



**Università degli Studi di Cagliari**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**TERAPIA PEDIATRICA E FARMACOLOGIA DELLO SVILUPPO**

**Ciclo XXV**

**STUDIO IN VITRO DELL'ESPRESSIONE DI VARIANTI DEL GENE  
CFTR CON RUOLO PATOFISIOLOGICO NON ANCORA DEFINITO**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

MED/03

BIO/11

Presentata da:	Rusconi Damiana
Coordinatore Dottorato	Prof. Paolo Moi
Relatore	Prof. Carla Colombo
Correlatore	Dott.ssa Lucy Costantino

Esame finale anno accademico 2011 – 2012

Tesi svolta presso la Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di  
Milano:

Centro di Riferimento Regionale per la cura della Fibrosi Cistica;

Laboratorio di Genetica Medica;

in collaborazione con il laboratorio del Prof. Duga presso il Dipartimento di  
Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano.

# INDICE

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	
1.1 Fisiopatologia della Fibrosi Cistica	9
1.2 Diagnosi di Fibrosi Cistica	13
1.3 Trattamento della Fibrosi Cistica	15
1.4 Il gene e la proteina	17
1.5 Le mutazioni	19
1.6 Nuovi approcci terapeutici	24
1.6.1 Terapia genica	24
1.6.2 Approcci terapeutici mutazione-specifici	25
1.7 La modulazione dello splicing come modificatore della funzione del CFTR	28
1.8 La regolazione post-trascrizionale: la degradazione mediata da mutazioni nonsense (NMD)	33
SCOPO DELLA TESI	34
MATERIALI E METODI	
3.1 Screening mutazionale del gene CFTR a livello di DNA	35
3.1.1 Estrazione del DNA da sangue periferico	35
3.1.2 Reverse dot blot	35
3.1.3 MLPA	36
3.1.4 Sequenziamento Sanger	39
3.2 Estrazione dell'RNA totale da cellule dell'epitelio nasale prelevate mediante brushing	42
3.3 Retrotrascrizione	44
3.4 Sequenziamento del cDNA	45
3.5 Analisi in silico	45
3.6 Analisi dell'aplotipo	46
3.7 Costruzione di minigeni ibridi	47
3.8 Colture cellulari e trasfezioni	49
3.9 RT-PCR fluorescenti	49
3.10 Array-CGH	51
3.11 Estrazione di linfociti da sangue periferico	52
RISULTATI	
4.1 Caratterizzazione molecolare di pazienti FC mediante analisi del trascritto del gene CFTR	55
4.1.1 La mutazione sinonima c.2679 G>T [Gly-Gly] descritta come un polimorfismo determina uno splicing anomalo	56
4.1.2 Caratterizzazione della duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 8	56
4.1.3 Caratterizzazione molecolare della mutazione intronica c.1584+18672 A>G	61

4.2 Valutazione di linfociti e linee linfoblastoidi allestite da pazienti FC come tessuto target per l'analisi del trascritto del CFTR	71
4.3 Applicazione del sequenziamento di nuova generazione per la ricerca di mutazioni nel gene CFTR	74
DISCUSSIONE	78
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	83
BIBLIOGRAFIA	84
RINGRAZIAMENTI	92

## RIASSUNTO

La ricerca mutazionale nel gene CFTR, condotta mediante tre step progressivi (ricerca delle mutazioni più frequenti mediante l'applicazione di un kit diagnostico commerciale, ricerca di riarrangiamenti con tecnica MLPA e sequenziamento delle regioni codificanti del CFTR) consente di raggiungere una detection rate di circa il 94%. L'estensione dell'analisi a livello del trascritto del CFTR, mediante estrazione dell'RNA dalle cellule dell'epitelio nasale, oltre ad incrementare di circa il 2% la diagnosi molecolare di pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), consente di identificare nuove mutazioni e/o di rilevare il ruolo patogenetico di variazioni inizialmente considerate polimorfiche. In questo progetto di dottorato sono state caratterizzate tre diverse mutazioni, identificate in pazienti seguiti presso il centro FC della Regione Lombardia:

- i) la mutazione c.2679 G>T, inizialmente considerata come un polimorfismo, determina la formazione di un nuovo sito donatore di splicing, causando lo skipping di 230 nucleotidi dell'esone 17 nel trascritto del CFTR;
- ii) la duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18 del CFTR, identificata mediante tecnica MLPA, è stata confermata e caratterizzata su trascritto. Il riarrangiamento causa un'inserzione out-of-frame di 2244 nucleotidi, con la formazione di un codone di stop prematuro 8 aminoacidi dopo l'inizio dell'esone 7 duplicato;
- iii) la mutazione intronica c.1584+18672 A>G, identificata in cinque diversi pazienti, è stata caratterizzata mediante un approccio combinato in-vitro (creazione di costrutti minigenici) ed in-vivo (RT-PCR eseguite su RNA estratto da brushing nasale). Tali studi hanno mostrato che la mutazione determina la formazione di un sito donatore di splicing e l'attivazione di due siti criptici accettori di splicing, responsabili della produzione di due varianti di trascritto del CFTR. I prodotti dei due eventi alternativi di splicing includono uno pseudoesone di 104 e 65 nucleotidi tra l'esone 11 e l'esone 12. La quantificazione allele-specifica degli splicings wild-type e aberranti, realizzata con RT-PCR fluorescenti su RNA da brushing nasale, ha inoltre mostrato che la mutazione c.1584+18672 A>G mantiene un livello residuo di splicing wild-type del CFTR (circa 3,5%). Tale dato risulta in accordo con il fenotipo clinico lieve manifestato dai pazienti portatori di tale mutazione.

Nella seconda parte del progetto sono stati sviluppati due filoni di ricerca finalizzati al miglioramento dell'analisi molecolare del gene CFTR. In particolare, è stato sviluppato un progetto pilota di analisi del trascritto del CFTR a partire dall'RNA estratto da linfociti e da linee

linfoblastoidi, al fine di valutare la possibilità di utilizzare tessuti target alternativi all'epitelio nasale, non prelevabile in pazienti di età pediatrica e nei soggetti che rifiutano l'esecuzione del brushing nasale. I risultati ottenuti, tuttavia, suggeriscono che il basso livello di espressione del CFTR nei linfociti non consente una corretta analisi dei trascritti del CFTR. Infine è stato sviluppato un kit di sequenziamento di nuova generazione (NGS), basato sull'utilizzo della piattaforma HiSeq 2000 (Illumina), che estende l'analisi del CFTR all'intero gene. L'applicazione dell'NGS consentirà di migliorare tempi e costi della diagnosi molecolare, che sta acquisendo crescente importanza grazie ai recenti risultati ottenuti nello sviluppo di nuovi farmaci mutazione-specifici.

## ABSTRACT

The mutational screening of the CFTR gene, performed with three progressive steps (screening of the most common mutations with a commercial diagnostic kit, analysis of deletions/duplications with MLPA assay and sequencing of the coding CFTR regions) leads to a detection rate of about 94%. The analysis of the CFTR transcripts, by RNA extraction from nasal epithelial cells, allows to identify new mutations and/or to define the pathogenic role of variants initially considered as polymorphisms. In this PhD study, three different mutations, identified in patients followed at the CF Center of Regione Lombardia, were characterized:

- i) the c.2679 G>T mutation, initially described as a polymorphism, causes the creation of a new donor splice site, leading to the skipping of 230 bp of exon 17 in CFTR transcript;
- ii) the duplication spanning from exon 7 to exon 18, identified by MLPA assay was confirmed and characterized on CFTR transcript. This rearrangement causes a 2244-bp-out-of-frame insertion, leading to the creation of a premature stop codon located 8 amino acids after the beginning of the duplicated exon 7;
- iii) the c.1584+18672 A>G deep-intronic mutation, identified in five different patients, was characterized by a combination of in-vitro (hybrid minigene constructs) and in-vivo (RT-PCRs performed on nasal brushing RNA) approaches. These studies showed that this mutation creates a new donor splice site and activates two cryptic acceptor splice sites, causing the production of two CFTR transcript variants. The two alternative splicing products include a 104-bp pseudoexon and a 65-bp pseudoexon located between exon 11 and exon 12. Allele-specific measurement of wild-type and aberrant splicings from the nasal brushing RNA of the probands showed that the c.1584+18672 A>G mutation did not completely abolish the wild-type splicing in vivo. In particular, about 3,5% of the mRNA molecules produced by the c.1584+18672 A>G allele were completely wild-type; these data well correlate with the mild clinical phenotype of patients.

In the second part of the PhD project, two pilot studies, aiming at the improvement of the molecular analysis of CFTR gene, have been developed:

- i) analysis of the CFTR transcript by RNA extraction from lymphocytes and lymphoblastoid cell lines, to evaluate the possibility to use a target tissue alternative to the nasal epithelium, not available in pediatric patients (age < 9 years) and in patients refusing the nasal brushing. The data obtained, however, suggest that the very low level of CFTR expression in lymphocytes does not allow a correct analysis of transcript profiles.

- ii) Development of a custom new generation sequencing (NGS) kit, using the platform HiSeq 2000 (Illumina), in order to scan the entire CFTR gene. After a careful evaluation of the possible alternatives, we chose a target enrichment strategy and designed a set of probes covering the full-length CFTR to be used for DNA capture (custom capture kit, Nimblegen SeqCap EZ Library, Roche). The application of NGS will lead to the improvement of time and cost of molecular diagnosis, that is nowadays increasingly relevant thanks to the recent advances obtained in mutation-specific therapies.



# 1 INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC) è la più comune malattia genetica potenzialmente letale della razza caucasica a trasmissione autosomica recessiva, con un'incidenza di 1/2500-2700 nascite [Ratjen and Doring, 2003]. E' una malattia multisistemica, che coinvolge il processo secretorio delle ghiandole mucosecernerenti e sudoripare-esocrine, ed è causata da mutazioni nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Tale gene codifica per una proteina di 1480 aminoacidi, che svolge la funzione principale di canale per il cloro AMPc-dipendente e di regolatore di scambi ionici transmembrana delle cellule epiteliali, influenzando quindi la composizione in acqua ed elettroliti delle secrezioni esocrine a livello di ghiandole salivari, vie aeree, pancreas, fegato, intestino e vasi deferenti.

Un'elevata frequenza della FC fa supporre un'origine molto antica della patologia ed un vantaggio selettivo degli eterozigoti rispetto ad alcune infezioni; ad esempio è stata dimostrata in vitro una maggiore resistenza alla diarrea causata dalla tossina del *Vibrio cholerae*, poichè la mutazione nell'eterozigote farebbe perdere meno liquidi rispetto ad un individuo sano [Gabriel S et al, 1993]. Un'altra ipotesi non ancora dimostrata suppone che l'eterozigote, avendo solo il 50% dei CFTR funzionanti, sfugga maggiormente all'infezione da *Salmonella tiphy*, microorganismo che causa la febbre tifoide e che utilizza lo stesso canale per entrare nelle cellule epiteliali gastrointestinali ed infettarle [Pier G, 2000].

Grazie al continuo sviluppo dei trattamenti si è verificato un netto miglioramento della prognosi, per questo la mediana di sopravvivenza si è spostata dai 25 anni degli anni '80 ai 38 anni di oggi. Hanno inciso positivamente anche lo sviluppo di nuovi metodi diagnostici che hanno abbassato l'età di diagnosi e l'istituzione di centri di riferimento specializzati che si pongono come obiettivo il trattamento intensivo e globale del paziente.

## 1.1 Fisiopatologia della Fibrosi Cistica

Le conseguenze cliniche di una mancata o ridotta funzionalità del canale CFTR danno origine ad una sintomatologia complessa e variabile, che coinvolge potenzialmente tutti gli organi capaci di secrezione (polmone, ghiandole salivari e sudoripare, pancreas, fegato e vie biliari, dotti deferenti) [Knowles MR et al, 2002].

La compromissione polmonare, dovuta all'ostruzione delle piccole vie aeree da parte di secrezioni bronchiali particolarmente dense e vischiose che predispongono a infezioni batteriche ricorrenti e croniche con danno polmonare progressivo fino all'insufficienza respiratoria, rappresenta la manifestazione clinica più frequente (più del 90% dei casi) e la principale causa di mortalità. Quasi altrettanto frequente (85% dei casi) è la compromissione pancreatica che porta a malassorbimento di nutrienti e, se non adeguatamente corretta con terapie adeguate, a progressivo deterioramento dello stato nutrizionale, con ritardo della crescita nei pazienti in età pediatrica. Nella maggior parte dei casi la sintomatologia diviene evidente nelle prime settimane o mesi di vita e solo in una minoranza compare tardivamente, in età adolescenziale o adulta.

Il fenotipo clinico delle FC è estremamente eterogeneo per quanto concerne l'età di insorgenza, il decorso clinico e la compromissione dei diversi organi. Senza dubbio le interazioni con altri geni detti "modificatori" (codificano generalmente per proteine la cui funzione può diversamente influenzare la fisiopatologia del fenotipo FC a livello dei diversi organi interessati dalla malattia), modificano sostanzialmente il quadro clinico in ogni individuo, unitamente a fattori ambientali che influiscono sulla produzione o sul funzionamento della proteina CFTR.

Di seguito sono riportati i problemi clinici più rilevanti nella FC:

a. Manifestazioni polmonari

L'infiammazione cronica delle vie aeree, secondaria all'infezione bronchiale, è il principale meccanismo responsabile della progressione del danno polmonare, principale causa di mortalità associata alla Fibrosi Cistica. La compromissione dell'apparato respiratorio è presente nella quasi totalità dei pazienti. L'alterazione o l'assenza della proteina CFTR a livello polmonare determina la produzione di secrezioni bronchiali disidratate e ispessite, che possono ristagnare nel naso e nei seni paranasali, causando rinite, pansinusite cronica e polipi nasali recidivanti. Si può manifestare anche una diminuzione dell'olfatto con una conseguente diminuzione del gusto. La compromissione della clearance muco-ciliare e le alterazioni ostruttive secondarie a livello bronchiale contribuiscono allo sviluppo di infezione severa e frequenti con bronchioliti ed emottisi. I principali microrganismi che colonizzano le vie aeree nella FC sono: lo *Staphylococcus aureus*, l'*Haemophilus influenzae*, la *Pseudomonas aeruginosa* e la *Burkholderia cepacia*. Lo *Staphylococcus aureus* e l'*Haemophilus influenzae* prevalgono nei primi anni di vita, mentre l'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* diviene progressivamente più frequente con l'età. Tale colonizzazione può essere facilitata da infezioni virali concomitanti ed è di solito preceduta dall'infezione cronica da *Staphylococcus aureus*. Con il tempo, l'infezione da *P. aeruginosa* può diventare cronica e ciò complica inesorabilmente il decorso della malattia e ne condiziona la prognosi.

b. Pancreas esocrino

Il pancreas è colpito nell'80% dei casi. Il danno pancreatico è il risultato dell'ostruzione dei dotti pancreatici da parte di un muco denso e vischioso, che porta ad una risposta infiammatoria con distruzione del tessuto acinare ed infarcimento fibroadiposo del parenchima. La conseguente perdita di funzione porta ad insufficienza pancreatica che diviene sempre più grave fino alla completa assenza di secrezione enzimatica. Anche la secrezione di bicarbonato è compromessa. Clinicamente i pazienti presentano malassorbimento di grassi con conseguente steatorrea, deficit di vitamine liposolubili e malnutrizione proteico-calorica. Il diminuito assorbimento di vitamine liposolubili (A, E, D, K) può causare cecità notturna, xeroftalmia, neuropatie, astenia, osteopenia e osteoporosi, anemia e problemi nella coagulazione. La terapia sostitutiva con enzimi pancreatici consente di correggere l'insufficienza pancreatica e di evitare la malnutrizione. È divenuto ormai chiaro che la malnutrizione e il deficit di crescita sono complicanze iatrogene e non intrinseche della malattia. Lo stato nutrizionale è in grado di influenzare la funzione respiratoria.

c. Pancreas endocrino

La compromissione del pancreas endocrino (cellule  $\beta$ ) è più tardiva e può manifestarsi con ridotta tolleranza al glucosio che può evolvere in una particolare forma di diabete insulino-dipendente: Cystic Fibrosis Related Diabetes (CFRD). Il CFRD interessa il 15-20% della popolazione adulta FC ed è fortemente associato a genotipi che presentano mutazioni di classe I, II e III [Kerem E et al., 1990]. Il meccanismo alla base dell'insorgenza del CFRD è il deficit insulinico, strettamente correlato a un quadro di insufficienza pancreatica. Anche la resistenza all'insulina rappresenta un fattore eziopatogenetico del CFRD. Sesso femminile, longevità, insufficienza pancreatica, omozigosi per la F508del e terapia con corticosteroidi sono i principali fattori di rischio per l'insorgenza del CFRD. Il CFRD presenta caratteristiche comuni al diabete di tipo I e II. Sue principali complicanze sono le microvasculopatie: retinopatia, neuropatia e nefropatia. Le macrovasculopatie sono invece meno frequenti e ciò è probabilmente da ricondurre alla ridotta aspettativa di vita, alle basse incidenze di dislipidemia e ipertensione e all'assenza di obesità. In una piccola percentuale di pazienti adulti, in assenza di insufficienza pancreatica, la FC può manifestarsi con pancreatite ricorrente come segno clinico preminente.

d. Intestino

Alla nascita, circa il 15% dei pazienti affetti da FC presenta ileo da meconio. Si tratta di una forma di occlusione intestinale secondaria all'ispessimento del materiale fecale accumulato

in epoca prenatale nel intestino. La mancata emissione di meconio nei primi giorni di vita, con conseguente occlusione intestinale, è la manifestazione clinica più precoce di FC e può portare a resezione intestinale anche molto estesa.

Quadri di sub-occlusione intestinale (Distal Intestinal Obstruction Syndrome DIOS), per presenza di fecalomi, possono insorgere in età adolescenziale e adulta.

e. Sistema epato-biliare

La ridotta funzionalità del CFTR espresso a livello dei colangiociti determina la formazione di bile viscosa che ostruisce i dotti epatici, favorendo lo sviluppo di calcoli nella colecisti e nei dotti biliari e l'insorgenza di cirrosi biliare focale, che può evolvere a cirrosi biliare multi lobulare [Colombo C, 2007].

f. Apparato riproduttivo

L'infertilità è presente nel 97-98% dei maschi FC, ed è legata al fatto che già nella vita intrauterina si realizza un'ostruzione del lume dei vasi deferenti, in grado di provocare rapidamente atresia bilaterale. Una ridotta fertilità femminile è meno ben documentata.

<u>ORGANI</u>	<u>ANOMALIE FUNZIONE/STRUTTURA</u>	<u>IMPLICAZIONI CLINICHE</u>	<u>FREQUENZE RELATIVE</u>
SECREZIONE SIEROSA Ghiandole lacrimali Ghiandole parotidiche  Ghiandole sudoripare	Iperconcentrazione salina Iperconcentrazione salina  Iperconcentrazione salina	Sindrome da perdita di sali e alcalosi metabolica  Elevate concentrazioni di cloro nel sudore	Indefinita   95-98%
SECREZIONE MUCOSA Ghiandole salivari	Alterazioni fibrocistiche	Salivazione difettosa	80%
Polmone	Difettosa clearance muco ciliare, secrezioni ispessite, infezione e infiammazione	Malattia polmonare cronica progressiva Pneumotorace Emottisi passiva Aspergillosi broncopolmonare allergica	97%  5-8% 5% 10%
Intestino	Contenuto intestinale ispessito	Ileo da meconio Ostruzione intestinale distale Prolasso rettale	10-20% 10%  1-2%

Sistema epatobiliare	Secrezioni biliari ispessite Bile litogena	Colestasi neonatale	Rara
		Micro colecisti	30%
		Litiasi biliare	15%
		Cirrosi biliare focale	20-30%
		Cirrosi biliare multi lobulare	5-10%
		Ipertensione portale	2-5%
		Steatosi epatica	23-67%
		Alterazioni enzimi epatici	40-70%
		Colangite sclerosante	Rara
		Stenosi del coledoco	rara
Pancreas	Fibrosi pancreatica Ostruzione dutturale con trasformazione fibrocistica Strozzamento insule	Maldigestione	85%
		Insufficienza pancreatica	80-85%
		Pancreatite cronico-ricorrente	3-4%
		Intolleranza al glucosio e diabete	10-25%
Naso e seni paranasali	Ristagno muco/infezione	Pan sinusite	90%
		Mucocele	
		Polipi nasali	15-26%
		Ipoosmia (gusto difettoso)	85%
Vasi deferenti Cervice uterina	Atresia-azoospermia Anomalie del muco	Infertilità maschile Ridotta fertilità femminile	98% indefinita

**Tabella 1.1:** Principali sintomi clinici associati alla Fibrosi Cistica.

## 1.2 Diagnosi di Fibrosi Cistica

In una consensus conference del 1998 [Rosenstein BJ et al, 1998] si è stabilito che per la diagnosi di FC è necessaria la presenza di almeno uno dei seguenti criteri:

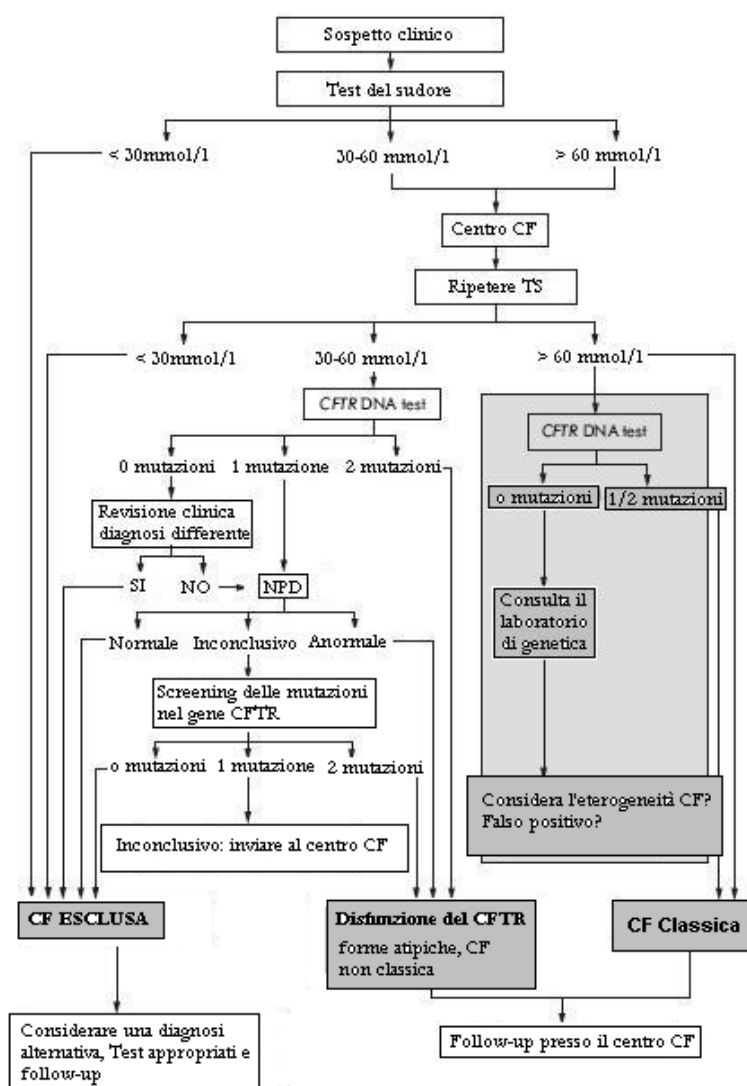
- Sintomatologia clinica tipica;
- Anamnesi familiare positiva;
- Screening neonatale positivo

In associazione a:

- Test del sudore alterato;
- Presenza di una mutazione patogenetica su entrambi gli alleli;
- Alterato trasporto ionico a livello dell'epitelio nasale e rettale.

