höglund P., Haila S., Scherer S.W., Tsui L.C., Green E.D., Weissenbach J., Holmberg C., de la Chapelle A., Kere J. Positional candidate genes for congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res* 1996; 6: 202-210.

Höglund P., Haila S., Socha J., Tomaszewski L., Saarialho-Kere U., Karjalainen-Lindsberg M.L., Airola K., Holmberg C., de la Chapelle A., Kere J. Mutations in the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhea. *Nature Genet*. 1996; 14: 316-319.

Höglund P., Auranen M., Socha J., Popinska K., Nazer H., Rajaram U., Al Sanie A., Al-Ghanim M., Holmberg C., de la Chapelle A., Kere J. Genetic background of congenital chloride diarrhea in high-incidence populations: Finland, Poland, and Saudi Arabia and Kuwait. *Am J Hum Genet*. 1998; 63: 760-768.

Höglund P., Haila S., Gustavson K.H., Taipale M., Hannula K., Popinska K., Holmberg C., Socha J., de la Chapelle A., Kere J. Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum Mutat*. 1998; 11: 321-327.

- Höglund P., Holmberg C., Sherman P., Kere J. Distinct outcomes of chloride diarrhoea in two siblings with identical genetic background of the disease: implications for early diagnosis and treatment. *Gut* 2001; 48: 724–727.
- Höglund P., Sormaala M., Haila S., Socha J., Rajaram U., Scheurlen W., Sinaasappel M., de Jonge H., Holmberg C., Yoshikawa H., Kere J. Identification of seven novel mutations including the first two genomic rearrangements in SLC26A3 mutated in congenital chloride diarrhea. *Hum Mutat.* 2001;18: 233-242.
- Holmberg C., Perheentupa J., Launiala K. Colonic electrolyte transport in health and in congenital chloride diarrhea. *J Clin Invest.* 1975; 56: 302-310.
- Holmberg C., Perheentupa J., Launiala K., Hallman N. Congenital chloride diarrhoea. Clinical analysis of 21 Finnish patients. *Arch Dis Child.* 1977; 52: 255-267.
- Holmberg C., Perheentupa J., Pasternack A. The renal lesion in congenital chloride diarrhea. *J Pediatr.* 1977; 91: 738-743.
- Holmberg C. Electrolyte economy and its hormonal regulation in congenital chloride diarrhea. *Pediatr Res.* 1978; 12: 82-86.
- Holmberg C. Congenital chloride diarrhoea. *Clin Gastroenterol.* 1986; 15: 583-602.
- Hoogerwerf W.A., Tsao S.C., Devuyst O., Levine S.A., Yun C.H., Yip J.W., Cohen M.E., Wilson P.D., Lazenby A.J., Tse C.M., Donowitz M. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol.* 1995; 270: G29-G41.
- Jacob P., Rossmann H., Lamprecht G., Kretz A., Neff C., Lin-Wu E., Gregor M., Groneberg D.A., Kere J., Seidler U. Down-regulated in adenoma mediates $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in rabbit, rat and human duodenum. *Gastroenterology.* 2002; 122:709-724.
- Jentsch T.J., Janicke I., Sorgenfrei D., Keller S.K., Wiederholt M. The regulation of intracellular pH in monkey kidney epithelial cells (BSC-1). Roles of Na^+/H^+ antiport, $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ symport, and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange. *J Biol Chem.* 1986; 261: 12120-12127.
- Kagalwalla A.F. Congenital chloride diarrhea. A study in Arab children. *J Clin Gastroenterol.* 1994; 19: 36-40.
- Kere J., Sistonen P., Holmberg C., de la Chapelle A: The gene for congenital chloride diarrhea maps close to but is distinct from the gene for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10686-10689.
- Khan S.N., Yaish H.M. Misdiagnosis of congenital chloride-losing diarrhea. *J Perinatol.* 1992; 12: 112-114.
- Kirk K.L. Halm, D.R., Dawson D.C. Active sodium transport by turtle colon via an electrogenic Na-K exchange pump. *Nature.* 1980; 287: 237-239.