Una concentrazione di cloro nel sudore superiore ad una certa soglia (50 mEq/L nei primi mesi di

vita e 60 mEq/L dopo i 6 mesi) viene considerata diagnostica per FC; la diagnosi può essere confermata dalla ricerca di mutazioni nel gene CFTR. Nel caso in cui tale procedura non risulti risolutiva, possono essere effettuati test di funzionalità della proteina, come la misura della differenza di potenziale a livello della mucosa rettale nasale (NPD) dopo biopsia [Wilmott RW, 1998] (Diagramma 1).



**Diagramma 1:** Algoritmo proposto per la diagnosi di Fibrosi Cistica a partire dal test del sudore (De Boeck K et al., 2006).

Il protocollo di screening neonatale si basa sulla determinazione della tripsina immunoreattiva (IRT), ovvero della concentrazione di tripsina in una goccia di sangue raccolta su carta bibula al terzo giorno di vita. Lo screening può dare diversi risultati:

- IRT < 65 ng/ml: il test è considerato negativo e consente di escludere la diagnosi di FC;
- IRT > 65 ng/ml: il test è positivo e si procede alla ricerca delle mutazioni più frequenti sul

DNA;

- IRT >65 ng/ml e l'analisi su DNA è negativa: si esegue un secondo dosaggio dell'IRT tra il 25° e il 30° giorno. Se IRT < 45 ng/ml il soggetto è sano, se IRT > 45 ng/ml si esegue il test del sudore per definire la diagnosi.

La ricerca mutazionale su DNA viene effettuata anche a tutti i neonati che presentano ileo da meconio, indipendentemente dal risultato dell'IRT.

### 1.3 Trattamento della Fibrosi Cistica

È essenziale un programma terapeutico globale e intensivo, finalizzato al trattamento della sintomatologia clinica associata alla malattia.

- dieta ipercalorica e ricca di grassi per compensare il malassorbimento: la dieta comporta l'assunzione di calorie e proteine sufficienti a promuovere la crescita normale e, nel caso si riscontri un deficit, supplementazione di vitamine liposolubili (A, E, D, K), B12, acidi grassi essenziali, ferro e sali (soprattutto durante i periodi di stress termico e incremento della sudorazione). Nel caso compaiano complicazioni, come il diabete o l'epatopatia, queste vanno trattate in modo specifico. In presenza di cirrosi bisogna agire sull'ipertensione portale ed eventualmente sulle sue complicanze; quando l'insufficienza epatica non è più trattabile si ricorre al trapianto di fegato. Eventualmente se la compromissione del sistema respiratorio è severa si prende in considerazione il trapianto fegato-polmone;
- uso appropriato di enzimi pancreatici gastro-protetti: l'insufficienza pancreatica si tratta somministrando ad ogni pasto gli enzimi in dose adeguata alla digestione ed assorbimento dei grassi ingeriti. Con le preparazioni enzimatiche attualmente a disposizione si ottiene una percentuale di assorbimento di lipidi compresa tra l'85% e il 95%;
- fisioterapia respiratoria: questa pratica è fondamentale per eliminare le secrezioni dalle vie aeree e permettere una migliore ventilazione polmonare;
- Idratazione del muco: si possono utilizzare composti con un effetto osmotico che richiamano acqua dall'interno delle cellule verso l'esterno, idratando il muco e favorendo la disostruzione delle vie aeree. Attualmente sono disponibili la soluzione ipersalina e il Pulmozyme, mentre si sta sviluppando un potenziale farmaco, il bronchitolo, una preparazione inalabile di mannitolo in polvere, capace di reidratare le secrezioni delle vie aeree di pazienti FC.
- uso di antibiotici mirati al trattamento delle infezioni polmonari: si agisce a livello polmonare, innanzitutto cercando di prevenire le infezioni, eliminando il secreto bronchiale che ostruisce le vie aeree, evitando il contatto con altri malati già infetti e seguendo determinate norme igieniche.

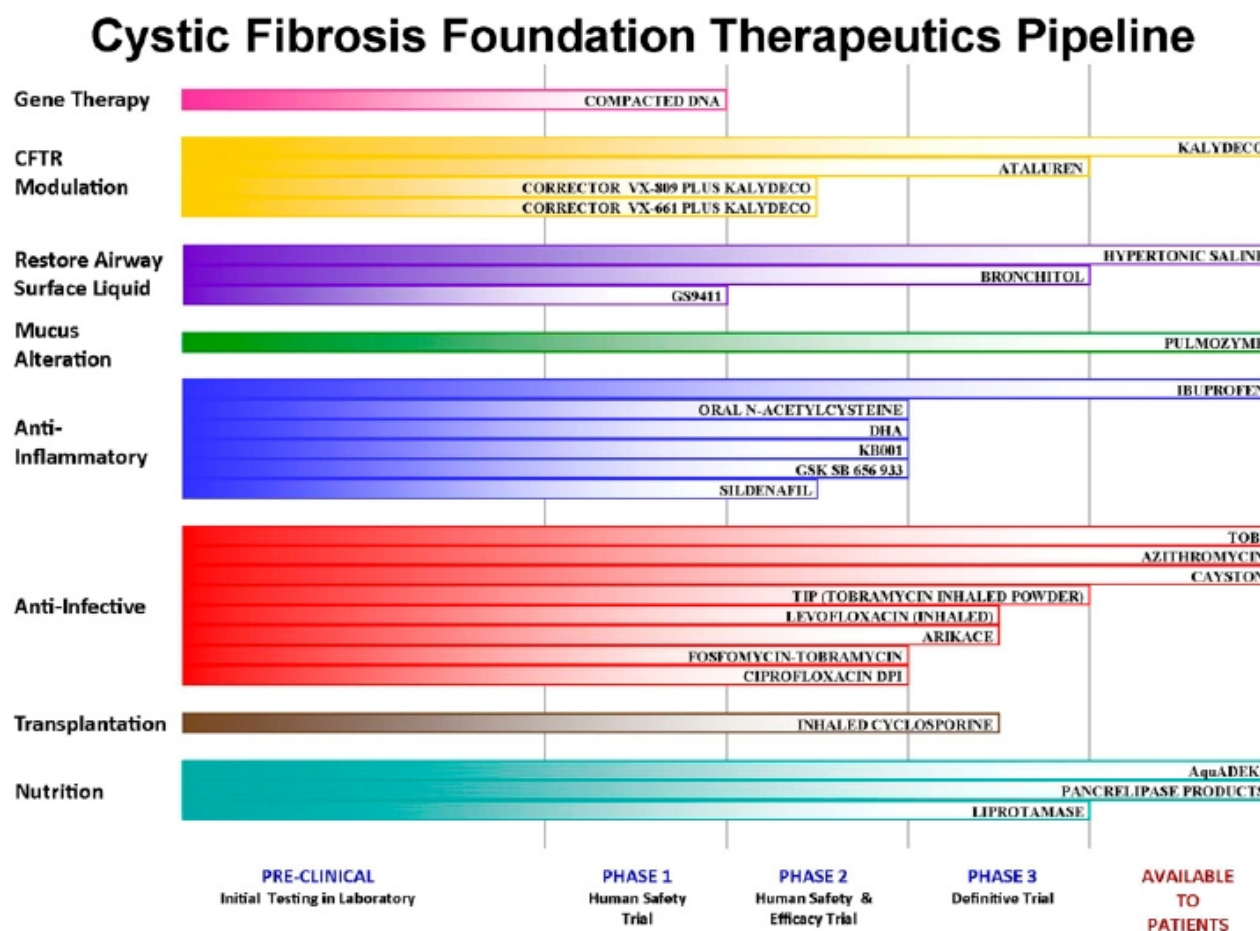
Quando invece l'infezione è in atto, si tratta farmacologicamente con antibiotici nei riguardi dei quali i batteri presenti nell'espettorato risultino sensibili e con antinfiammatori per ridurre le manifestazioni polmonari. [Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Antibiotic Group; 2002. Doring G. et al.; 2012]. Per le riacutizzazioni polmonari gravi la terapia antibiotica viene effettuata per via parenterale. Per controllare le infezioni croniche è raccomandato l'uso di antibiotici per via aerosolica, che riduce gli effetti sistemici e consente di raggiungere elevate concentrazioni locali del farmaco. Si è inoltre visto che somministrando la DNAsi ricombinante umana per via aerosolica si ha un modesto recupero funzionale, si riduce la velocità di deterioramento della funzionalità polmonare e diminuisce la frequenza delle riacutizzazioni respiratorie, perché l'enzima degrada il DNA derivante dalla lisi di batteri e granulociti, che contribuisce notevolmente all'aumento della viscosità delle secrezioni [Jones A. et al.; 2004]. La profilassi delle infezioni polmonari prevede la vaccinazione contro la pertosse, l'*Haemophilus influenzae*, la varicella, il morbillo e la vaccinazione annuale antiinfluenzale.

Viene spesso associata anche la terapia antinfiammatoria: i corticosteroidi per via orale sono indicati nei lattanti con forme protratte di bronchiolite e in quei pazienti con broncospasmo refrattario, aspergilloso broncopolmonare allergica e complicanze infiammatorie (ad esempio artrite e vasculite). L'uso a lungo termine della terapia corticosteroidica a giorni alterni può rallentare il deterioramento della funzionalità polmonare; tuttavia, a causa delle complicanze da steroidi, essa non è raccomandata come trattamento di routine. È stato dimostrato che l'ibuprofene, somministrato per diversi anni, riduce la velocità di deterioramento della funzionalità respiratoria.

- Terapia delle complicanze gravi (insulina per il diabete, emottisi, pneumotorace, aspergilloso broncopolmonare allergica, acido ursodesossicolico per l'epatopatia, etc): i soggetti con insufficienza cardiaca destra sintomatica devono essere sottoposti a terapia con diuretici, riduzione di sale nella dieta e O<sub>2</sub>. La chirurgia può essere indicata per le bronchiectasie localizzate o le atelettasie non suscettibili di terapia medica, la poliposi nasale, il sanguinamento di varici esofagee da ipertensione portale, colelitiasi, ostruzione intestinale per volvolo o invaginazione che non possono regredire con la terapia medica. Il trapianto di fegato è stato eseguito con successo in pazienti con interessamento epatico allo stadio terminale. Quando la progressione del danno polmonare porta ad insufficienza respiratoria l'unica possibilità è rappresentata dal trapianto polmonare bilaterale.

La figura sottostante mostra le nuove terapie in diverse fasi di sviluppo, che includono la terapia genica e soprattutto la terapia farmacologica di correzione del difetto di base (paragrafo 1.6.2).





**Figura 1.1:** elenco delle terapie nelle diverse fasi di sviluppo, supportate dalla Cystic Fibrosis Foundation [Hoffman et al., 2013]

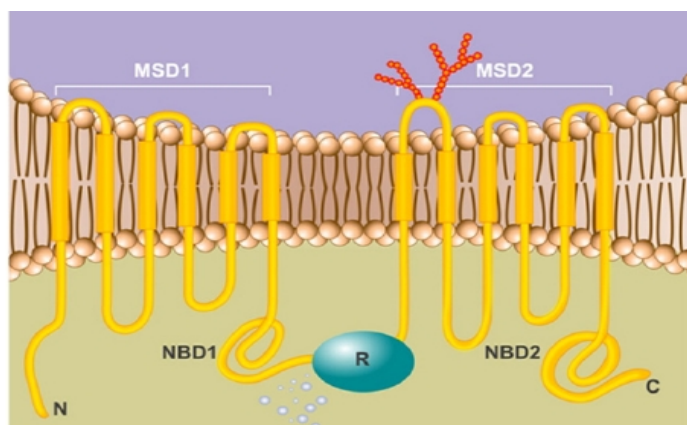
## 1.4 Il gene e la proteina

Il gene CFTR, responsabile della Fibrosi Cistica, è stato localizzato mediante analisi di linkage sul cromosoma 7 ed è stato clonato nel 1989, utilizzando la tecnica del positional cloning, in posizione 7q31.2 [Riordan JR et al., 1989]. Il gene è lungo 250 Kb ed è costituito da 27 esoni, che sono trascritti in un mRNA di 6.5 Kb.

La proteina è costituita da 1480 aminoacidi ed è espressa negli epitelii delle ghiandole secretorie del tratto respiratorio, dei dotti pancreatici, dei dotti biliari intraepatici, delle ghiandole sudoripare, dei dotti deferenti e dei tubuli renali. Presenta una struttura multi-dominio simmetrica costituita da [Clementi F]:

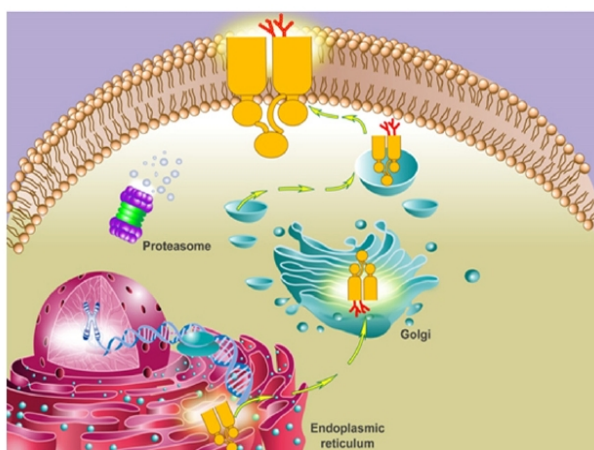
- Due domini transmembranari MSD-1 e MSD-2, formati da 6 regioni idrofobiche con struttura ad  $\alpha$ -elica. Costituiscono il canale di passaggio per gli anioni;

- Due domini idrofilici citoplasmatici, definiti NBF-1 e NBF-2, che legano nucleotidi trifosfati (ATP) e accoppiano l'idrolisi dei nucleotidi alle cinetiche di apertura/chiusura del canale;
- Un dominio citoplasmatico, coinvolto nei meccanismi di regolazione autologa ed eterologa, contenente numerosi siti di fosforilazione da parte di protein-chinasi cAMP dipendenti (PKA, PKC) e definito R-domain.



**Figura 1.2:** topologia e struttura della proteina del CFTR, una glicoproteina transmembranaria integrale composta da cinque distinti domini strutturali: due domini MSD, due domini NBD e un dominio centrale regolatorio. Ciascun MSD possiede sei  $\alpha$ -eliche idrofobiche. La proteina è N-glicosilata nel IV loop extracellulare (MSD2). C: C-terminale; N: N-terminale.

La proteina viene trascritta a livello del nucleo e successivamente subisce il processo di splicing intronico; da qui passa nel compartimento citoplasmatico, prima a livello del reticolo endoplasmico dove viene tradotta e processata, poi nell'apparato del Golgi, dove subisce ulteriori modificazioni e viene glicosilata a livello dei domini transmembrana. Infine la proteina raggiunge il suo sito definitivo sulla membrana apicale delle cellule epiteliali, dove svolge la sua funzione principale: trasportatore dello ione cloro (figura 1.3).



**Figura 1.3:** Biosintesi corretta della proteina CFTR. Come glicoproteina transmembranaria integrale, le fasi post-traduzionali iniziano nel reticolo endoplasmico con la formazione del core glicosilato immaturo, che è il precursore della forma matura completamente glicosilata. La proteina viene poi processata nell'apparato del Golgi per essere trasportata alla membrana apicale dove è normalmente espressa.

La direzione del trasporto di cloro dipende dal tessuto epiteliale interessato: nell'epitelio intestinale ed in quello respiratorio la direzione del flusso va dall'interno delle cellule verso l'esterno, mentre, nell'epitelio delle ghiandole sudoripare avviene dal lume al citoplasma.

Ulteriori funzioni della proteina CFTR sono:

- regolazione della funzione di altri canali ionici, quali l'EnaC (un canale del sodio), l'ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel), il canale del cloro dipendente dal calcio (CaCC), il canale renale del potassio (ROMK), lo scambiatore sodio/protone NHE3 e il canale acquaporinico [Lubamba B et al., 2012];
- trasporto del glutatione;
- regolazione del pH degli organelli citoplasmatici (reticolo del Golgi, endosomi e prelisosomi). Nelle cellule FC si osserva un'alcalinizzazione di questi compartimenti, con conseguente produzione di glicoproteine con alterato pattern di glicosilazione (ridotta sialiazione ed aumentata solfatazione). Si ipotizza che queste alterazioni possano, almeno in parte, contribuire all'aumentata colonizzazione delle vie aeree da parte di batteri patogeni, in particolare *Pseudomonas aeruginosa*;
- attivazione delle gap junctions, una sorta di canali che servono alla comunicazione intercellulare;
- recettore per *Pseudomonas aeruginosa* e conseguente endocitosi (ingestione);
- regolazione dell'immunità innata;
- regolazione dei processi infiammatori, mediante azione su chemochine e neutrofili [Vankeerberghen A et al., 2002].

## 1.5 Le mutazioni

Ad oggi sono state identificate più di 1800 mutazioni [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/] e numerosi polimorfismi distribuiti nell'intera sequenza codificante, nelle regioni promotrici e nelle sequenze di giunzione esone-introne. Solo una minoranza è localizzata negli introni.

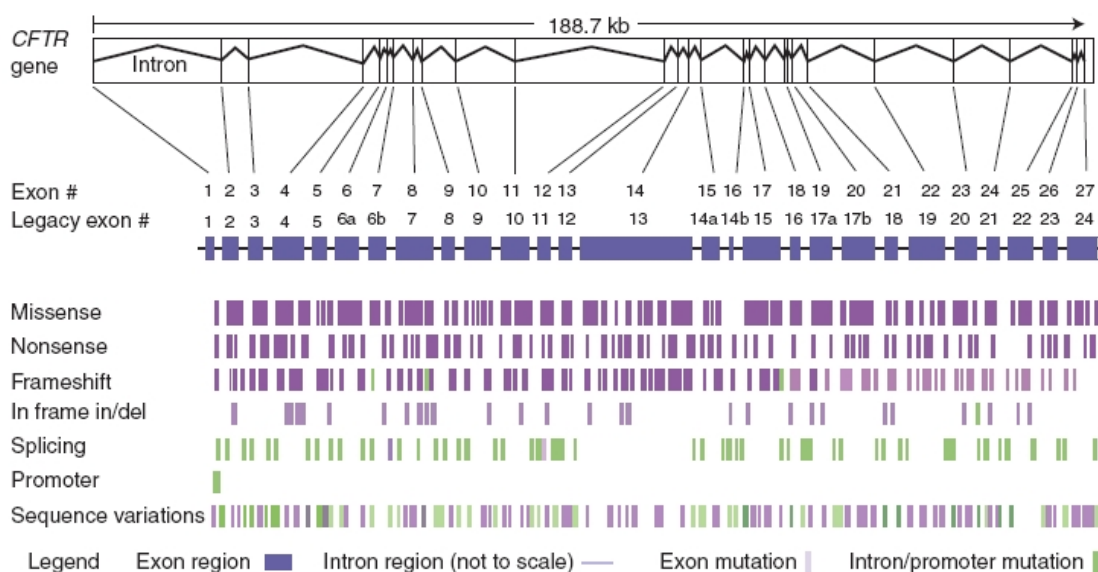
Modificazioni a livello esonico hanno conseguenze più o meno importanti sulla sequenza amminoacidica. Mutazioni a livello intronico causano invece generalmente modificazioni nel processo di splicing con effetti non meno rilevanti. Talvolta si ha abolizione di un sito di splicing, in altri casi creazione di siti di splicing alternativi (e quindi di nuovi esoni).

Il 98% delle mutazioni geniche descritte fino ad oggi comprendono mutazioni puntiformi o micro-inserzioni/delezioni.

La mutazione più frequentemente responsabile della malattia è una delezione di 3 paia di basi nell'esone 11 che porta alla delezione di una fenilalanina in posizione 508 (F508del) [Bodabilla JL et al, 2002]. A livello mondiale, la F508del è presente in circa due terzi (66%) di tutti gli alleli patologici, con grandi variazioni all'interno delle diverse popolazioni (ha una frequenza di circa

l'80% nel Nord Europa, si attesta in Italia con una frequenza di circa il 50%, mentre nel Sud Mediterraneo la frequenza si abbassa al 30%).

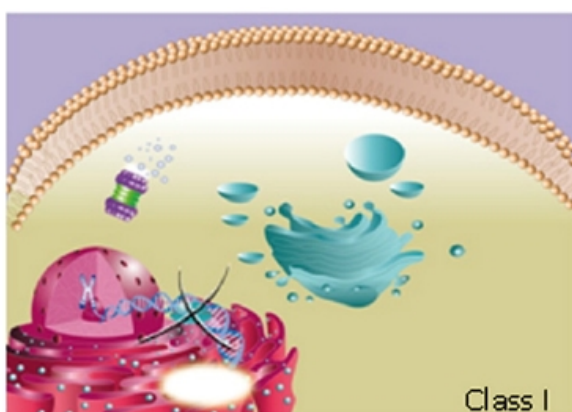
Esiste al contrario una grande eterogeneità riguardante il rimanente terzo degli alleli: da una quindicina di mutazioni con frequenza  $\geq$  all'1%, fino ad arrivare a mutazioni che potremmo definire private. Esistono inoltre mutazioni familiari e personali: sono riconosciute e descritte in 3 o 4 famiglie al mondo, quindi con rarità eccezionale.



**Figura 1.4:** Schema del gene CFTR, del trascritto e della distribuzione delle mutazioni.

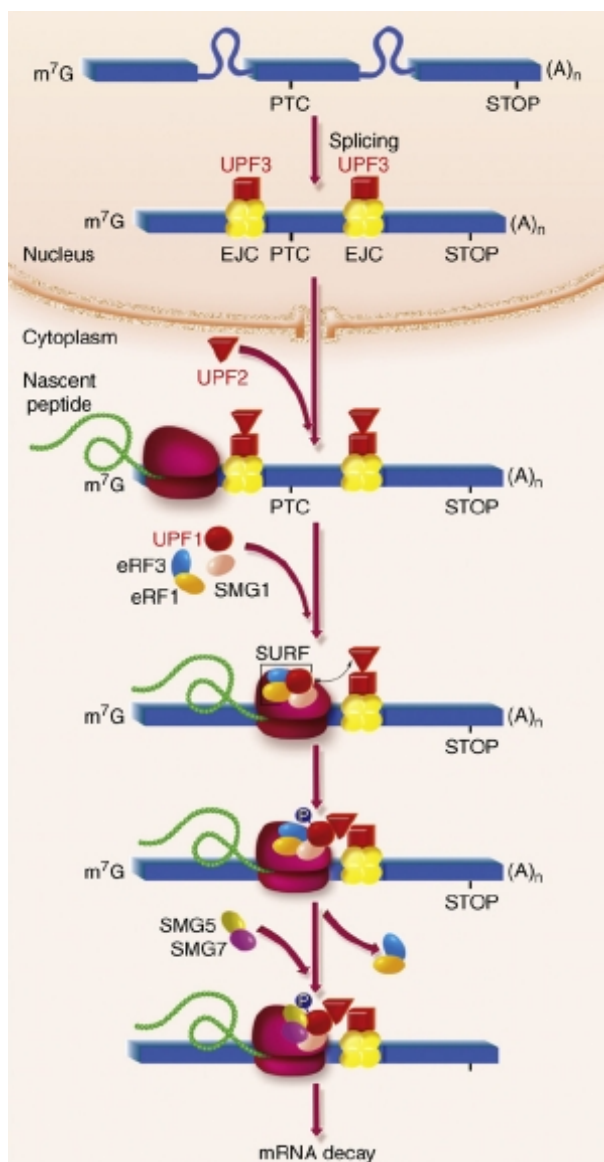
Le mutazioni del gene CFTR sono state raggruppate in sei classi diverse sulla base dei meccanismi molecolari della disfunzione e sulla base delle conseguenze sull'espressione della proteina [Haardt *M et al.*, 1999; Vankeerberghen *A et al.*, 2002].

### Classe I: difetto di produzione



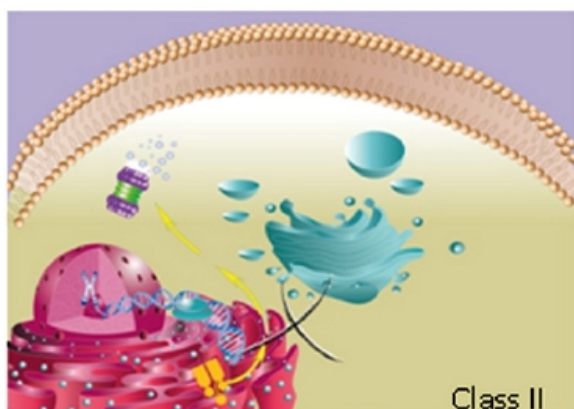
Mutazioni nonsense o frameshift determinano la mancata sintesi della proteina (es. G542X, 3950delT, R553X, W1282X), poiché portano alla formazione di segnali prematuri di stop, creando trascritti instabili e/o proteine aberranti destinate ad essere degradate rapidamente oppure ad avere scarsa o nessuna funzione. Le mutazioni di classe I causano quindi la perdita dell'attività di canale del cloro negli epitelii affetti. I trascritti portatori di mutazioni che determinano l'inserzione di un codone di stop

premature (PTC) sono soggetti alla degradazione mediata da NMD (Nonsense-Mediated Decay). L'NMD è un meccanismo di controllo che degrada trascritti aberranti contenenti PTC e trascritti fisiologici, come trascritti con introni nella regione 3'UTR e trascritti derivati da splicing alternativi. L'NMD interviene in seguito allo splicing del pre-mRNA e nella maggior parte dei casi è mediato dal complesso di giunzione dell'esone (EJC), costituito da almeno dieci proteine poste 20-24 nucleotidi a monte delle giunzioni esone/esone [Le Hir H et al., 2001]. Questo complesso si dispone nelle fasi iniziali della traduzione. I codoni di stop che sono localizzati a più di 50-55 nucleotidi a monte di una giunzione esone/esone sono riconosciuti come segnali di stop prematuri, poiché il complesso EJC è posto a valle del codone di stop. La terminazione della traduzione è indotta dal riconoscimento del codone di stop da parte dei fattori di rilascio eRF1 ed eRF3, che vengono reclutati ai ribosomi. Questi fattori reclutano UPF1, che a sua volta attiva la kinasi SMG1. Queste quattro proteine generano sul ribosoma il complesso noto come SURF. L'interazione di UPF1 con UPF2 a livello del sito di terminazione determina la fosforilazione di UPF1 mediata da SMG1 e la dissociazione dei fattori di rilascio. UPF1 fosforilata recluta altri fattori (SMG5 e SMG7), che portano alla stimolazione dell'NMD: i trascritti target vengono degradati sia dalle 5'-3' esoribonucleasi, sia da hXRN1 e dalla degradazione 3'-5' associata alla deadenilazione e all'esosoma [Lejeune F et al., 2003].



**Figura 1.5:** Pathway dell’NMD. In seguito allo splicing del pre-mRNA nel nucleo, i trascritti con EJC che include la proteina UPF3, sono esportati nel citoplasma. La proteina UPF2 si lega a UPF3. I ribosomi cominciano a tradurre l’mRNA fino al raggiungimento di un codone di stop. Sui ribosomi quattro proteine (SMG1, UPF1, eRF1, eRF3) generano un complesso noto come SURF. Nei casi in cui vi è un EJC a valle, UPF1 (nel sito di terminazione) può interagire con la proteina associate a EJC, UPF2, portando alla fosforilazione di UPF1 mediata da SMG1 e alla dissociazione dei fattori di rilascio. UPF1 fosforilata recluta SMG5 e SMG7, attivando la degradazione NMD.

Classe II: difetto di maturazione della proteina e diminuita stabilità



Si tratta di mutazioni che determinano un’alterata struttura terziaria della proteina, danneggiando il processo di maturazione fino alla destinazione in membrana. La conformazione instabile porta alla degradazione della proteina. A questa categoria appartengono ad esempio la F508del e la N1303K.

Classe III: difetto di regolazione

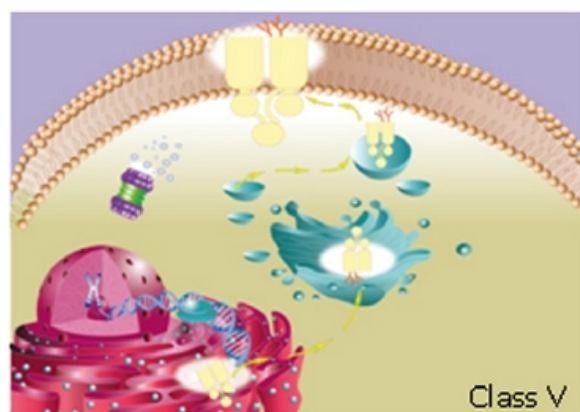
Queste mutazioni, dovute a sostituzione di un singolo aminoacido, comportano la sintesi di proteine complete e mature, che presentano un'alterata regolazione da parte dell'ATP intracellulare: esse interferiscono, infatti, con la fosforilazione del dominio R, con il legame e l'idrolisi dell'ATP a livello di entrambi i domini NBD, e con la stimolazione del canale da parte

dell'ATP. Ne consegue un *diminuito trasporto di cloro* attraverso il canale. Fanno parte di questa classe le mutazioni missenso R553G e G551D.

Classe IV: difetto di canale

A causa della sostituzione di un aminoacido la proteina presenta una bassa conduttanza degli ioni cloro attraverso il canale. Le mutazioni R117H, R334W e R234P ad esempio, determinano la formazione di un canale del cloro con fosforilazione e regolazione ATP-dipendente normale, ma con ridotta conduttanza del canale. Questa classe di mutazioni è per lo più associata ad un fenotipo più

lieve.

Classe V: ridotta sintesi o rallentata maturazione, ridotta quota di CFTR funzionante

Si tratta di mutazioni a carico del *promotore* o con creazione di *siti di splicing alternativi*, che determinano una ridotta sintesi della proteina. Dal momento che in una piccola percentuale di trascritti possono verificarsi splicing normali, e che quindi può generarsi una piccola quantità di canali CFTR funzionanti, il fenotipo risultante sarà lieve o addirittura monosintomatico.

### Classe VI: destabilizzazione del CFTR



Tale classe è stata proposta da Haardt in seguito all'identificazione di nuovi meccanismi che portano ad una ridotta espressione della CFTR sulla membrana cellulare, dovuta alla delezione degli ultimi 70-98 residui amminoacidici della regione C-terminale a sua volta indotta da mutazioni nonsense o frameshift nelle corrispondenti regioni esoniche (4326 delTC, 4279 insA, 4271 delC).

Benché la biosintesi, il processamento e la funzionalità del canale della proteina troncata siano essenzialmente normali, il tasso di degradazione della forma matura glicosilata è 5 o 6 volte maggiore rispetto alla forma wt. Come suggerito dagli stessi autori, la regione C-terminale potrebbe svolgere un ruolo centrale nel mantenimento della stabilità metabolica del complesso glicosilato della proteina. Questa ipotesi offre una plausibile spiegazione del fenotipo severo dei pazienti FC portatori di tali mutazioni.

Recentemente le classi di mutazioni sono state rielaborate includendo nella classe I (mancata sintesi proteica per mutazioni di stop o frameshift) alcune delle mutazioni di classe V che producono una ridottissima quantità di proteina, da essere comparabile fenotipicamente ad una mancata sintesi.

## **1.6 Nuovi approcci terapeutici**

### **1.6.1 Terapia Genica**

In seguito al clonaggio del gene CFTR nel 1989, si era diffuso grande entusiasmo sulle potenzialità di sviluppo della terapia genica per la cura della Fibrosi Cistica. Infatti, sono stati condotti più di venti trials di terapia genica, utilizzando una varietà di agenti di trasferimento genico, sia virali che non-virali. Diversi sistemi vettoriali sono stati testati in trials umani, tra i quali vettori adenovirali, virali adeno-associati e lipidi cationici. Tuttavia, nonostante l'ottimismo derivato dagli studi in vitro e dai primi studi in vivo, i diversi progetti sperimentali non hanno ottenuto i risultati sperati. Tra le principali difficoltà incontrate [Davies JC et al., 2001] emergono:



- barriere poste dall'epitelio respiratorio al trasferimento genico: le secrezioni dell'epitelio respiratorio, e il denso strato di muco presente nei pazienti FC inibiscono fortemente l'efficace trasferimento genico;
- identificazione del corretto target cellulare a cui indirizzare i sistemi vettoriali che esprimono il CFTR funzionante;
- definizione dell'effettivo livello di espressione di CFTR wt necessario al miglioramento del fenotipo clinico;
- problemi nella ripetizione delle somministrazioni di terapia genica: in diversi trials, anche in seguito ad un corretto uptake del sistema vettoriale, si è osservato che le cellule perdono la capacità di espressione del CFTR esogeno dopo poche settimane.

Attualmente, il principale studio di terapia genica in corso si sta svolgendo nel Regno Unito, utilizzando il vettore lipidico cationico GL67 [Davies JC, 2010].

### 1.6.2 Approcci terapeutici mutazione-specifici

Una valida alternativa alla terapia genica si sta rivelando la terapia farmacologica per la correzione del difetto di base, utilizzando particolari molecole che, a seconda del difetto funzionale indotto dalle mutazioni causative di FC, agiscono sulla sintesi, il processamento e la funzionalità della proteina del CFTR [Wilschanski M, 2013; Wilschanski M et al., 2011].

#### Terapie per mutazioni di classe I

Gli antibiotici aminoglicosidici sono stati i primi farmaci per i quali è stata riconosciuta la capacità di bypassare codoni di stop prematuri (PTC) causati da una mutazione, consentendo la traduzione di proteine wild-type [Hermann, 2007]. Tali antibiotici, oltre alla loro attività antimicrobica, sopprimono i PTC alterando la fedeltà del sistema di traduzione e consentendo l'incorporazione di un aminoacido, che permette di continuare la normale traduzione del trascritto. L'efficacia dell'antibiotico dipende dal particolare PTC coinvolto e dalle regioni di sequenza fiancheggianti. L'aminoglicoside si lega ad un sito specifico nell'RNA ribosomale, disturbando il meccanismo di riconoscimento codone-anticodone nel sito accettore dell'aminoacil-tRNA. Ciò causa un'alterata lettura del codice dell'RNA, consentendo l'inserzione di aminoacidi alternativi nel sito del codone mutato [Gorini et al., 1964]. Dati in letteratura hanno mostrato che cellule HeLa trasfettate con vettori plasmidici esprimenti mutazioni nonsense del CFTR G542X e R553X manifestavano un incremento dosaggio-dipendente dell'espressione del CFTR in seguito al trattamento con G418 [Howard et al., 1996]. Un altro studio ha dimostrato il ripristino di funzionalità del CFTR in cellule

bronchiali IB3-1 esprimenti diverse mutazioni nonsense del gene CFTR in seguito alla somministrazione di gentamicina [Bedwell et al., 1997].

Successivamente sono stati condotti diversi trials clinici che hanno mostrato risultati analoghi, con un miglioramento dei valori di Differenza del Potenziale Nasale (NPD) indotto dalla somministrazione di gentamicina [Wilschanski M et al., 2003; Clancy et al., 2001; Sermet-Gaudelus et al., 2007]. In tutti questi studi sono emersi due principali limiti di tale approccio terapeutico:

- una variabilità di risposta dei pazienti FC alla somministrazione di gentamicina, probabilmente giustificata dai diversi livelli di degradazione mediata da NMD a cui sono sottoposti i trascritti mutati;
- i potenziali gravi effetti collaterali indotti dalla somministrazione sistemica a lungo termine della gentamicina.

Recentemente è stata proposta un'altra molecola, Ataluren o PTC124, sviluppato da un programma di screening basato sull'utilizzo di un sistema luciferasico [Welch et al, 2007]. Tale molecola non ha attività antimicrobica ed è somministrabile per via orale. Trials clinici di fase II hanno dato risultati positivi [Sermet-Gaudelus et al, 2010; Wilschanski et al., 2011], purtroppo non confermati da un trial clinico di fase III [Rowe et al., 2012].

### Terapie per mutazioni di classe II

La classe II include la mutazione più frequente, la F508del. Sono stati individuati composti, detti correttori, che hanno dato risultati promettenti nel miglioramento del processamento del CFTR [Pedemonte et al., 2005; Varga et al, 2008].

I correttori del CFTR Lumacaftor (VX-809, Vertex Pharmaceuticals, Cambridge, Mass., USA) e VX-661 (Vertex Pharmaceuticals), sono stati studiati a livello clinico. Benchè la monoterapia con Lumacaftor in adulti omozigoti per la F508del non abbia prodotto miglioramenti nella funzionalità polmonare e nei valori di NDP, è stato osservata una riduzione della concentrazione di cloro nel sudore, suggerendo un'effettiva correzione della proteina del CFTR [Clancy et al., 2012]. Per migliorare l'efficacia di questo approccio terapeutico, è stata sviluppata una strategia che combina l'azione correttiva del Lumacaftor a quella potenziatrice dell'Ivacaftor: la F508del, infatti, causa difetti non solo nel processamento del CFTR alla superficie apicale ma anche nei meccanismi di apertura del canale [Van Goor et al., 2011]. Tale terapia combinata ha determinato un miglioramento del (FEV1) (Forced Expiratory Volume in 1 second) del 7,4%, suggerendo come l'azione di un correttore abbinato ad un potenziatore possa costituire l'approccio vincente per la cura di pazienti FC portatori di mutazioni di classe II. È in corso al riguardo un trial di fase III.

### Terapie per mutazioni di classe III

Le mutazioni di classe III richiedono composti (potenziatori) che attivino la proteina del CFTR, correttamente posizionata sulla membrana apicale. Ivacaftor (Kalydeco, VX-770, Vertex Pharmaceuticals) è un potenziatore dell'attività del canale CFTR, ed è il primo farmaco approvato da FDA (Food and Drug Administration) e da EMA per pazienti portatori della mutazione G551D. E' stato scoperto da uno screening di oltre 200000 composti. Studi in vitro condotti sia su linee cellulari ricombinanti che su colture primarie di cellule epiteliali bronchiali umane hanno mostrato che VX-770 aumenta il trasporto del cloro, incrementando l'apertura del canale del CFTR, il fluido apicale e la frequenza del battito ciliare [Van Goor et al., 2009].

Un trial clinico di fase II che ha testato l'Ivacaftor in 40 pazienti FC portatori di almeno una copia della mutazione G551D, ha mostrato un miglioramento sia dei valori di NPD che di concentrazione di cloro nel sudore [Accurso et al, 2010]. Il successivo trial di fase III ha evidenziato un miglioramento del FEV1 del 10,5% in 24 settimane, accompagnato da una riduzione del 55% della probabilità di manifestare esacerbazioni polmonari e da un miglioramento dei sintomi respiratori, valutati secondo lo score di qualità della vita. In particolare la somministrazione di VX-770 ha determinato una riduzione della concentrazione di cloro nel sudore al di sotto della soglia considerata patologica di 60 mEq/litro. Risultati simili sono stati ottenuti da uno studio condotto su pazienti portatori della G551D di età compresa tra i 6 e i 12 anni, che ha portato all'approvazione del farmaco da parte di FDA e dell'autorità regolatoria europea [Aherns et al., 2011]. Sono in corso ulteriori studi per valutare la sicurezza e la farmacocinetica dell'Ivacaftor anche in pazienti FC di età inferiore (2-5 anni), ed in pazienti portatori di altre mutazioni appartenenti alla classe III.

### Terapie per mutazioni di classe IV

Mutazioni di classe IV richiedono un aumento della funzione del canale del CFTR. Un possibile trattamento potenziatore è rappresentato dall'utilizzo di composti flavonoidi, come la genisteina, che interagisce direttamente con il CFTR mediante il sito NBD, aumentando la probabilità di apertura del canale del cloro. Nella tabella sottostante sono indicati i principali composti che hanno mostrato una capacità di potenziamento della funzionalità del canale del CFTR.

Farmaco	Famiglia	Referenze
VX-770	Pirazolo	Van Goor et al, 2009; Accurso et al, 2003; Kaiser J, 2012
NS004	Benzimidazolone	Al-Nakkash L et al, 2001; Derand R et al., 2003
Genisteina	Flavonoide	Al-Nakkash L et al, 2001; Cai Z et al, 2006
Phloxine B	Phloxine	Cai Z et al., 2002
GPact-11a		Bertrand J et al., 2010

**Tabella 1.2:** potenziatori del CFTR.

### Terapie per mutazioni di classe V e VI

Mutazioni di classe V e VI riguardano il trascritto e la stabilità del CFTR. Possibili trattamenti prevedono l'incremento del livello di RNA correttamente processato; composti come 4-PBA, milrinone e genisteina potrebbero risultare utili [Roque T et al., 2008].

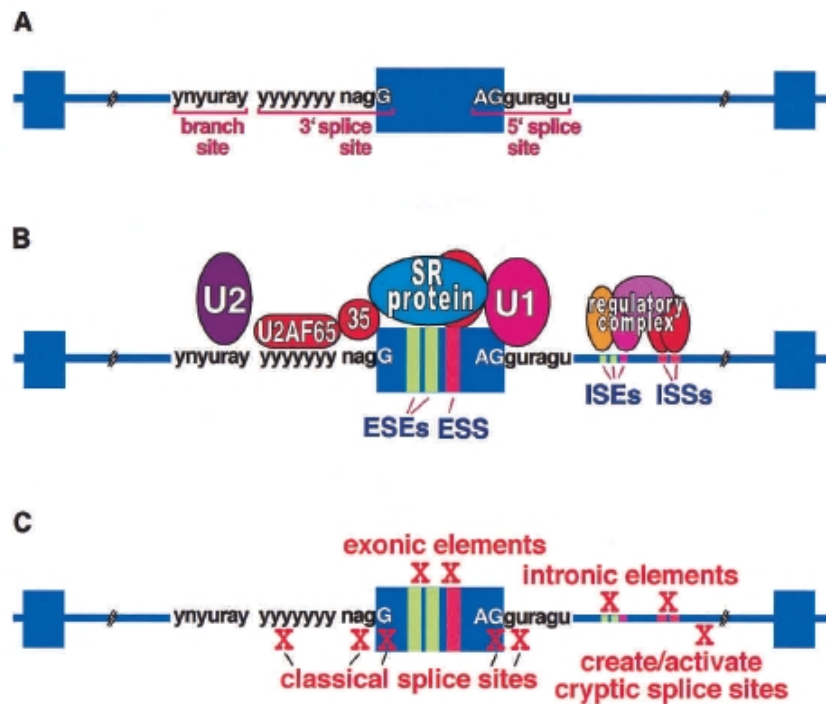
## **1.7 La modulazione dello splicing come modificatore della funzione del CFTR**

L'mRNA endogeno del CFTR è espresso a livelli molto bassi: è stato mostrato, infatti, che 1-2 trascritti per cellula possono essere sufficienti per avere centinaia di canali CFTR per cellula [Farmen t al., 2005; Trapnell et al., 1991]. Il trascritto del CFTR è inoltre sottoposto a diversi meccanismi regolatori: le regioni non tradotte in 5' e 3' (UTRs) del CFTR contengono sequenze che influenzano la regolazione post-trascrizionale e la stabilità e il processamento dell'mRNA del CFTR. Il 3' UTR sembra contenere sequenze che sono implicate nella destabilizzazione dell'mRNA e che sono controllate dalle MAP chinasi p42/p44 e p38. Il 5' UTR contiene elementi che modulano l'efficienza di traduzione della sequenza codificante del CFTR [Baudouin-Legros et al, 2005]. La funzionalità fisiologica dei canali CFTR è quindi garantita da un equilibrio molto sensibile tra il livello di espressione di trascritti wild type e l'effettiva traduzione in proteine completamente funzionanti. Risulta quindi fondamentale la comprensione dei meccanismi specifici indotti da una mutazione sull'espressione e il processamento del trascritto del CFTR: in particolare, mutazioni sinonime e mutazioni di splicing, il cui effetto patologico predittivo potrebbe sembrare trascurabile, determinano spesso meccanismi di splicing aberranti con una significativa riduzione della funzionalità proteica del CFTR.