- Kirkinen P., Jouppila P. Prenatal ultrasonic findings in congenital chloride diarrhoea. *Prenat Diagn.* 1984; 4: 457-461.
- Knickelbein, R., Aronson, P.S., Schron, C.M., Seifter, J. and Dobbins, J.W.: Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling. *Am J Physiol.* 1985; 249: G236-G245.
- Knickelbein R.G., Aronson P.S., Dobbins J.W. Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. *J Clin Invest.* 1988; 82: 2158-2163.
- Ko S.B.H., Shcheynikov N., Choi J.Y., Luo X., Ishibashi K., Thomas P.J., Kim J.Y., Kim K.H., Lee M.G., Naruse S., Muallem S. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J.* 2002; 21: 5662-5672.
- Ko S.B.H., Zeng W., Dorwart M.R., Luo X., Kim K.H., Millen L., Goto H., Naruse s., Soyombo A., Thomas P.J., Muallen S. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporter. *Nature Cell Biol.* 2004; 6: 343-350.
- Kunzelmann K., Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon. Mechanism and implications for disease. *Physiol Rev.* 2002; 82: 245–289.
- Langer J.C., Winthrop A.L., Burrows R.F., Issenman R.M., Caco C.C. False diagnosis of intestinal obstruction in a fetus with congenital chloride diarrhea. *J Pediatr Surg.* 1991; 26: 1282-1284.
- Lubani M.M., Doudin K.I., Sharda D.C., Shaltout A.A., al-Shab T.S., Abdul Al Y.K., Said M.A., Salh, M.M., Ahmed S.A. Congenital chloride diarrhoea in Kuwaiti children. *Eur J Pediatr.* 1989; 148: 333-336.
- Mäkelä S., Kere J., Holmberg C., Höglund P. SLC26A3 mutations in congenital chloride diarrhea. *Hum Mutat.* 2002; 20: 425-438.
- Mirisola M.G., Calì F., Gloria A., Schinocca P., D'Amato M., Cassarà G., Leo G.D., Palillo L., Meli C., Romano V. PAH gene mutations in the Sicilian population: association with miniplotypes and expression analysis. *Mol Genet Metab.* 2001; 74: 353-361.
- Moseley R.H., Höglund P., Wu G.D., Silberg D.G., Haila S., de la Chapelle A., Holmberg C., Kere J. Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol.* 1999; 276: G185-G192.
- Mount D.B., Romero M.F. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflungers Arch – Eur J Physiol.* 2004; 447:710-721.
- Murray C.J., Lopez A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet.* 1997; 349: 1436–1442.

Norio R., Perheentupa J., Launiala K., Hallman N. Congenital chloride diarrhea, an autosomal recessive disease. Genetic study of 14 Finnish and 12 other families. *Clin Genet.* 1971; 2: 182-192.

Norio R., Nevanlinna H.R., Perheentupa J. Hereditary diseases in Finland; rare flora in rare soul. *Ann Clin Res.* 1973; 5: 109-141.

Nuki G., Watson M.L., Williams B.C., Simmonds H.A., Wallace R.C. Congenital chloride losing enteropathy associated with tophaceous gouty arthritis. *Adv Exp Med Biol* 1991; 309: 203–208.

Orlowski J., Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: 22373-22376.

Pagani F., Buratti E., Stuani C., Romano M., Zuccato E., Niksic M., Giglio L., Faraguna D., Baralle F.E. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element *J Biol Chem.* 2000; 275: 21041-21047.

Paradiso A.M., Tsien R.Y., Demarest J.R., and Machen T.E. Na-H and Cl-HCO₃ exchange in rabbit oxyntic cells using fluorescence microscopy. *Am J Physiol.* 1987; 253: C30-C36.