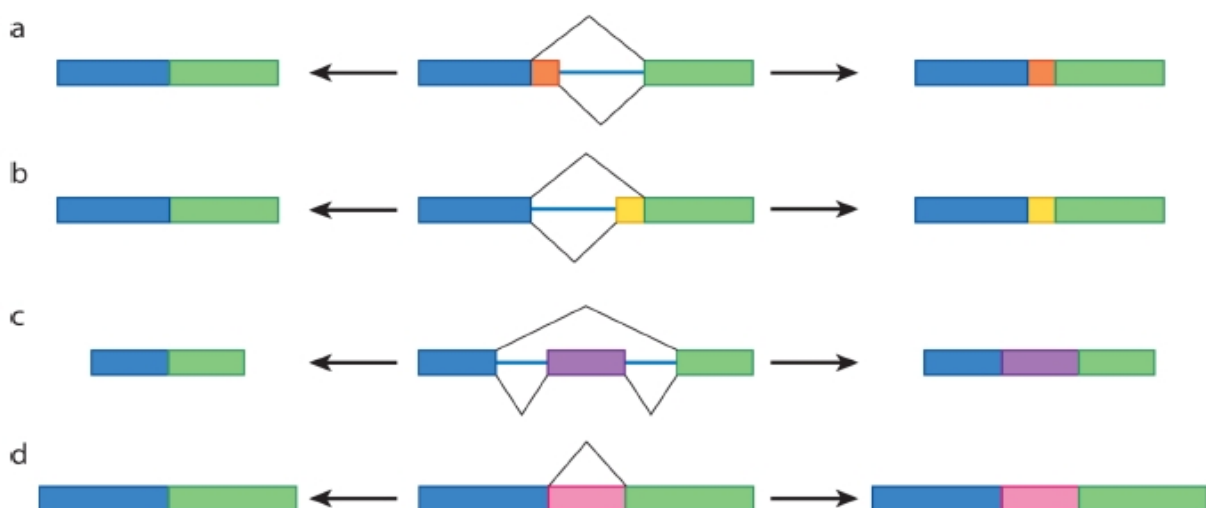
Il processamento dell'mRNA del CFTR risulta strettamente regolato; diversi esoni del CFTR (3, 4, 10, 13, 15, 18, 20 e 25) vanno incontro a meccanismi di splicing aberrante, che generano proteine non funzionanti, sia in pazienti FC che in individui sani [Bienvenu et al., 1996].

Il processo di splicing è mediato da un complesso di RNA-proteine, lo spliceosoma. Il riconoscimento delle giunzioni esone/introne dipende da quattro segnali principali posti nella sequenza dell'mRNA precursore (pre-mRNA): i siti di splicing in 5' e 3', il sito di ramificazione e il tratto di polipirimidine posto vicino al sito in 3' [Kim E et al., 2007]. Esistono inoltre diversi elementi di sequenza in cis, all'interno di esoni ed introni, che regolano il legame di fattori di splicing che agiscono in trans, mediando la selezione delle giunzioni di splicing. Molti domini di legame all'RNA riconoscono corte sequenze in cis; tali sequenze regolatorie, che possono agire da

enhancer o silencer di splicing, reclutano specifici fattori di splicing, come le proteine ricche in serina/arginina (SR) e guidano la localizzazione dello spliceosoma [Darnell RB, 2007]. La complessa rete di fattori regolatori in cis ed in trans è coinvolta non solo nei meccanismi di splicing costitutivi ma anche in quelli alternativi.



**Figura 1.6** A) rappresentazione dei principali segnali di splicing (sito in 5', sito in 3', sito di ramificazione e tratto di polipirimidine); B) rappresentazione dei componenti dello spliceosoma: sequenze in cis e fattori di splicing in trans; C) localizzazione di possibili variazioni di sequenza che agiscono come mutazioni di splicing in cis.



**Figura 1.7:** rappresentazione delle quattro tipologie di splicing alternativo: selezione di un sito di splicing in 5' alternativo (a); selezione di un sito di splicing in 3' alternativo (b); inclusione/skipping di un esone (c); inclusione di porzioni introniche (d).

Un ulteriore livello di complessità sottostante alla regolazione dello splicing alternativo è costituito dalla tessuto-specificità; ad esempio, alcune proteine che legano l'RNA presentano un'espressione tessuto-specifica. Lo splicing alternativo è influenzato anche dalle condizioni fisiologiche: è stato dimostrato che l'espressione delle varianti di splicing dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE) dipende dalle condizioni di stress; in particolare, l'isoforma AChE-R, caratterizzata dallo skipping dell'esone 6 e dall'inclusione di un introne, viene espressa in presenza di stress acuto ed esercita un ruolo protettivo neuronale [Marden JH, 2006]. Infine, anche meccanismi epigenetici sono coinvolti nella regolazione dello splicing alternativo: evidenze sperimentali hanno mostrato che i nucleosomi sono densamente localizzati nelle giunzioni esone/introne e che le modificazioni degli istoni sono correlate alla regolazione dello splicing; infatti, le acetiltrasferasi e metiltrasferasi degli istoni interagiscono con alcune piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNPs), suggerendo un ruolo nell'assemblaggio dello spliceosoma [Luco RF et al., 2011]

Circa il 12% delle mutazioni identificate nel gene CFTR alterano il corretto splicing del pre-mRNA del CFTR. Tali mutazioni possono essere divise in due sottoclassi in base alla loro posizione e all'effetto sullo splicing [Nissim-Rafinia and Kerem, 2002]. La sottoclasse I (60% delle mutazioni di splicing) include le mutazioni che modificano i siti di splicing intronici, causando il mancato riconoscimento degli esoni. Appartengono a questo gruppo le mutazioni 621+1G>T, 711+1 G>T e 1525-1 G>A [Ramalho et al, 2003; Zielenski et al., 1993]. Queste mutazioni, provocando la completa mancanza di trascritti correttamente processati, sono responsabili di un fenotipo clinico severo, caratterizzato da malattie polmonari, insufficienza pancreatica.

La sottoclasse II comprende le mutazioni introniche che danno origine sia ai trascritti corretti sia ai trascritti aberranti, indebolendo o rafforzando i motivi di riconoscimento esonico, come la 3849+10 kb C>T, la 2789+5 G>A, la 3272-26 A>G [Pagani et al., 2003; Ramalho et al., 2002]. La sottoclasse II include anche le mutazioni introniche che generano siti criptici donatori o accettori di splicing, determinando l'inclusione parziale di sequenze introniche. Infine esistono mutazioni e polimorfismi che alterano sequenze di regolazione dello splicing poste nelle regioni esoniche.

Le mutazioni di classe II sono associate a forme più lievi di FC, in quanto compatibili con il mantenimento di livelli residui di trascritti corretti del CFTR. Tuttavia si manifesta una grande variabilità nel fenotipo clinico, sia tra diversi pazienti, sia tra diversi organi dello stesso soggetto.

Per valutare l'esistenza di una correlazione tra il livello di RNA correttamente processato e la gravità della malattia polmonare, sono stati condotti diversi studi in cui sono stati analizzati i trascritti prodotti da alleli portatori di mutazioni di splicing nell'epitelio respiratorio dei pazienti

[Chiba-Falek et al., 1998; Chillon et al., 1995; Highsmith et al., 1997; Ramalho et al., 2002; Rave-Harel et al., 1997]. Questi studi hanno rivelato che esiste una correlazione inversa tra il livello di trascritto wild-type e la sintomatologia polmonare. Ad esempio, la mutazione 1811+1.6 kb A>G genera l'1-3% di trascritti normali ed è associata ad una forma severa di FC, mentre le mutazioni 2789+5 G>A e 3272-26 A>G, che producono il 4-5% dei trascritti corretti, sono responsabili di forme più lievi. Inoltre il livello di trascritti normali varia tra diversi organi dello stesso paziente, in base all'entità del fenotipo clinico manifestato nei vari tessuti. Uno studio riguardante l'allele IVS9-5T nell'epitelio respiratorio e nell'epididimo dello stesso paziente ha mostrato che il livello di trascritti normali differisce tra l'epitelio respiratorio e l'epididimo in soggetti CBAVD (rispettivamente 26-37% e 10-24%), mentre è equivalente in pazienti FC con CBAVD e patologie polmonari [Rave-Harel et al., 1997].

La correlazione tra i livelli di RNA sottoposto a splicing corretto e la gravità della malattia suggerisce che il livello di trascritto normale del CFTR costituisca la base molecolare della variabilità fenotipica tra pazienti FC portatori di mutazioni di splicing. Il meccanismo di splicing è strettamente regolato dall'interazione tra fattori di splicing e sequenze modulatrici [Black, 2003]. Sono state osservate differenze nei livelli di fattori di splicing funzionanti tra diversi tessuti, suggerendo un loro ruolo nella regolazione tessuto-specifica dei livelli di trascritti alternativi. È stato quindi ipotizzato che la regolazione dello splicing costituisca un modificatore genetico della gravità della malattia in pazienti portatori di mutazioni di splicing [Nissim-Rafinia e Kerem, 2002].

In letteratura sono presenti diversi studi di valutazione dell'effetto dell'overespressione di fattori di splicing sul livello di espressione di trascritti del CFTR wild-type prodotti da costrutti minigenici portatori di mutazioni di splicing (tabella 1.3). Tra i fattori presi in considerazione in questi studi vi sono la ribonucleoproteina nucleare A1 (appartenente alla famiglia di hnRNP), proteine SR (ASF/SF2, SRp20, SRp30c, SRp40, SRp55, SRp75 e SC35), Htra2-β1 e Htra2α. Nella tabella 1.3 sono riassunti i principali risultati ottenuti in seguito all'overespressione di fattori di splicing in costrutti minigenici portatori di mutazioni di splicing del CFTR.

Mutazione	Localizzazione	Esone/introne coinvolto	Fattore di Splicing overespresso	Effetto	Correzione	Referenze
A445E	Esone 10	/Esone 10	ASF/SF2	skipping	-	Pagani et al., 2003
IVS9-5T	Introne 9	/esone 9	ASF/SF2	skipping	-	Nissim-Rafinia et
			SRp20,	skipping	-	

			SRp30c			al., 2000; Pagani et al., 2000
			SRp40, SRp55	skipping	-	
			SRp75, SC35	skipping	-	
			hnRNP A1	skipping	-	
			E4-ORF3	inclusion	+	
			E4-ORF6	-		
D565G	Esone 13	/esone 13	ASF/SF2	skipping	-	Pagani et al., 2003
			SRp40, SRp55	skipping	-	
			SRp75	skipping	-	
			hnRNP A1	skipping	-	
			PTB	-	-	
G576A	Esone 13	/esone13	ASF/SF2	skipping	-	Pagani et al., 2003
			SRp40, SRp55	skipping	-	
			SRp75	skipping	-	
			hnRNP A1	skipping	-	
			PTB	-	-	
D651N	Esone 14	/248 pb	ASF/SF2	skipping	-	Aznarez et al., 2003
E656X	Esone 14	/248 pb	Htra2 $\alpha$	Inclusion	+	Aznarez et al., 2003
2108delA	Esone 14	/248 pb	Htra2 $\alpha$	Inclusion	+	Aznarez et al., 2003
E664X	Esone 14	/248 pb	ASF/SF2	Skipping	-	Aznarez et al., 2003
T665S	Esone 14	/248 pb	ASF/SF2	skipping	-	Aznarez et al., 2003
3849+10kb C>T	Introne 22	/84 pb	hnRNP A1	Skipping	+	Nissim-Rafinia et al., 2000
			E4-ORF6	skipping	+	
3849+10kb C>T	Introne 22	/84 pb	ASF/SF2	skipping	+	Nissim-Rafinia et al., 2004
			SC35	skipping	+	
			Htra- $\beta$ 1	skipping	+	
			E4-ORF6	Inclusion	-	

**Tabella 1.3:** riassunto dei diversi studi basati su costrutti minigenici in cui è stato valutato l'effetto dell'overespressione di fattori di splicing sul corretto processamento di trascritti del CFTR in presenza di mutazioni di splicing.



## **1.8 La regolazione post-trascrizionale: la degradazione mediata da mutazioni nonsense (NMD)**

Un ulteriore meccanismo di regolazione dell'espressione di CFTR wild-type è rappresentato dalla degradazione NMD, indotta dalla presenza di codoni di stop prematuri (PTC) nel trascritto. La valutazione del livello di degradazione NMD a cui sono sottoposti trascritti aberranti è fondamentale per la comprensione dei reali danni molecolari causati da una mutazione. Infatti, gli approcci terapeutici basati su composti che bypassano i PTC, risultano essere efficaci solo nel caso in cui i trascritti aberranti mantengano un buon livello di espressione. La valutazione dell'NMD associata ai trascritti portatori di determinate mutazioni costituisce quindi un importante requisito per la selezione delle mutazioni realmente trattabili con i nuovi farmaci, precedentemente descritti. L'NMD può essere a sua volta regolata, utilizzando ad esempio small interfering RNA (siRNA) specifici per i fattori UPF1 o UPF2 [*Linde L et al., 2007*].

Infine, la stabilità delle diverse forme di trascritto del CFTR prodotte in presenza di una determinata mutazione deve essere considerata per la corretta quantificazione del livello residuo di CFTR completamente funzionale mantenuto dalla specifica variazione di sequenza [*Ramalho et al., 2002*].

## 2 SCOPO DELLA TESI

Questo progetto di dottorato si è focalizzato sull'identificazione e la caratterizzazione di mutazioni nel gene CFTR non riscontrabili mediante le metodiche diagnostiche di routine condotte a livello di DNA. Come detto, l'analisi estesa del CFTR su DNA consente di raggiungere una detection rate di circa il 94%: il 6% degli alleli FC sottoposti ad approfondimento diagnostico presso il Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica in Lombardia rimane quindi non caratterizzato. L'identificazione delle due mutazioni causative della patologia è però fondamentale anche in presenza di una chiara diagnosi clinica, poiché ciascuna variazione di sequenza/riarrangiamento genico determina un danno molecolare di natura ed entità differente. La conoscenza della mutazione patogenetica consente di indagare la gravità del danno a carico della proteina del CFTR e di indirizzare il paziente ad eventuali terapie mirate. Il progetto di dottorato si è sviluppato intorno a tre tematiche di ricerca principali:

- Caratterizzazione molecolare di pazienti FC mediante analisi del trascritto del CFTR in seguito ad estrazione dell'RNA dall'epitelio nasale (brushing): tale livello di analisi ha consentito di identificare nuove mutazioni, il cui significato patogenetico è stato confermato mediante studi combinati in vitro ed in vivo;
- Valutazione di linfociti e linee linfoblastoidi allestite da pazienti FC come tessuto target per l'analisi qualitativa e quantitativa del trascritto del CFTR, in alternativa all'epitelio nasale;
- Applicazione di approcci di sequenziamento di nuova generazione finalizzata al miglioramento dell'efficacia ed efficienza dello screening mutazionale del CFTR.

## 3 MATERIALI e METODI

### 3.1 Screening mutazionale del gene CFTR a livello di DNA

Lo screening mutazionale del gene CFTR su DNA viene eseguito mediante tre livelli progressivi di analisi molecolare:

- ✓ PRIMO LIVELLO: analisi di un pannello di mutazioni più frequenti mediante kit commerciale basato sulla tecnica di *reverse dot blot* (Inno-Lipa CFTR19, Inno-Lipa CFTR17+TnUpdate, Inno-Lipa CFTR-Italian Regional – Innogenetics, Ghent, Belgium);
- ✓ SECONDO LIVELLO: ricerca di riarrangiamenti (delezioni/duplicazioni) mediante kit MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) (MRC-Holland, Amsterdam);
- ✓ TERZO LIVELLO: analisi dei 27 esoni del gene CFTR mediante sequenziamento Sanger.

#### 3.1.1 Estrazione del DNA da sangue periferico

Il DNA dei soggetti con sospetta diagnosi di FC, sottoposti ad approfondimento diagnostico, viene estratto da un campione di sangue periferico (prelevato in provette EDTA), utilizzando il kit FUJIFILM (QuickGene DNA whole blood kit S, Tokyo, Japan).

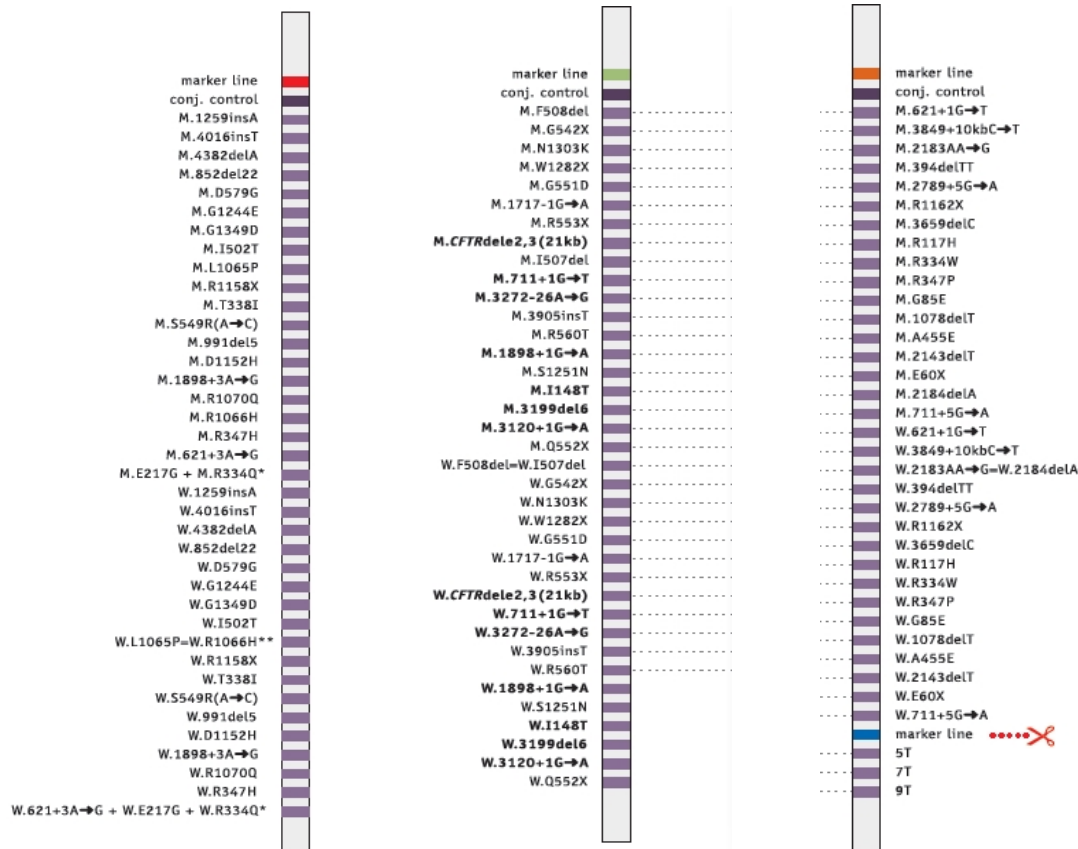
Un'aliquota di 300 µl di sangue viene trattata con 45 µl di Proteasi Fuji e con 375 µl di soluzione di lisi. Dopo aver vortexato vigorosamente, viene effettuata un'incubazione a 56°C per 7-10' per attivare la proteasi. Al termine della digestione, vengono aggiunti 375 µl di etanolo assoluto e si procede al trasferimento della soluzione nelle apposite colonnine dislocate all'interno dell'estrattore semiautomatico; viene quindi attivato il programma di estrazione, che consiste nel legame del DNA alla membrana della colonnina, in diversi passaggi di lavaggio e nell'eluizione finale.

#### 3.1.2 Reverse dot blot

La tecnica prevede una reazione polimerasica a catena (PCR) multipla in grado di amplificare differenti regioni del gene. A questa fa seguito una reazione di ibridazione allele specifica tra i prodotti della PCR e le sonde molecolari oligonucleotidiche complementari alla sequenza normale o a quella mutata. Le sonde allele specifiche, che portano un gruppo amminico in posizione 5', vengono fatte aderire stabilmente ad una membrana di nylon carica negativamente.

Dopo l'ibridazione tra le sonde e il DNA amplificato, nel quale è incorporato dUTP biotinilato, si

procede alla visualizzazione colorimetrica con una reazione di tipo biotina-streptavidina-fosfatasi alcalina (Figura 3.1). Il kit commerciale utilizzato (Inno-Lipa CFTR19, Inno-Lipa CFTR17+TnUpdate, Inno-Lipa CFTR-Italian Regional – Innogenetics) consente la ricerca contemporanea di 59 mutazioni (F508del, G542X, N1303K, W1282X, G551D, 1717-1G->A, R553X, CFTRdel 2.3 (21Kb), I507del, 711+1G->T, 3272-26A->G, 3905insT, R560T, 1898+1G->A, S1251N, I148T, 3199del6, 3120+1G->A, Q552X, 621+1G->T, 3849+10Kb C->T, 2183AA->G, 394delTT, 2789+5G->A, R1162X, 3659delC, R117H, R334W, R347P, G85E, 1078delT, A455E, 2143delT, E60X, 2184delA, 711+5G->A, Locus TN, 1259insA, 4016inT, 4382delA, 852del22bp, D579G, G1244E, G1349D, I502T, L1065P, R1158X, T338I, S549R (A->C), 991del5, D1152H, 1898+3 A->G, R1070Q, R1066H, R347H, 621+3 A->G, E217G,



R334Q).

**Figura 3.1:** Strips utilizzate nella metodica di *reverse dot blot* Inno-Lipa. Da sinistra a destra sono riportate le strips CFTR-Italian Regional, CFTR19, CFTR17+TnUpdate.

### 3.1.3 MLPA

Il MLPA è una tecnica che consente la rilevazione di delezioni o duplicazioni di interi geni o parti di essi; questa metodica si basa sull'ibridazione di sonde sequenza-specifiche al DNA genomico e la loro conseguente amplificazione.

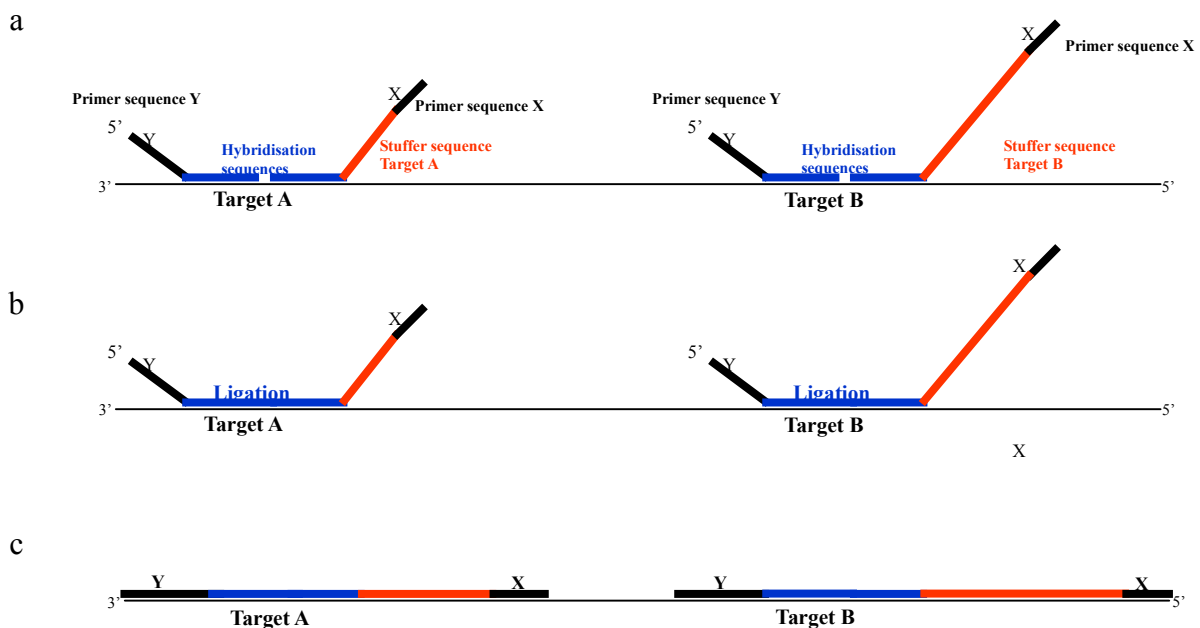
Ogni sonda si compone di due elementi, due oligonucleotidi A e B che ibridano in siti immediatamente adiacenti uno all'altro. Uno di questi (A) è costituito da una sequenza target-

specifica (20-30 nucleotidi) legata ad una sequenza primer forward universale (Y) e può essere generato sinteticamente. L'altro (B) è costituito anch'esso da una sequenza target-specifica (25-43 nucleotidi) ad una estremità e da una sequenza primer reverse universale (X) all'altra estremità, ma ha nel mezzo una sequenza dalla lunghezza variabile, detta "stuffer sequence" (da 19 a 370 nucleotidi), che genera una differenza di lunghezza nelle sonde necessaria per la risoluzione della successiva corsa elettroforetica.

Le due parti di una sonda sono disegnate in modo che le sequenze target-specifiche si leghino al DNA target in modo adiacente e possano dunque essere congiunte grazie all'impiego di una ligasi.

Questo genera una sonda continua che ha alle estremità dei primer universali e che può di conseguenza essere amplificata tramite PCR con l'utilizzo di una sola coppia di primer di cui uno è marcato, mentre le sonde che non si ibridano con il DNA target non possono essere amplificate.

Ogni prodotto di amplificazione ha una lunghezza specifica (il range delle dimensioni va da 130 a 480 bp).



**Figura 3.2.** Principio del MLPA. (a) Ibridazione di specifiche sonde a sequenze bersaglio di DNA genomico per 16h a 60°C. (b) Ligazione. (c) Amplificazione con PCR utilizzando una sola coppia di primers. [www.mlpa.com]

I prodotti della PCR vengono caricati sul sequenziatore ABI Prism 3130xl insieme ad un ladder GeneScan™ 500 ROX™ e separati tramite elettroforesi capillare. Il software Gene Mapper elabora l'emissione in fluorescenza dei campioni analizzati utilizzando ROX 500 come standard. Il profilo di separazione di ogni campione viene poi visualizzato grazie al GeneScan Analysis Software che identifica e fornisce l'area e l'altezza di ogni picco in relazione allo standard interno, offrendo un elettroferogramma. Poiché la quantità di sonde congiunte prodotte è proporzionale al numero di copie del target presenti nel campione, l'altezza ridotta di un picco indicherà una riduzione nel

numero di copie del frammento (delezione) mentre un aumento del numero di copie (duplicazione) risulterà in un picco di altezza aumentata.

Nonostante l'amplificazione MLPA sia altamente riproducibile, saranno sempre presenti alcune sequenze la cui amplificazione per ciclo sarà inferiore dell'1-2% rispetto alle altre, risultando in un'area di picco finale minore. Per questo un singolo profilo di amplificazione MLPA non è sufficiente a determinare se ci siano state variazioni nel numero di copie: i profili dei picchi ottenuti dai campioni devono sempre essere confrontati con profili simili ottenuti da almeno tre campioni di DNA-controllo negativo (wild type).

Tramite il confronto con questa reazione di controllo, l'area relativa del picco di ciascun prodotto di amplificazione riflette il numero relativo di copie della sequenza bersaglio della sonda nel campione analizzato.

Infine, i valori ottenuti con GeneScan Analysis Software vengono analizzati tramite un altro software, Coffalyser, che normalizza tutti i dati immessi, sia dei WT che dei pazienti. La normalizzazione che abbiamo applicato è Direct analysis Control Probe che consiste in tre fasi:

- 1° fase: tutti i picchi riconoscibili per le loro dimensioni inferiori, vengono eliminati.
- 2° fase: rimasti solo i picchi dei prodotti MLPA attesi, il software divide l'area del picco di ogni prodotto di amplificazione per la somma delle aree di tutti i picchi di controllo dello stesso campione. Questa procedura deve essere applicata sia ai campioni in analisi che ai WT.
- 3° fase: viene confrontato il valore normalizzato di ogni picco di ciascun campione alla media dei valori corrispondenti ottenuti dai WT.

In seguito alla normalizzazione e all'analisi dei campioni, è possibile ottenere per ogni sonda un numero puro uguale a 1 nel caso in cui il frammento analizzato non sia deletato o duplicato. Al contrario, la presenza di una delezione in eterozigosi sarà evidenziata da un risultato compreso tra 0,7 e 0,45 (corrispondente ad una riduzione dell'area relativa del picco pari al 30-55%), mentre una delezione in omozigosi sarà caratterizzata da un valore pari a zero (corrispondente all'assenza completa del picco). Una duplicazione mostrerà invece un valore superiore a 1,3 (corrispondente ad un aumento dell'area relativa del picco superiore al 30%).

Questo comporta però la presenza di un range di valori, non compresi negli intervalli precedentemente descritti, in cui non è possibile stabilire se i dati ottenuti corrispondano ad una delezione o ad una duplicazione, dunque questi risultati sono da considerarsi borderline. In questi casi sarà necessario ripetere l'esperimento o, se non si ha la possibilità di definire con il solo metodo MLPA la presenza o assenza del riarrangiamento, sarà necessaria un'ulteriore analisi.

Il protocollo da utilizzare per l'analisi MLPA è il seguente:

- Disciogliere il DNA estratto (circa 100/200 ng) in H<sub>2</sub>O milliQ o TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.2;

EDTA 1 mM) per un volume finale di 5  $\mu$ l.

- Denaturare per 5 minuti a 98°C; lasciare raffreddare fino a 40°C prima di aprire il termociclatore.
- Aggiungere una mix contenente 1.5  $\mu$ l di SALSA Probe-Mix + 1.5  $\mu$ l di MLPA Buffer ad ogni provetta.
- Denaturare per 1 minuto a 95°C.
- Incubare dalle 16 alle 20 ore a 60 °C nel termociclatore.
- Ridurre la temperatura del termociclatore a 54°C ed aggiungere 32  $\mu$ l di Ligase-65 mix così composta:
  - 3  $\mu$ l di Ligase-65 Buffer A + 3  $\mu$ l di Ligase-65 Buffer B + 25  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O milliQ + 1  $\mu$ l di Ligase-65.
  - Incubare per 15 minuti a 54°C e riscaldare per 5 minuti a 98°C (inattivazione della ligasi).
- Preparare in una nuova provetta la mix per la PCR così composta:
  - 4  $\mu$ l SALSA PCR Buffer + 26  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O milliQ + 2  $\mu$ l SALSA PCR-primers + 2  $\mu$ l SALSA Enzyme Dilution Buffer + 5.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O milliQ + 0.5  $\mu$ l SALSA Polymerase.
- Aggiungere alla mix per la PCR 10  $\mu$ l MLPA Ligation Reaction ed impostare le condizioni di PCR per 35 cicli:

95° C	30"	35 cicli
60° C	30"	
72° C	60"	
72° C	20'	1 ciclo
10° C	10'	1 ciclo

-

- Preparare sulla piastra del sequenziatore, per ogni campione, una mix composta da: 1  $\mu$ l del prodotto di reazione, 0,5  $\mu$ l di GeneScan<sup>TM</sup>500 ROX<sup>TM</sup> standard e 10  $\mu$ l di formamide.
- Denaturare i campione a 98° per 3 minuti.

Caricare la piastra sul sequenziatore.

### 3.1.4 Sequenziamento Sanger

Il Sequenziamento Sanger si basa sul principio per il quale la DNA-polimerasi non è in grado di estendere una sequenza nucleotidica in seguito all'inserimento di un dideossinucleotide (ddNTP); quest'ultimo, un analogo del deossinucleotide (dNTP), è caratterizzato dall'assenza del gruppo ossidrilico (OH) in 3' necessario per promuovere la formazione del legame fosfodiesterico 5-3'

successivo. Ciascun double strand ottenuto mediante PCR rappresenta lo stampo per due diverse reazioni di sequenziamento eseguita con i primers utilizzati per l'amplificazione, primer forward e primer reverse. Con un singolo primer per volta, si eseguono quindi due reazioni di sequenziamento nella cui mix si aggiungono sia i deossinucleotidi (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) normali, sia gli analoghi ddNTP (dideoossinucleotidi) fluorescenti i quali, una volta inseriti nella catena polinucleotidica in allungamento, non permettono un'ulteriore estensione della stessa (Big Dye Terminator Kit – Applied Biosystem®).

La competizione per l'incorporazione nella catena di DNA in crescita tra un ddNTP ed il suo analogo normale dNTP dà come risultato una popolazione di frammenti di lunghezze diverse con l'estremità 3' marcata con fluorescenza diversa a seconda del ddNTP inserito.

Questa tecnica consente quindi l'analisi completa delle sequenze codificanti e di parte delle sequenze introniche del gene CFTR (7 e 11).

Le reazioni di sequenziamento vengono eseguite in un volume finale di 10 µl, preparando la seguente mix:

Buffer Big dye terminator® 5X	1 µl
Big dye terminator ready reaction mix®	0.8 µl
H <sub>2</sub> O	a volume
Primer (Forward o Reverse)	5 µM
Templato (Prodotto di PCR)	25 ng

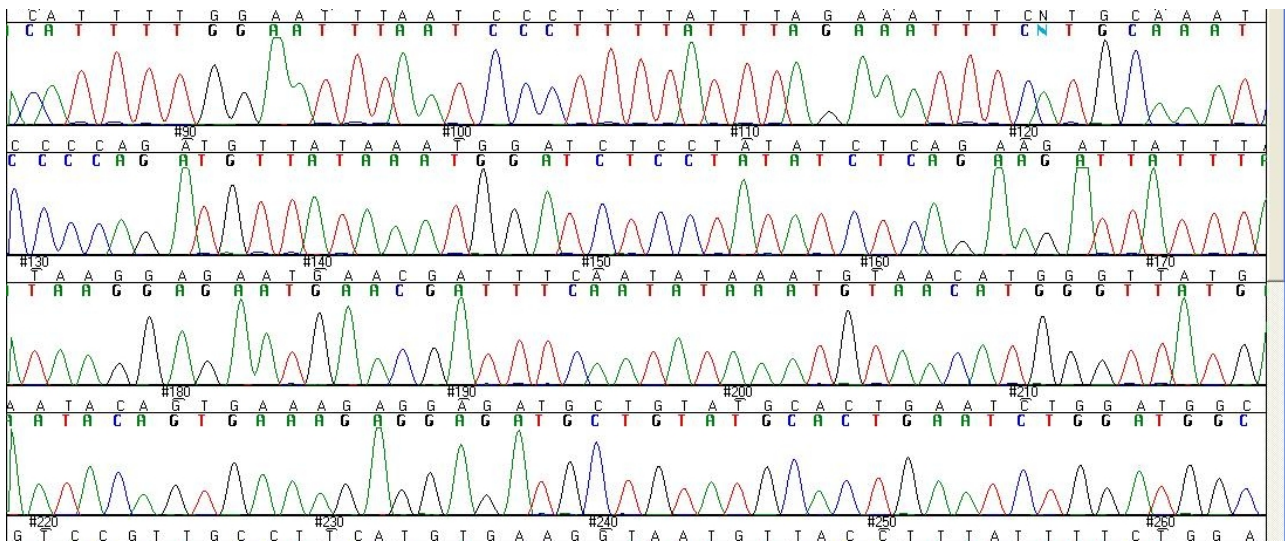
Il protocollo di sequenziamento eseguito in un termociclatore prevede:

96°C	60''	25 cicli
96°C	30''	
50°C-44°C	5''	
60°C	4'	

I prodotti del sequenziamento sono frammenti con lunghezze diverse che vengono caricate sul sequenziatore (ABI Prism 3130xl) che, grazie ad un'elettroforesi capillare, riconosce i quattro fluorofori. Il software (Sequencing Analysis) interpreta le misure di fluorescenza registrate dal rilevatore in ogni posizione della catena nucleotidica e le elabora. Viene così prodotto un elettroferogramma, dove le informazioni vengono trasformate in picchi di colore diverso a seconda del ddNTP incorporato, con aree proporzionali all'intensità dell'emissione. L'interpretazione degli elettroferogrammi può essere effettuata mediante software SeqScape® 2.5 (AppliedBiosystem), in cui la sequenza di interesse viene allineata con un elettroferogramma wild-type, al fine di



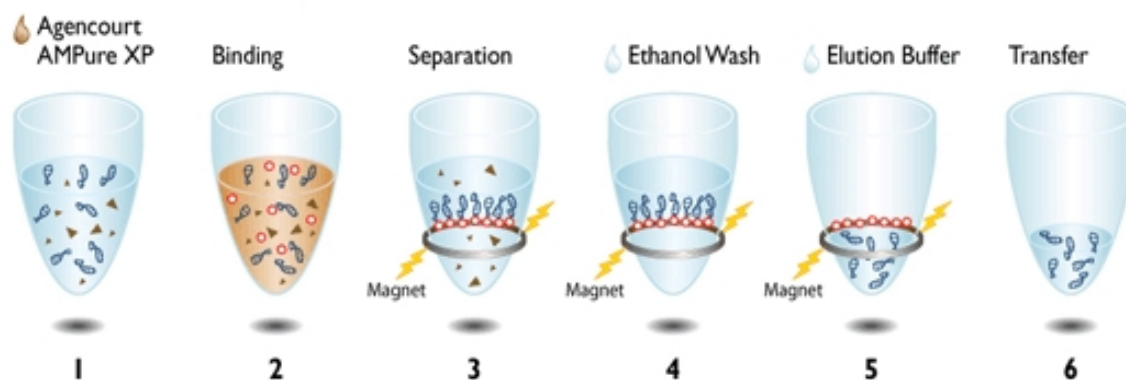
identificare variazioni in eterozigosi o in omozigosi.



**Figura 3.3:** esempio di un elettroferogramma visualizzato con software SeqScape® 2.5.

### Purificazione

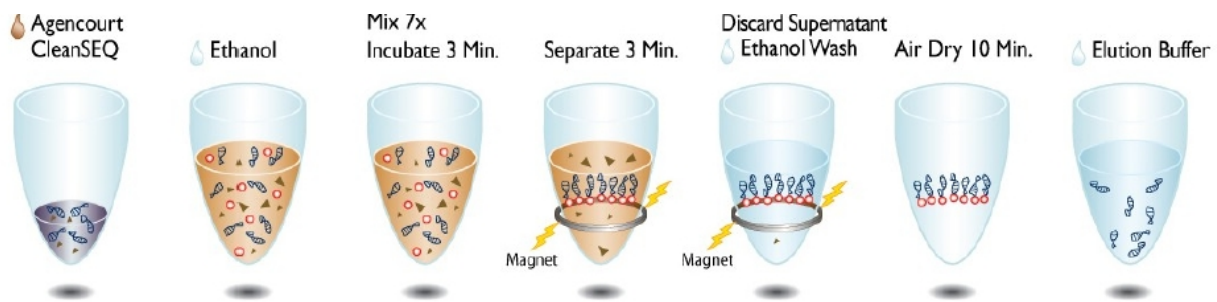
La purificazione dei prodotti di PCR e di sequenziamento viene effettuata utilizzando il liquid handling Biomek 3000 (Beckman Coulter). I prodotti di amplificazione vengono purificati utilizzando il sistema AGENCOURT® AMPURE® XP, basato sulla tecnologia a biglie paramagnetiche in fase solida, seguendo il protocollo standard.



**Figura 3.4:** Rappresentazione schematica del processo di purificazione dei prodotti di amplificazione. 1: reazione di PCR; 2: legami dei prodotti di amplificazione alle biglie magnetiche; 3: separazione degli ampliconi legati alle biglie magnetiche dai contaminanti; 4: lavaggio degli ampliconi con etanolo; 5: eluizione dei prodotti di PCR dalle particelle magnetiche; 6: trasferimento dalle biglie a una nuova piastra.

I prodotti delle reazioni di sequenziamento vengono purificati con il sistema AGENCOURT® CLEANSEQ®, basato sulla tecnologia SPRI® (Solid Phase Reversible Immobilization) con biglie

magnetiche.



**Figura 3.5:** Rappresentazione schematica del processo di purificazione dei prodotti di sequenziamento. 1: legame dei prodotti di sequenziamento alle biglie magnetiche e separazione su piastra magnetica; 2: lavaggio delle biglie per rimuovere nucleotidi, sali ed altri contaminanti; 3: eluizione del DNA in buffer acquoso.

### 3.2 Estrazione dell'RNA totale da cellule dell'epitelio nasale prelevate mediante brushing

L'estrazione dell'RNA utilizzato si effettua da cellule della cavità nasale (epitelio nasale), prelevate mediante spazzolamento. Il prelievo consiste nell'introduzione di un bastoncino, la cui estremità è dotata di setole, nelle cavità nasali per una profondità di circa 3 cm. Una volta inserito, viene fatto ruotare di 360° in entrambi i versi; per ottenere una quantità di cellule adeguata all'analisi è necessario effettuare lo spazzolamento di entrambe le narici. La spazzola (brush) utilizzata è sterile ed ha uno spessore di 2.5 mm; dopo il prelievo, viene posta all'interno di una pipetta Pasteur contenente 5 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline) (Figura 3.6)



**Figura 3.6:** Cytobrush utilizzato per il prelievo delle cellule dell'epitelio nasale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen), una soluzione mono-fasica di fenolo e guanidina isotiocianato, che oltre a costituire un potente inibitore di RNasi, svolge un'azione denaturante delle proteine. Dopo la lisi della membrana cellulare, si estrae l'RNA con cloroformio-isopropanolo. Il pellet formato dall'RNA subisce un lavaggio con etanolo al 75% al fine di rimuovere tutte le impurità e, successivamente, si reidrata con acqua DEPC (Di-Etil-Poli-Carbonato), contenente inibitori delle RNasi. Tutte le procedure elencate devono essere effettuate in ghiaccio:

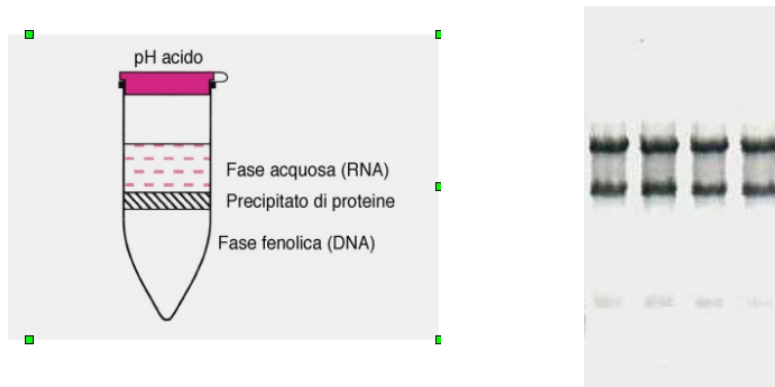
- ✓ Risospendere in 5 ml di PBS sterile per lavare le cellule;

- ✓ Centrifugare a 3500 RPM per 8 minuti a 6°C;
- ✓ Eliminare il surnatante e risospendere le cellule con 800 µl di TRIzol;
- ✓ Trasferire la sospensione in una eppendorf da 2 ml;
- ✓ Miscelare bene nell'eppendorf fino a quando il TRIzol risulta essere limpido;
- ✓ Incubare 5 minuti a temperatura ambiente;
- ✓ Aggiungere 350 µl di CLOROFORMIO (*Carlo Erba*);
- ✓ Agitare vigorosamente;
- ✓ Incubare 5 minuti;
- ✓ Centrifugare 20 minuti a 13000 RPM a 8 °C;
- ✓ Trasferire la fase acquosa (contenente l'RNA) in una eppendorf, facendo attenzione a non prelevare l'interfase costituita da proteine e DNA;
- ✓ Aggiungere 1 ml di ISOPROPANOLO (*Carlo Erba*);
- ✓ Incubare 30 minuti in ghiaccio;
- ✓ Centrifugare 20 minuti a 13000 RPM a 4°C;
- ✓ Eliminare il surnatante;
- ✓ Aggiungere 400 µl di ETANOLO 75% preparato precedentemente in H<sub>2</sub>O DEPC 0,1%;
- ✓ Flickare l'eppendorf facendo staccare il pellet;
- ✓ Centrifugare 5 minuti a 8000 RPM a 4°C;
- ✓ Eliminare il surnatante;
- ✓ Asciugare il pellet per 5-10 minuti;
- ✓ Risospendere il pellet in 100 µl di H<sub>2</sub>O DEPC 0,01%;

La qualità dell'RNA estratto viene valutata misurando i valori dei rapporti 260/280 e 260/230 al Nanodrop.