Rabbani G.H., Albert M.J., Rahman H., Chowdhuri A.K. Short-chain fatty acids inhibit fluid and electrolyte loss induced by cholera toxin in proximal colon of rabbit in vivo. *Dig Dis Sci.* 1999; 44: 1547-1553.

Ramakrishna B.S., Venkataraman S., Srinivasan P., Das P., Young G.P., Binder H.J. Amylase-resistant starci plus oral rehydration solution for colera. *N Engl J Med.* 2000; 342: 308–313.

Rajendran V.M., Binder H.J. Distribution and regulation of apical Cl/anion exchanges in surface and crypt cells of rat distal colon. *Am J Physiol.* 1999; 276: G132-H137.

Rajendran V.M., Black J., Ardito T.A., Sangan P., Alper S.L., Schweinfest C., Kashgarian M., Binder H.J. Regulation of DRA and AE1 in rat colon by dietary Na depletion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279: G931-942.

Resta-Lenert S., Truong F., Barrett K.E., Eckmann L. Inhibition of epithelial chloride secretion by butyrate: role of reduced adenylyl cyclase expression and activity. *Am J Physiol.* 2001; 281: C1837–C1849.

Saier M.H. Jr, Eng B.H., Fard S., Garg J., Haggerty D.A., Hutchinson W.J., Jack D.L., Lai E.C., Liu H.J., Nusinew D.P. et al. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1422: 1-56

Schweinfest C.W., Henderson K.W., Suster S., Kondoh N., Papas T.S. Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 4166-4170.

- Schmitt M.G., Soergel K.H., Wood C.M. Absorption of short fatty acids from the human jejunum. *Gastroenterology*. 1976; 70: 211-215.
- Sellin J.H., De Soigne R. Short chain fatty acids have polarized effects on sodium transport and intracellular pH in rabbit proximal colon. *Gastroenterology* 1998; 114: 737-747.
- Shaltout A.A., Khuffash F.A., Hiilal A.A., El Ghanem M.M. Pattern of protracted diarrhoea among children in Kuwait. *Ann Trop Paed*. 1989; 9: 30-32.
- Shumaker H., Amlal H., Frizzell R., Ulrich C.D. 2nd and Soleimani M.: CFTR drives Na⁺-nHCO₃ cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO₃ secretion in CF. *Am J Physiol*. 1999; 276: C16-C25.
- Simchowicz L., Roos A. Regulation of intracellular pH in human neutrophils. *J Gen Physiol*. 1985; 85: 443-470.
- Solberg R., Sistonen P., Traskelin A.L., Berube D., Simard J., Krajci P., Jahnsen T., de la Chapelle A. Mapping of the regulatory subunits RI beta and RII beta of cAMP-dependent protein kinase genes on human chromosome 7. *Genomics*. 1992; 14: 63-69.
- Songyang Z., Fanning A.S., Fu C., Xu J., Marfatia S.M., Chishti A.H., Crompton A., Chan A.C., Anderson J.M., Cantley L.C. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science*. 1997; 275: 73-77.
- Stephens R.M., Schneider T.D. Features of spliceosome evolution and function inferred from analysis of information at human splice sites. *J Mol Biol*. 1992; 228: 1124-1136.
- Stuenkel E.L., Machen T.E., Williams J.A.: pH regulatory mechanisms in rat pancreatic ductal cells. *Am J Physiol*. 1998; 254: G925-G930.
- Sundaram U., Knickelbein R.G., Dobbins J.W.: pH regulation in ileum: Na⁽⁺⁾-H⁺ and Cl⁽⁻⁾-HCO₃- exchange in isolated crypt and villus cells. *Am J Physiol*. 1991; 260: G440-G449.
- Tomaszewski L., Kulesza E., Socha J. Congenital chloride diarrhoea in Poland. *Mater Med Pol*. 1987; 19: 271-277.
- Topping D.L., Clifton P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*. 2001; 81: 1031-1064.
- Turnberg L.A. Electrolyte absorption from the colon. *Gut*. 1970; 11: 1049-1054.
- Welsh M.J., Smith P.L., Fromm M., Frizzell R.A. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*. 1982; 218: 1219-1221.
- Will P.C., Lebowitz J.L., Hopfer U. Induction of amiloride-sensitive sodium transport in the rat colon by mineralocorticoids. *Am J Physiol*. 1980; 238: F261-F268.