È possibile verificare l'integrità dell'RNA estratto mediante elettroforesi su gel di agarosio. Le specie più abbondanti di RNA sono le molecole 28S, 18S, 5.5S e 5S. Se queste appaiono come bande distinte su gel d'agarosio, con ogni probabilità anche le altre molecole lo sono. La banda 28S deve mostrare un segnale pari al doppio della banda del 18: tale banda fornisce un'idea dell'RNA TOTALE; la banda 18S è invece un indicatore dell'mRNA.

Le bande 5.5S e 5S non sono sempre visibili: sono dunque considerate come un indicatore fine dell'esecuzione dell'estrazione.



**Figura 3.7:** Sinistra: separazione delle fasi in presenza di trizol e cloroformio per l'estrazione dell'RNA; destra: profilo elettroforetico di campioni di RNA estratto da cellule epiteliali nasali.

### 3.3 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione è un'amplificazione in vitro condotta mediante l'uso di una trascrittasi inversa. Si tratta di un enzima che consente di partire dall'RNA totale estratto in precedenza, e di ottenere DNA a doppio filamento. Il *kit* (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Life Technologies) di trascrizione inversa utilizzato agisce mediante dei *random primers*. Essi si legano alle molecole di RNA in maniera aspecifica.

Il *kit* contiene:

- RT *buffer* 10X;
- dNTPs 100mM;
- *random primers*;

Il protocollo di retrotrascrizione applicato è il seguente:

- Preparare la mix per la reazione in ghiaccio contenente tutti i reagenti:

RT buffer 10X	2 $\mu$ l
DNTPs 100 mM	0,8 $\mu$ l
Random Primers	2 $\mu$ l
Enzima Multiscribe	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
Acqua sterile	3.2 $\mu$ l

- distribuire la mix di reazione nelle eppendorf e aggiungere 1  $\mu\text{g}$  di RNA in un volume di 10  $\mu\text{l}$ .
- Procedere alla reazione di Retrotrascrizione:

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	25	37	85	4
Tempo (minuti)	10'	120'	5"	$\infty$

### 3.4 Sequenziamento del cDNA

Il cDNA viene amplificato mediante PCR in sei frammenti overlappanti che coprono l'intero gene, mediante l'utilizzo della polimerasi FastStart Taq DNA Polymerase (Roche). Le condizioni di amplificazione sono le seguenti: denaturazione iniziale a  $95^{\circ}\text{C}$  per 6 minuti; 35 cicli di  $95^{\circ}\text{C}$  per 30s, annealing a  $60^{\circ}\text{C}$  per 1 min ed estensione a  $72^{\circ}\text{C}$  per 2 min; estensione finale a  $72^{\circ}\text{C}$  per 8 minuti. I prodotti di PCR vengono verificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5%, per verificare eventuali delezioni/inserzioni e splicing alternativi. L'analisi di sequenza viene condotta mediante il sistema ABI PRISM 3130XL (Life Technologies).

Frammento	Esoni amplificati	Forward primer	Reverse primer	Lunghezza
A	1-8	AF: GCTCCAAGAGAGTCATACCA	AR: CGAGAGACCATGCAGAGGTC	1108 pb
B	8-14	BF: GACAAACAGAACTGAAACTG	BR: ATGGAACATTTTAAAGAAAGC	974 pb
C	12-14	CF: ACTCCTTTAAGTCTTCTTCG	CR: GTGGAGGTCAACGAGCAAGA	849 pb
D	14-20	DF: AATTGGACTCCTGCCTTCAG	DR: GACAACAGCATCCACACGAA	793 pb
E	18-21	EF: GAAATGTTCTCTAATATGGC	ER: AGATTCTCCAAAGATATAGC	1100 pb
F	21-27	FF: CGAGCTCCAATTCCATGAGC	FR: ACGTGAAGAAAGATGACATC	950 pb

**Tabella 1:** Elenco dei primers utilizzati per il sequenziamento del cDNA del CFTR.

### 3.5 Analisi in silico

La sequenza mutata viene analizzata mediante l'utilizzo di specifici algoritmi per predire possibili

alterazioni nello splicing o nella funzionalità. I siti di splicing in 5' e 3' vengono analizzati mediante i software:

- 1) **NNSplice** ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html));
- 2) **Spliceview** (<http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html>);
- 3) **ESEfinder** (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>).

L'interfaccia web di ESEfinder consente di analizzare la sequenza mutata utilizzando quattro modelli in silico che predicano sequenze enhancer esoniche di splicing (ESEs) riconosciute da proteine ricche in serina-arginina (SR), come SF2/ASF, SC35, SRp40 e SRp55. Queste matrici sono derivate da pools di sequenze enhancer funzionali selezionate iterativamente in vitro e sono associate a valori di score. Le soglie di default utilizzate sono 1.956 per SF2/ASF, 2.383 per SC35, 2.670 per SRp40 e 2.676 per SRp55. Il sistema di score di ESEfinder varia dalla soglia di default (nessun effetto da parte della mutazione) a valori positivi, che predicano un aumento di probabilità che una specifica mutazione crei un danno a livello molecolare. Con questo modello è stato analizzato anche l'effetto della mutazione c.1584+18672 A>G su elementi di splicing, come l'snRNP U2, che lega il sito di ramificazione, e U1, che si lega upstream e downstream ai siti di splicing in 5'.

Altri softwares utilizzati sono:

- **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) per allineare le sequenze di diverse specie e per analizzare la conservazione del sito di mutazione;
- **RepeatMasker** ([www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)) utilizzato per lo screening di sequenze di DNA in formato FASTA. Tale programma individua elementi ripetuti interspersi e sequenze di DNA a bassa complessità. Il confronto tra sequenze viene condotto mediante la selezione di WUBLAST, che implementa l'algoritmo Smith-Waterman-Gotoh sviluppato da Phil Green (Institute for Systems Biology 2003);
- **RECON** : uno dei software più ampiamente utilizzati, che implementa tecnologie de novo per l'identificazione di elementi ripetuti.

### 3.6 Analisi dell'aplotipo

L'analisi dell'aplotipo associato alla mutazione c.1584+18672 A>G è stata eseguita utilizzando come marcatori sei microsatelliti ed il tratto polimorfico TG<sub>(9-13)</sub>T<sub>(5,7,9)</sub>. Le regioni genomiche corrispondenti sono state amplificate mediante PCR; i prodotti di PCR sono stati separati su sequenziatore ABI-3130XL e i genotipi sono stati ricostruiti utilizzando il software GeneMapper v4.0 (Life Technologies).

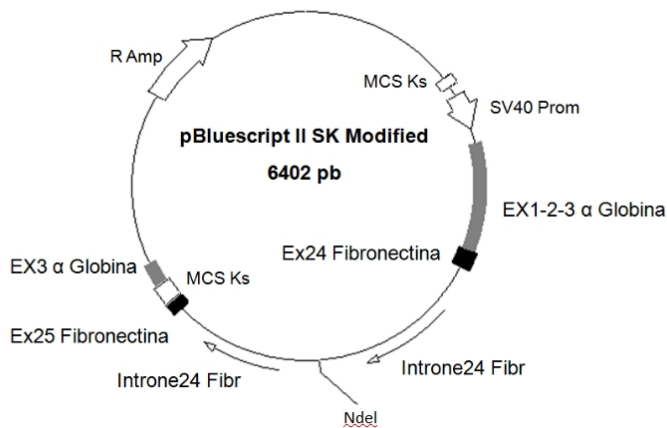
Marcatore	Localizzazione (chr7)	Primer forward	Primer reverse
D7S677	116826643-117026952	5'-ATTAATCATTCACTATGGGATAGC-3'	5'-GGAATTACAAGTCACTCTATACAAA-3'
IVS1 CA	116917637-116917638	5'-CTCCAGAGAAGTAGAACCAATG-3'	5'-CTTCAGACTCAAACCTGGAACAT-3'
IVS9 GT	116975645-116975646	5'-GGCCATGTGCTTTTCAAAC-3'	5'-CAGGACAGGAGTACCAAGAAGT-3'
IVS9(TG)m	116975897-116975919	5'-ATGGGCCATGTGCTTTTCAAAC-3'	5'-CTGAAGAAGAGGCTGTCATCACCA-3'
IVS9(T)n	116975925-116975925	5'-ATGGGCCATGTGCTTTTCAAAC-3'	5'-CTGAAGAAGAGGCTGTCATCACCA-3'
IVS11 CA	117206213-117206534	5'-CGTGGTGTCTCATGCCTGTA-3'	5'-GGGACATAATTCAATGTGTTTCA-3'
IVS20 CA	117039542-117039543	5'-TGTCACCTCTTCATACTCAT-3'	5'-AAACTTACCGACAAGAGGAA-3'
D7S655	118355298-118555676	5'-GAATAAAGTTGGAGGATTGACA-3'	5'-AAACTTTTATCTAGATTCAGGCT-3'

**Tabella 2:** Elenco dei marcatori utilizzati per la definizione degli aplotipi associati alla mutazione c.1584+18672 A>G.

### 3.7 Costruzione di minigeni ibridi

I costrutti minigenici ibridi utilizzati per lo studio della mutazione c.1584+18672 A>G sono stati ottenuti a partire dal plasmide minigenico ibrido alfa-globina-EDB fibronectina (pBS-KS), in cui l'extra dominio B (EDB) della fibronectina, sottoposto a splicing alternativo, è stato rimosso per generare un sito di inserzione per esoni di interesse [Baralle M et al., 2003]. Il clonaggio viene effettuato utilizzando il sito unico di restrizione *NdeI* e la trascrizione del minigene è posta sotto il controllo del promotore dell'alfa-globina e dell'enhancer del virus SV40. Un frammento di 676 pb dell'introne 11 del CFTR è stato amplificato mediante PCR da DNA di un paziente eterozigote (c.1584+18672 A>G/F508del) utilizzando i primers forward 5'-GGAATTCATATGTCCCCTTTTACTTATGCAGGA-3' e reverse 5'-

GGAATTCCATATGTTACAACCTGACCCTTGGACAA-3', in cui le sequenze sottolineate rappresentano il sito riconosciuto da *NdeI*. In seguito a digestione enzimatica, il prodotto di PCR è stato ligato all'interno del vettore. I plasmidi ottenuti sono stati utilizzati per trasformare cellule di *E. coli* TOP10 chimicamente competenti (Invitrogen). Le cellule trasformate vengono fatte crescere su piastre di Luria-broth (LB) contenenti ampicillina (100 µg/ml) e X-gal (80 µg/ml). Le colonie positive vengono ottenute per selezione bianco-blu. Il DNA plasmidico viene estratto dai batteri utilizzando il kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA).



**Figura 3.8:** Rappresentazione del plasmide minigenico ibrido alfa-globina-EDB fibronectina (pBS-KS).

Il protocollo di trasformazione dei batteri chimicamente competenti prevede:

- Scongelo dei batteri in ghiaccio;
- Aggiunta del prodotto di ligazione (da 1 a 5 µl) (o del DNA plasmidico) ai batteri;
- Incubazione 30 minuti in ghiaccio;
- Shock termico a 42°C per 30 secondi;
- Aggiunta di 250 µl di S.O.C. medium pre-riscaldato;
- Crescita batterica in agitazione a 37°C per 1 ora;
- Piastramento (dai 20 ai 200 µl) su piastre di LB agar contenenti l'antibiotico relativo;
- Incubazione delle piastre a 37°C overnight.

L'estrazione del DNA plasmidico viene eseguita secondo il protocollo fornito dal kit PureYield Plasmid Miniprep System, basato sui seguenti passaggi principali:

- Lisi dei batteri: 400 µl di coltura batterica vengono lisati con 100 µl di soluzione di lisi per 2 minuti e poi trattati con 350 µl di soluzione di neutralizzazione;
- legame alla membrana della colonna di estrazione;

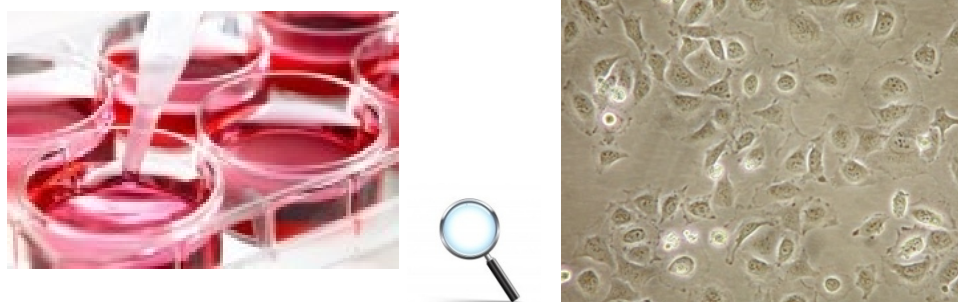


- lavaggio con 200  $\mu$ l di soluzione per la rimozione delle endotossine e con 400  $\mu$ l di soluzione di lavaggio;
- eluizione con 30  $\mu$ l di acqua nucleasi free.

Il DNA plasmidico estratto viene sequenziato con primers complementari a sequenza plasmidiche fiancheggianti il frammento clonato (Primer Forward  $\alpha$ 2-3: 5'- CAACTTCAAGCTCC TAAGCCACTGC-3' e primer reverse Bra2: 5'- CACCAGGAAGTTCCTTAAATCA-3') per verificare la presenza/assenza della mutazione c.1584+18672 A>G ed il corretto orientamento dell'inserto clonato.

### 3.8 Colture cellulari e trasfezioni

Sono state utilizzate colture cellulari HeLa (derivate da carcinoma di cervice umana), coltivate secondo protocolli standard. In particolare, le cellule sono state mantenute in terreno DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Euroclone, Wetherby, UK) arricchito con 10% di siero bovino fetale (Hyclone, South Logan, UT, USA), antibiotici (100 U/ml penicillina e 100  $\mu$ g/ml streptomina; Euroclone), e glutammina (2 mM; Euroclone); la crescita è stata condotta a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> secondo protocolli standard.



**Figura 3.9:** Immagine a microscopio delle cellule HeLa, trasfettate in piastre a 6 pozzetti.

Le cellule HeLa sono state trasfettate con 4  $\mu$ g dei costrutti minigenici ibridi wt (pBS-KS-IVS11-wt) o mutato (pBS-KS-IVS11-mut) utilizzando il reagente di trasfezione FuGENE HD (Promega).

### 3.9 RT-PCR fluorescenti

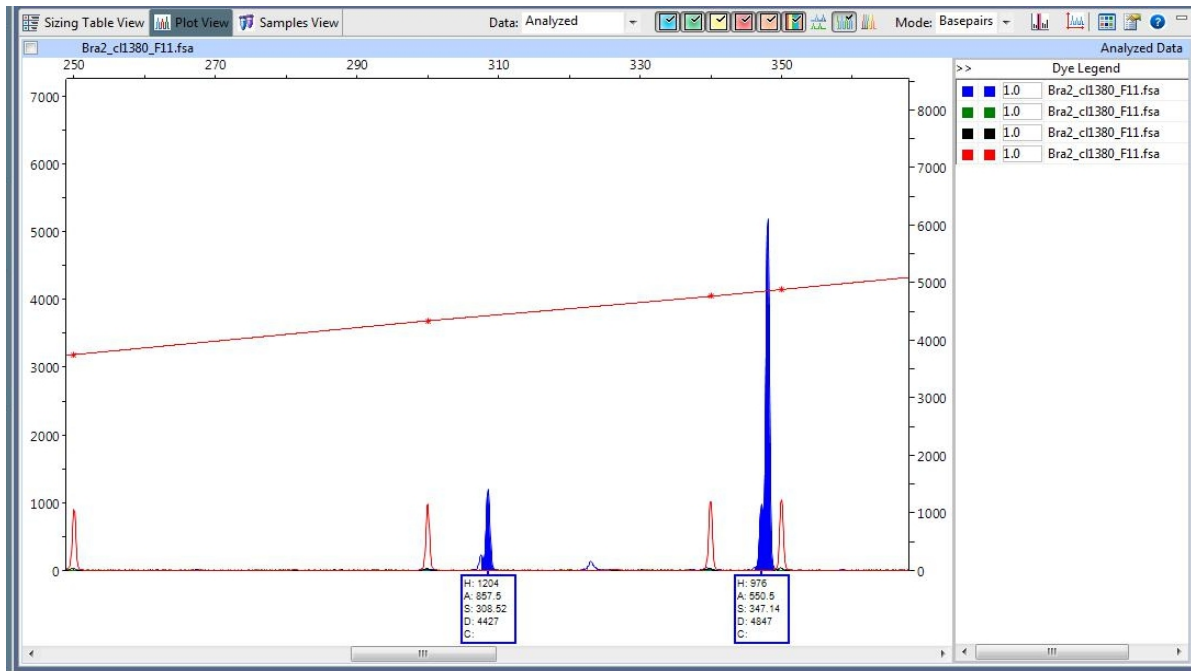
Le RT-PCR fluorescenti sono state realizzate su RNA estratto da brushing nasale dei pazienti o dalle cellule trasfettate, utilizzando un primer marcato in 5' con il fluorocromo 6FAM (6-

carbossifluoresceina. Nella tabella sottostante sono riportate le diverse coppie di primers utilizzate per le RT-PCR opportunamente disegnate per la caratterizzazione in vitro ed in vivo della mutazione c.1584+18672 A>G.

Primer	Sequenza	Applicazione
á2-3	5'- CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTG C-3'	RT-PCR realizzata su RNA estratto da cellule trasfettate con i costrutti minigenici wt e mutato
Bra2	5'- [6FAM]CACCAGGAAGTTCCTTAAA TCA-3'	
Ex11-F	5'-TGATTATGGGAGAACTGGAGC- 3'	RT-PCR realizzata su RNA da brushing nasale per la quantificazione dei diversi trascritti prodotti dagli alleli c.1584+18672 A>G e F508del
Ex12-R	5'- [6FAM]CTTGCTCGTTGACCTCCAC T-3'	
Ex11*-F	5'-CCAACTCCTCCCCTTGCTCT-3'	RT-PCR in vivo utilizzate per la valutazione della forza dei siti accettori e donatori di splicing nella caratterizzazione della mutazione c.1584+18672 A>G
Ex11*-R	5'-CATTAAGTGGAGGTGAATCTTC- 3'	
Ex9-F	5'-TGGTATGACTCTCTTGGAGC-3'	RT-PCR in vivo per la valutazione di eventuali effetti indotti dalla mutazione c.1584+18672 A>G sullo skipping dell'esone 9
Ex11-R	5'-[6FAM]TGATGACGCTTCTGTAT- 3'	

**Tabella 3:** Elenco dei primers utilizzati nella caratterizzazione della mutazione c.1584+18672 A>G.

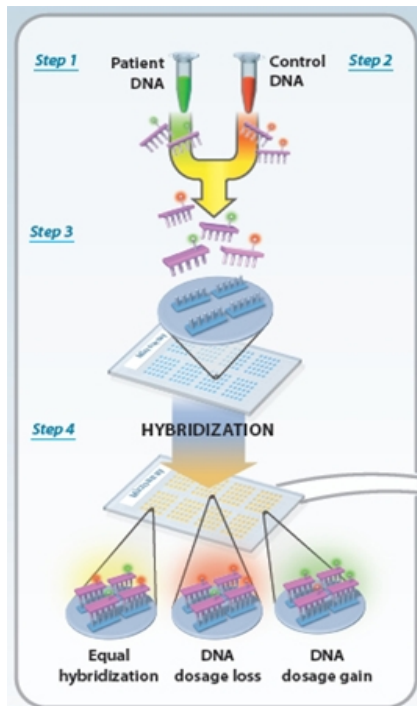
I prodotti di RT-PCR sono stati separati per elettroforesi capillare su sequenziatore ABI-3130XL. La quantificazione dei diversi trascritti è stata ottenuta misurando l'area del picco corrispondente al trascritto di interesse e dividendo tale valore per la somma di tutte le aree dei picchi ottenuti nella stessa reazione di RT-PCR (quantificazione realizzata con il software GeneMapper).



**Figura 3.10:** Esempio di analisi dei picchi corrispondenti ai diversi trascritti amplificati in una RT-PCR. Vengono presi in considerazione i valori dell'area (A) e della dimensione (size, S) del picco. Sull'asse delle ascisse sono riportate le dimensioni in paia di basi degli amplificati, mentre in ordinata le unità di fluorescenza.