Wheat V.J., Shumaker H., Burnham C., Shull G.E., Yankaskas J.R., Soleimani M. CFTR induces the expression of DRA along with Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in tracheal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279: C62–C71.

Yun C.H., Tse C.M., Nath S.K., Levine S.A., Brant S.R., Donowitz M. Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family: structure and function studies. *Am J Physiol*. 1995; 269: G1-G11.

6. Appendice

Elenco delle pubblicazioni prodotte durante il dottorato:

Berni Canani R., Terrin G., Cirillo P., Castaldo G., Salvatore F., Cardillo G., Coruzzo A., Troncone R. Butyrate as an effective treatment of congenital chloride diarrhea. *Gastroenterology*. 2004; 127: 630-634.

Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita, Aula Magna Facoltà di Medicina e Chirurgia Nuovo Policlinico
20-21 maggio 2004

G. Terrin, P. Cirillo, G. Castaldo, F. Salvatore, G. Cardillo, A. Passariello, A. Coruzzo, F. Porcaro, P. De Luca, M. C. Siani, R. Troncone, R. Berni Canani.
Efficacia terapeutica del Butirrato nel bambino con Cloridorrea Congenita
Libro degli abstract pag. 27

SIBioC 2004 – Padova 08 – 11 Giugno 2004

G. Cardillo, G. Castaldo, R. Berni Canani, G. Terrin, P. Cirillo, Gupta S. e F. Salvatore
Analisi molecolare del gene SLC26A3 e discordanza genotipo-fenotipo in tre casi sporadici di cloridorrea
Biochimica Clinica 2004; 28(1): pag. 79 n°44

2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition – Parigi – Giugno 2004

G. Terrin, P. Cirillo, G. Castaldo, F. Salvatore, G. Cardillo, S. Ruotolo, F. Porcaro, P. De Luca, A. Coruzzo, R. Troncone, R. Berni Canani.
Short- and long-term efficacy of butyrate in the treatment of congenital chloride diarrhea
J Pediatr Gastr Nutr 2004; 39(Suppl. 1): pag S82 n°P0067

60° Congresso Nazionale Società Italiana di Pediatria

Napoli 30 Settembre – 04 Ottobre 2004
G. Terrin, A. Passariello, G. Castaldo, G. Cardillo, G. Sullioti, P. Cirillo, P. De Luca, F. Porcaro, M.C. Siani, F. Salvatore, R. Troncone, R. Berni Canani
Nuove possibilità diagnostiche per la diarrea cronica ad esordio neonatale
Quaderni di Pediatria 2004; 3(2): pag. 60 n° P117

XI National SIGENP's Congress 2004

Cagliari 7-9 Ottobre 2004
G. Terrin, A. Passariello, G. Cardillo, G. Castaldo, F. Salvatore, G. Sullioti, A. Coruzzo, P. Cirillo, R. Troncone, R. Berni Canani
New insights on molecular basis of neonatal onset chronic diarrhoea
Digest Liver Dis 2005; 37(2): pagg. A17-A18, n°22

XII National SIGENP's Congress 2005

Milano, 22-24 Settembre 2005
G. Terrin, G. Castaldo, G. Cardillo, F. Salvatore, A. Passariello, P. Cirillo, F. Porcaro, MC Siani, R. Troncone, R. Berni Canani
Atypical SLC26A3 genotypes in children with congenital chloride diarrhea