### 3.10 Array-CGH

L'analisi mediante Array-CGH, applicata per la caratterizzazione della duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18, è stata eseguita con la piattaforma Agilent 105A chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), secondo la procedura standard. In particolare, 500 ng di DNA del probando e di un controllo sono stati sottoposti a doppia digestione con gli enzimi di restrizione RsaI ed AluI (Promega, Madison, WI) per 2 h a 37°C e marcati con Cy5-dUTP a Cy3-dUTP, rispettivamente. In seguito a purificazione in colonna, i DNA marcati sono stati combinati, denaturati, sottoposti a pre-annealing con 25 µg di DNA Cot-1 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) e ibridizzati a 65°C per 40 h. Dopo due lavaggi, le immagini degli arrays sono state acquisite con scanner Agilent e analizzate con il software Feature Extraction (v10.5). Un riassunto grafico dei risultati è stato ottenuto con il software DNA Analytics (v4.0).



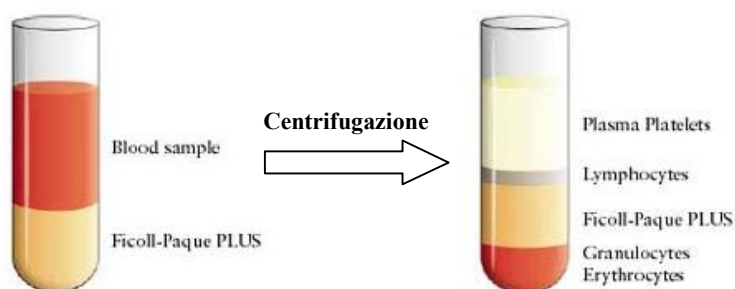
**Figura 3.11:** Rappresentazione schematica del procedimento sperimentale dell'ARRAY-CGH. Step 1: Frammentazione del DNA del paziente e del controllo; Step 2: Marcatura del DNA mediante l'utilizzo della tecnica “random priming”, che permette l'incorporazione casuale di nucleotidi, modificati con fluorocromi; Step 3: Ibridazione del DNA del paziente e del controllo sul vetrino. A destra, rappresentazione schematica dello Scanner Agilent Technologies.

### 3.11 Estrazione di linfociti da sangue periferico

Il metodo di separazione dei linfociti utilizzato si basa sul Ficoll, una soluzione contenente destrano a bassa viscosità che permette la separazione dei linfociti in base alla diversa densità sia rispetto al Ficoll, che agli eritrociti ed ai granulociti.

Il sangue, una volta diluito in un buffer salino, viene lentamente stratificato sulla soluzione di Ficoll posta all'interno di una provetta e successivamente centrifugato per un breve periodo di tempo.

La differente separazione, in base alla densità, durante la centrifugazione causa la formazione di diversi “strati” contenenti tipi cellulari differenti (figura 1).



**Figura 3.12:** Formazione dei diversi strati di cellule dopo la centrifugazione con Ficoll.

A causa della loro densità, i linfociti si localizzano nell'interfaccia tra il plasma ed il Ficoll, insieme ad altre cellule a sedimentazione lenta (monociti e piastrine). I linfociti vengono poi recuperati dall'interfaccia e trattati per eliminare ogni residuo di piastrine, Ficoll e plasma eventualmente rimasti nella soluzione. In particolare il protocollo prevede:

- stratificare 3 ml di sangue diluiti con 3 ml di PBS su 3 ml di Ficoll posti sul fondo di una falcon, facendo attenzione a non mescolare i due strati;
- Centrifugare la falcon 15 minuti a 2200 rpm: con questa centrifugazione si ottiene la separazione dei linfociti, con la formazione di un anello biancastro nell'interfaccia tra il plasma ed il Ficoll.
- Prelevare con cura l'anello dei linfociti utilizzando una P1000, evitando di pescare il Ficoll presente sotto l'anello (prelevare circa 2 ml).
- Versare i 2 ml in una nuova falcon e portare fino ad un volume finale di 12 ml (+ 8 ml di PBS) per lavare i linfociti.
- Centrifugare 10 minuti a 1400 rpm.
- Eliminare il supernatante perché i linfociti sono sedimentati sul fondo.
- Risospendere i linfociti ("grattando" la provetta su un supporto opportuno o mescolando con il vortex): qualora nel pellet si fosse notata la presenza di RBC contaminanti, procedere all'eliminazione per lisi osmotica tramite l'aggiunta di 2 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata, che costituisce una soluzione ipotonica.
- Dopo aver agitato il campione aggiungere 2 ml di PBS concentrato 2X per ripristinare le condizioni di osmolarità ottimali.
- Aggiungere PBS fino a 12 ml e centrifugare nuovamente il campione 10 minuti a 1400 rpm.
- In tutto fare 3-4 lavaggi in PBS e se necessario ripetere la lisi osmotica per eliminare eventuali RBC ancora presenti.
- Per procedere all'estrazione dell'RNA dai linfociti, il pellet cellulare viene risospeso in 500 µl di TRIzol.

**Note sulla nomenclatura utilizzata per il gene CFTR**

Nella tesi è stata applicata la nomenclatura raccomandata dalla HGVS (Human Genome Variation Society). Gli esoni del CFTR sono pertanto indicati secondo la sequenza di riferimento NM\_000492.3. L'aggiornamento delle norme di nomenclatura ha portato all'abolizione degli esoni 6, 14 e 17 in "a" e "b", adottando la numerazione progressiva dei 27 esoni presenti nel gene CFTR.

## 4 RISULTATI

### 4.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI PAZIENTI FC MEDIANTE ANALISI DEL TRASCritto DEL GENE CFTR.

Questo progetto di dottorato si è sviluppato su una casistica particolare di pazienti affetti da Fibrosi Cistica, nei quali la ricerca mutazionale nel gene CFTR condotta a livello di DNA (reverse dot blot, ricerca di riarrangiamenti genici e sequenziamento diretto degli esoni del CFTR) si era rivelata incapace di identificare le due mutazioni causative di patologia. L'analisi del trascritto del CFTR, condotta su cDNA ottenuto dall'RNA estratto da brushing nasale, si è rivelata risolutiva, consentendo l'identificazione della seconda mutazione nel gene CFTR (Tabella 4.1)

Mutazione 1	Mutazione 2	Difetto genico caratterizzato	Metodiche Applicate	Sesso ed età	Fenotipo clinico
W1282X	c.2679 G>T	<b>c.2679 G&gt;T</b>	Brushing nasale, RT-PCR	F, 35	TS positivo, insufficienza pancreatica, infezioni ricorrenti da <i>Pseudomonas</i> , bronchiectasie diffuse e sinusiti
F508del	Duplicazione esoni 7-18	<b>Duplicazione esoni 7-18</b>	Brushing nasale, RT-PCR, sequenziamento (Sanger), array-CGH	F, 4	Test del sudore positivo, scarso accrescimento ponderale, infezioni respiratorie ricorrenti
F508del	c.1584+18672 A>G	<b>c.1584+18672 A&gt;G</b>	Brushing nasale, RT-PCR, sequenziamento (Sanger), costrutti	F, 44	TS positivo, infezioni respiratorie, insufficienza pancreatica
F508del	c.1584+18672 A>G	<b>c.1584+18672 A&gt;G</b>	minigenici, RT-PCR fluorescente	M, 29	TS positivo, infezioni respiratorie, insufficienza pancreatica
F508del	c.1584+18672 A>G	<b>c.1584+18672 A&gt;G</b>		M, 33	TS positivo, infezioni respiratorie, insufficienza pancreatica, CBAVD

F508del	c.1584+18672 A>G	<b>c.1584+18672</b> <b>A&gt;G</b>		M, 42	TS positivo, infezioni respiratorie, insufficienza pancreatica, CBAVD
c.3731 C>A	c.1584+18672 A>G	<b>c.1584+18672</b> <b>A&gt;G</b>		F, 2	TS positivo, Sufficienza pancreatica

**Tabella 4.1:** Casistica dei pazienti analizzati in questo progetto di dottorato. TS: test del sudore.

#### **4.1.1 La mutazione sinonima c.2679 G>T [Gly-Gly] descritta come un polimorfismo determina uno splicing anomalo.**

La mutazione c.2679 G>T è stata identificata in una paziente eterozigote composta per la mutazione nonsense W1282X. La comprensione del reale significato della variante c.2679 G>T, inizialmente riportata in letteratura come un polimorfismo, è stata raggiunta in seguito allo studio del profilo di espressione dell'mRNA del CFTR nella paziente, sottoposta a brushing nasale. L'analisi ha mostrato la presenza di uno splicing anomalo, che porta alla formazione di una popolazione di mRNA aberrante, mancante di una porzione dell'esone 17. Il sequenziamento di questo frammento ha rivelato che lo splicing alternativo indotto dalla mutazione c.2679 G>T determina la delezione di 230 nucleotidi, che si traduce a livello proteico nella perdita di 76 aminoacidi rispetto alla proteina wild type. Si può ipotizzare che la mutazione c.2679 G>T produca una proteina con un'architettura diversa da quella wild type, che potrebbe indurre una minore capacità nel trasporto del cloro. Da questo caso si evince l'importanza di estendere l'analisi genetica a livello del trascritto, al fine di comprendere il reale danno molecolare indotto da una specifica mutazione.

#### **4.1.2 Caratterizzazione della duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18**

La duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18 del CFTR è stata identificata per la prima volta nella popolazione italiana in una paziente di un anno di età, nata a termine da parto spontaneo senza problemi neonatali e con peso alla nascita di 2,570 Kg. Sin dai primi giorni di vita aveva manifestato uno scarso accrescimento ponderale nonostante adeguato apporto nutrizionale, screening neonatale positivo per FC (1° tripsina 81 ng/dl, 2° tripsina 149 ng/dl) ed un test del sudore marcatamente positivo (116-106 mEq/l).

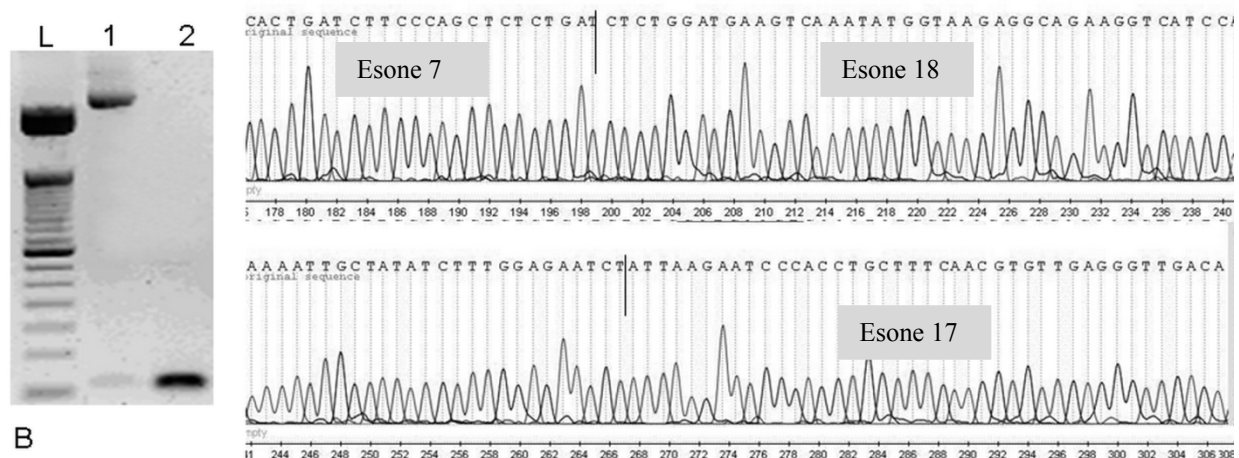
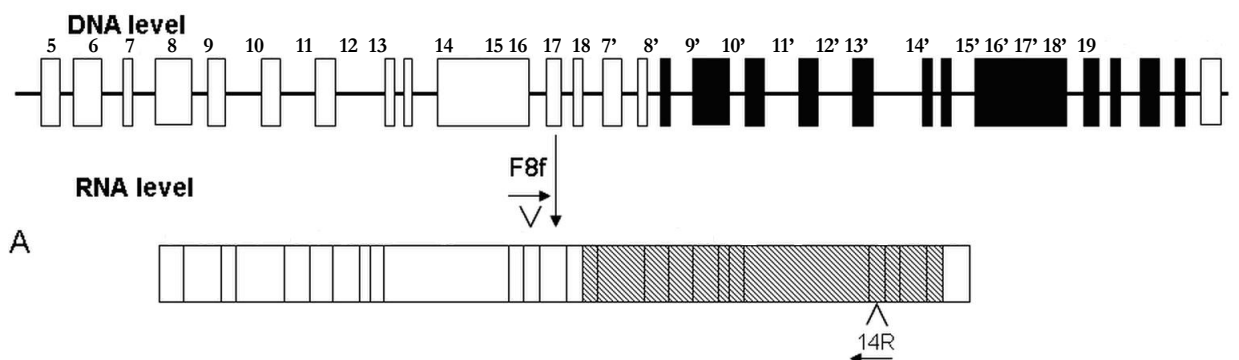
Lo studio mediante sequenziamento di tutto il gene aveva condotto all'identificazione di una sola mutazione (F508del); grazie all'MLPA è stato individuata la presenza di un esteso riarrangiamento.



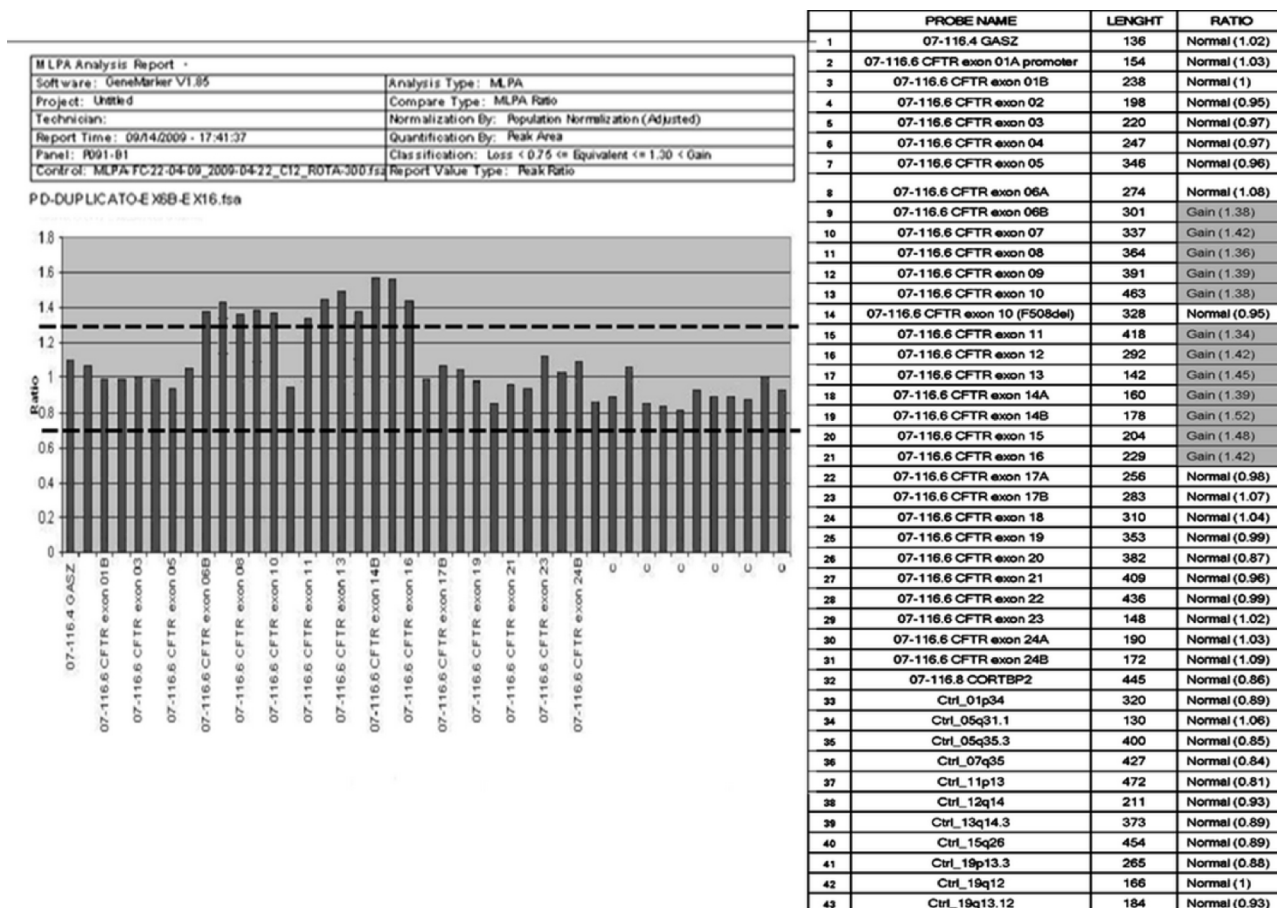
In particolare, l'MLPA ha mostrato la presenza di una duplicazione comprendente la regione tra l'esone 7 e il 18 (figura 4.1). In seguito alla valutazione della segregazione allelica, è stato eseguito il test di approfondimento diagnostico del brushing nasale al padre, portatore dell'esteso riarrangiamento. L'RNA estratto dalle cellule è stato trattato e retrotrascritto nel corrispondente cDNA sul quale sono state condotte le seguenti PCR:

- ✓ Long range PCR (2166 bp) con un primer forward F8f localizzato sull'esone 5 e un primer reverse 14R posto sull'esone 14, per confermare il riarrangiamento identificato dal MLPA;
- ✓ PCR con primer forward F12f e primer reverse B15R per caratterizzare la giunzione in 5' del riarrangiamento;
- ✓ PCR con primer forward F8f e primer reverse B19R per caratterizzare la giunzione in 3' della duplicazione.

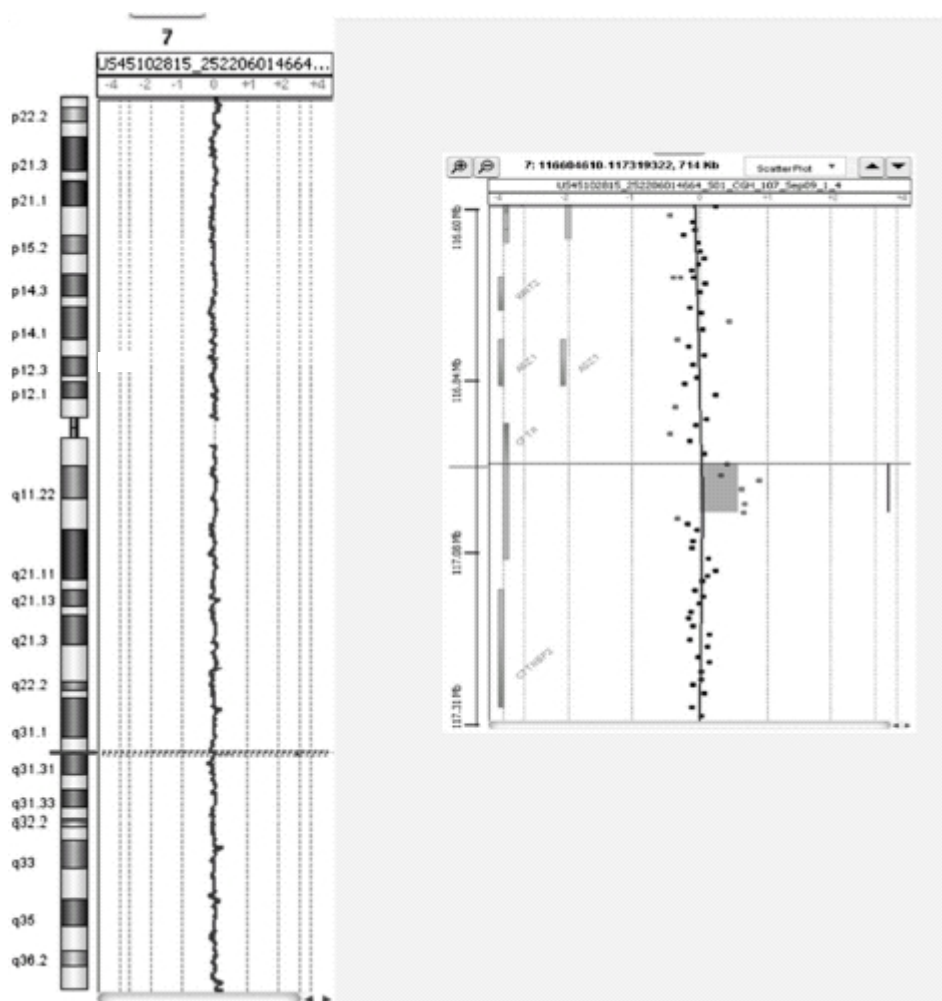
Il riarrangiamento è stato ulteriormente analizzato mediante la metodica ARRAY-CGH, utilizzando la piattaforma Agilent 105A chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Tale analisi ha confermato la presenza di una duplicazione di circa 70 Kb (Figura 4.3) [Costantino et al., 2011].



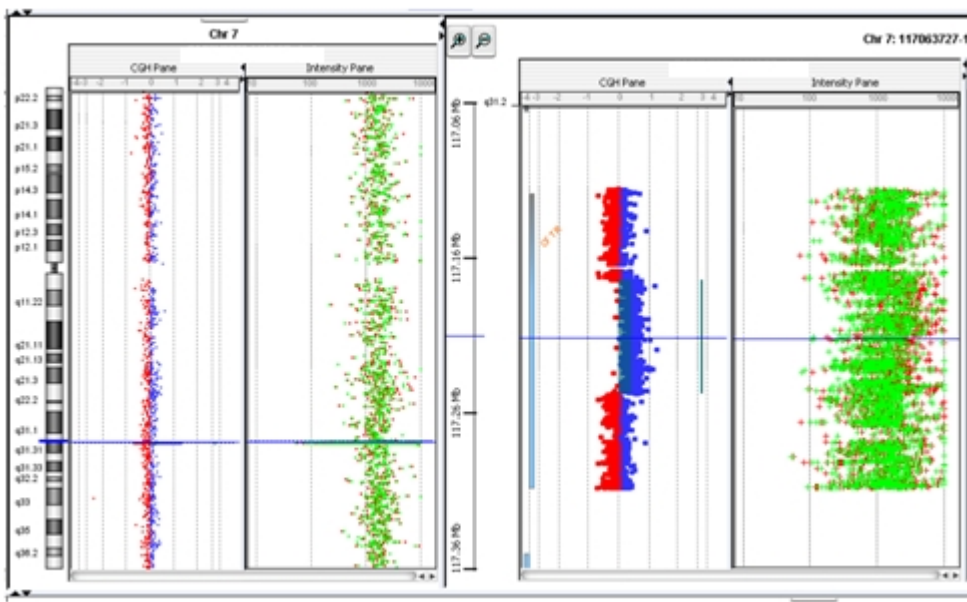
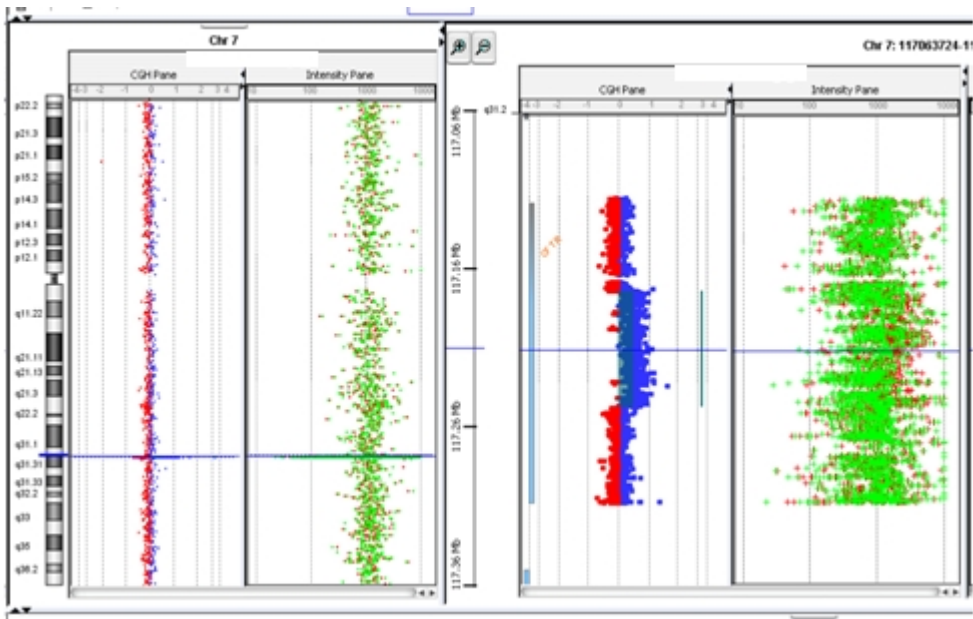
**Figura 4.1:** A) Rappresentazione schematica della regione duplicata, in cui gli esoni duplicati sono indicati con 7', 8', etc. B) Profilo elettroforetico del prodotto di RT-PCR di 2166 bp ottenuto utilizzando i primers F8f (localizzato sull'esone 17) e 14R (localizzato sull'esone 16). L:ladder (50 bp Invitrogen); 1: cDNA del genitore del probando portatore della duplicazione; 2: cDNA wild-type. Il pannello a destra rappresenta il sequenziamento del frammento di 2166 bp, realizzato con il primer reverse B15R, localizzato sull'esone 8. L'immagine mostra la giunzione tra l'inizio della duplicazione (esone 7) e gli esoni wild-type 17-18.



**Figura 4.2:** Risultati del MLPA analizzati con il software Coffalyser. L'istogramma mostra la duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18. I valori compresi tra 0,75 e 1,3 indicano un'espressione wild-type; valori inferiori a 0,75 suggeriscono una delezione, mentre valori superiori a 1,3 indicano una duplicazione. La probe 07-116.6 CFTR exon 10 (F508del) risulta normale.



**Figura 4.3:** Determinazione della duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18 mediante la tecnica di array-CGH. La duplicazione si estende per una regione di circa 70 kb (a livello prossimale ultimo oligo normale: 116,948,976 Mb, primo oligo duplicato: 116,963,849 Mb; a livello distale ultimo oligo duplicato 117,030,994 Mb, primo oligo normale 117,039,020 Mb). L'array è stato eseguito presso il laboratorio della Prof.ssa Zuffardi (Università di Pavia).

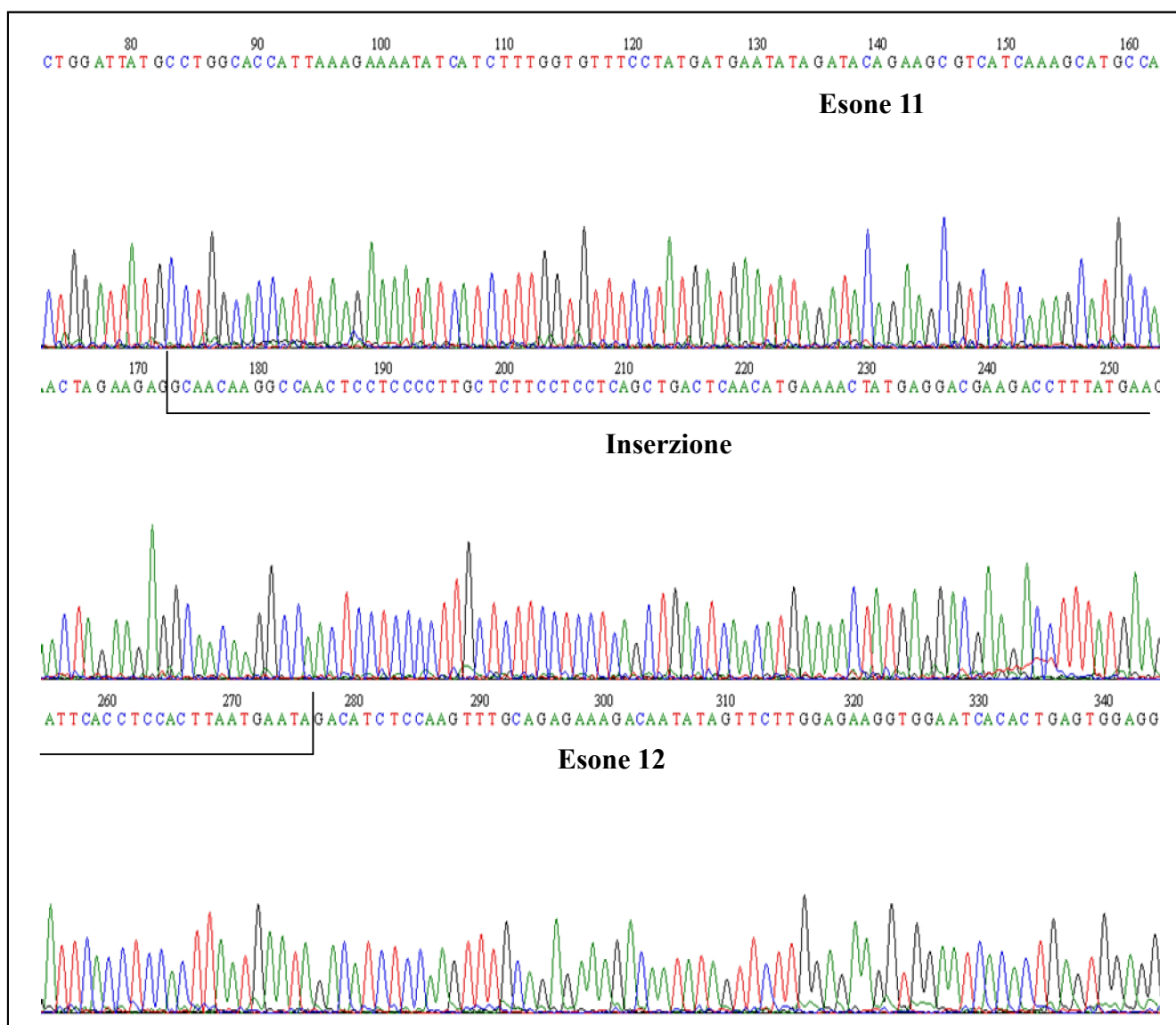


**Figura 4.4:** Immagini degli array-CGH eseguiti presso il laboratorio di Genetica Medica del Policlinico di Milano, mediante piattaforma Agilent 105A chip con vetrino custom 8x60 k. Il pannello A fa riferimento al probando, mentre il pannello B al genitore portatore dell'estesa duplicazione.

### 4.1.3 Caratterizzazione molecolare della mutazione intronica c.1584+18672 A>G

La mutazione intronica c.1584+18672 A>G è stata inizialmente identificata in due pazienti italiani, entrambi eterozigoti composti per la mutazione F508del (c.1521\_1523delCTT, secondo la nomenclatura HGVS). In seguito a questi due casi, la regione dell'introne 11 del CFTR contenente tale mutazione, è stata inserita nell'analisi mutazionale di routine, eseguita mediante sequenziamento diretto, nei pazienti rimasti non caratterizzati dopo il completamento dello screening di primo livello (eseguito mediante l'applicazione del kit commerciale inno-Lipa) e della ricerca di riarrangiamenti (kit SALSA P091-C1 CFTR MLPA).

La caratterizzazione della mutazione deep-intronic c.1584+18672 A>G è stata inizialmente condotta a livello di trascritto del CFTR, mediante estrazione dell'RNA da brushing nasale eseguito sui due primi probandi identificati. Il sequenziamento dei prodotti di amplificazione su cDNA ha mostrato l'inserzione di una sequenza criptica di 104 nucleotidi posta tra l'esone 11 e l'esone 12 (Figura 4.5). La ricerca BLAST ha mostrato che la sequenza inserita corrispondeva ad una porzione dell'introne 11 del CFTR, posta esattamente tra la posizione nt IVS11 98.125 e nt IVS11 98.211 (Sequenza NCBI di riferimento NT\_007933.15). Il sequenziamento del prodotto di PCR eseguita con primers posti 100 nucleotidi a monte e a valle di tale regione intronica, ha permesso di identificare la mutazione c.1584+18672 A>G, che determina la formazione di un sito criptico donatore di splicing GT, posto 5 nucleotidi a valle del sito donatore responsabile dello splicing dello pseudoesone di 104 nucleotidi [Costantino *et al.*, 2010]. Lo studio mediante software quali NNSplice prediction program e Spliceview, deputati a valutare l'effetto che una variazione di sequenza può avere sulla creazione di nuovi siti di splicing, ha rivelato che quando la mutazione c.1584 +18672bp A>G è presente lo score passa da 0 a 0,86 (NNSplice prediction program) e da 0 a 75 (Spliceview). Questo incremento dello score indica l'aumento della probabilità che un determinato evento abbia luogo e in questo caso che si abbia la formazione di un nuovo sito di splicing.



**Figura 4.5:** Il prodotto di RT-PCR di 708 bp è stato estratto da gel e sottoposto a sequenziamento. L'elettroferogramma rivela un mRNA aberrante con un'inserzione di 104 bp tra l'esone 11 e l'esone 12.

Lo screening mutazionale eseguito su 230 pazienti afferenti al Centro Fibrosi Cistica di Milano dal 2009 ha portato all'identificazione della mutazione c.1584+18672 A>G in altri tre individui. Tutti i portatori di tale variante presentano un quadro fenotipico simile, caratterizzato da test del sudore positivo, infezioni respiratorie lievi/moderate e sufficienza pancreatica (tabella 4.1). Inoltre, alla luce della comune origine geografica (Italia settentrionale), i cinque probandi e i familiari disponibili sono stati genotipizzati utilizzando otto marcatori localizzati nel locus del CFTR. Dall'analisi dell'aplotipo si evince che la mutazione c.1584+18672 A>G abbia avuto origine da almeno due eventi indipendenti (tabella 4.2)

Marker/mutation	Localization (chr7)*	Probands									
		P1		P2		P3		P4		P5	
D7S677	116826643-117026952	274	274	274	268	274	274	274	274	270	268
IVS1 CA	116917637-116917638	108	110	110	112	108	110	110	110	112	112
IVS9 GT	116975645-116975646	194	194	194	194	194	194	194	194	194	194
IVS9(TG)m	116975897-116975919	10	10	10	11	10	10	10	10	11	11
IVS9(T)n	116975925-116975925	9	9	9	7	9	7	9	9	7	7
<b>F508del</b>	116986883-116986885	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<b>c.1584+18672A&gt;G</b>	117005587	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>c.3731G&gt;A (G1244E)</b>	117282105	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
IVS11 CA	117206213-117206534	269	269	269	259	269	269	269	269	259	259
IVS20 CA	117039542-117039543	114	114	114	114	114	114	114	114	114	114
D7S655	118355298-118555676	121	138	121	138	121	138	121	138	132	138

**Tabella 4.2:** La tabella indica i marcatori utilizzati per l'analisi dell'aplotipo. Le coordinate genomiche sono indicate secondo la sequenza genomica di riferimento di UCSC (hg18 release, Marzo 2006). Le mutazioni sono segnate in grassetto. I diversi aplotipi sono distinti da differenti tonalità di grigio.

Per caratterizzare in modo più fine gli effetti indotti sullo splicing dalla mutazione c.1584+18672 A>G abbiamo quindi applicato un approccio combinato di metodiche in vitro (costrutti minigenici ibridi) ed in vivo (brushing nasale) [Costantino L et al., 2013].

### Caratterizzazione in vitro della mutazione c.1584+18672 A>G

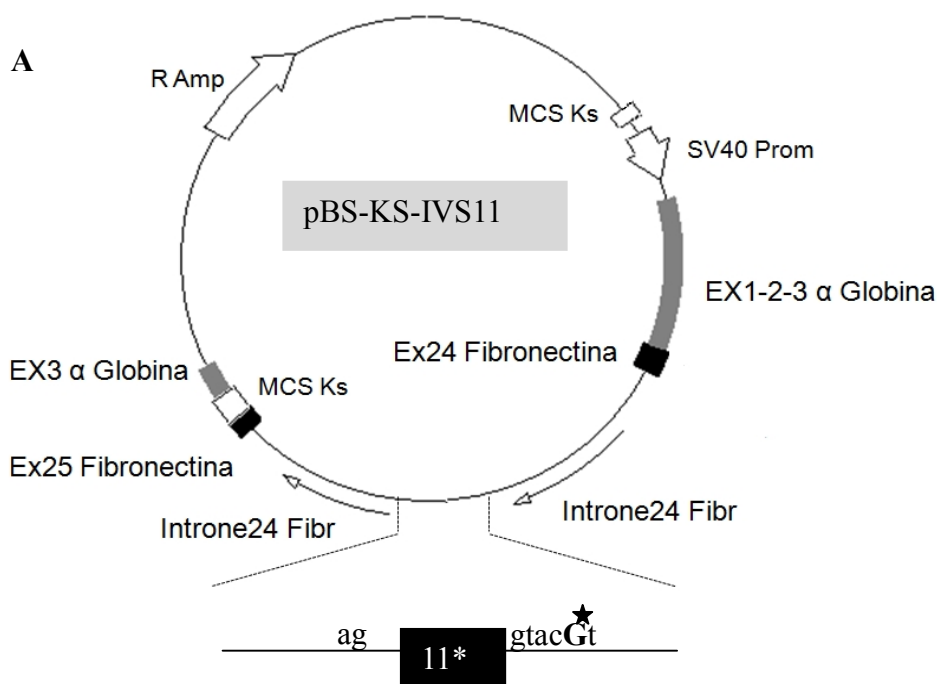
Per caratterizzare la mutazione c.1584+18672 A>G abbiamo clonato la regione genomica, contenente lo pseudoesone 11\* e le sequenze introniche fiancheggianti, sia nella versione wild-type che in quella mutata, nel plasmide minigenico ibrido alfa-globina-fibronectina EDB [Baralle M et al., 2003]. I costrutti minigenici pBS-KS-IVS11-wt e pBS-KS-IVS11-mut sono stati trasfettati transientemente in colture cellulari HeLa e i prodotti di splicing del CFTR sono stati analizzati mediante RT-PCR. (figura 4.6)

La trasfezione del vettore mutato ha dato origine ad un prodotto di splicing principale, determinato dall'inclusione dello pseudoesone 11\* di 104 pb, localizzato tra gli esoni 11 e 12, confermando i dati osservati inizialmente [Costantino et al., 2010]. In aggiunta a tale prodotto, inaspettatamente, è stato osservato un secondo trascritto, determinato dall'inclusione di una versione ridotta dello pseudoesone (65 pb), causata dall'attivazione di un sito criptico accettore di splicing localizzato 39 pb a valle rispetto al sito predominante. Rispetto ai dati preliminari ottenuti in vivo, la trasfezione del vettore wild-type ha mostrato che, anche in assenza della mutazione c.1584+18672 A>G,

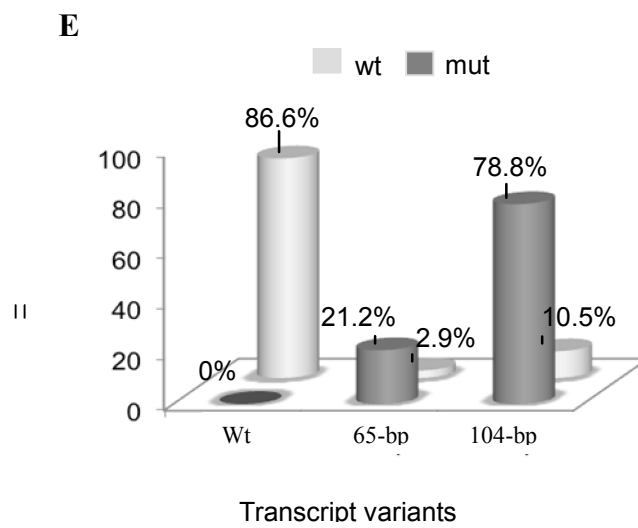
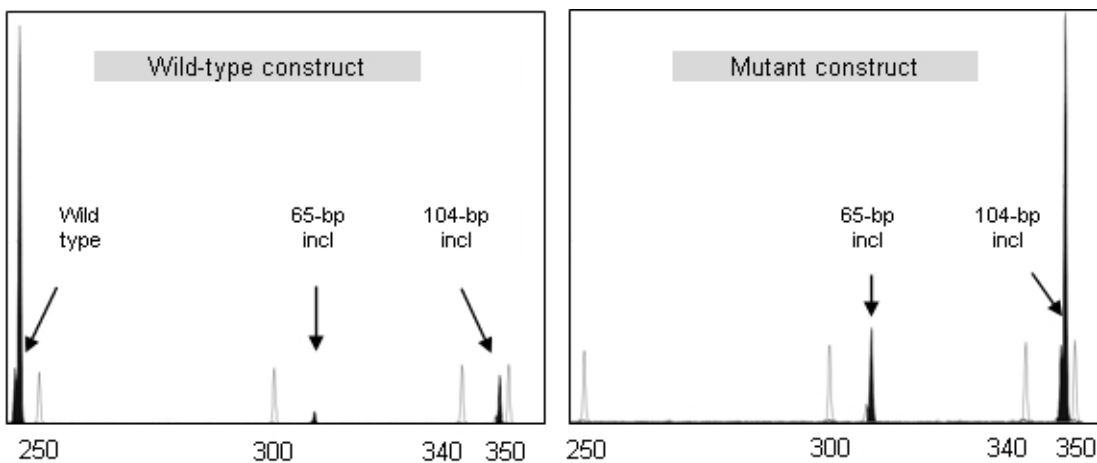
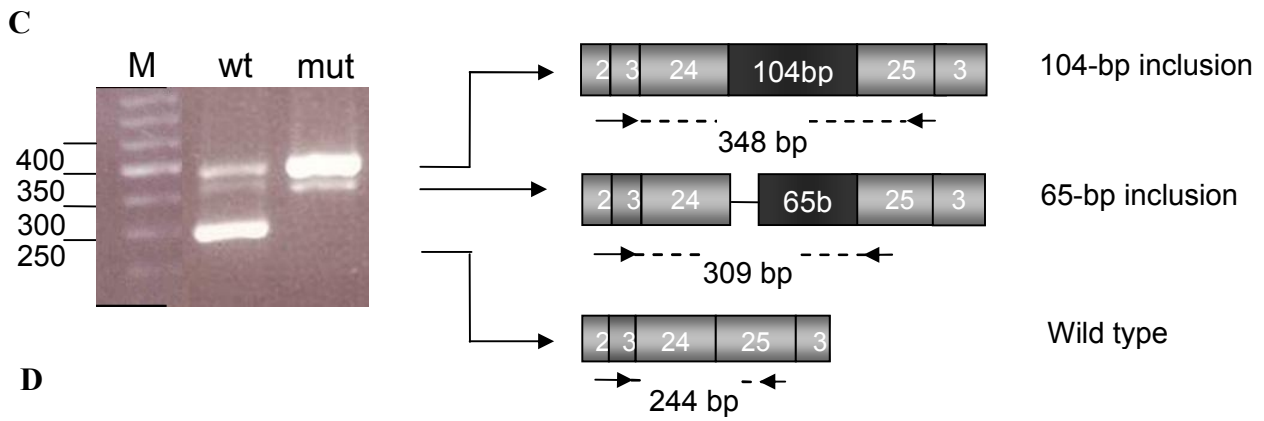
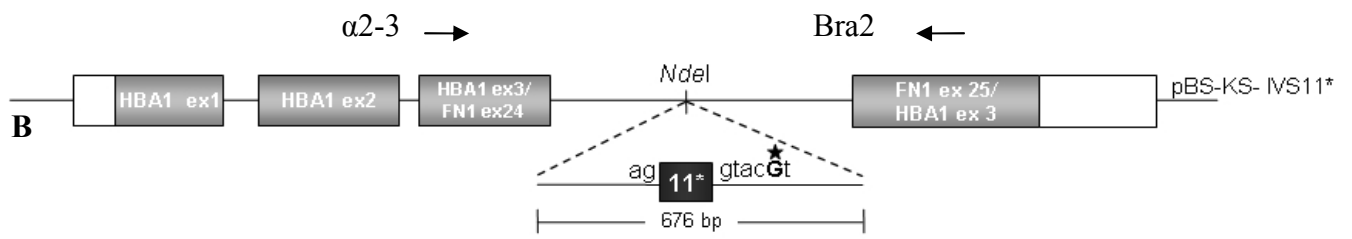
vengono prodotti livelli residui di entrambe le forme aberranti di trascritto.

L'analisi in silico, realizzata utilizzando il software SpliceView, ([http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview\\_ex.html](http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html)), ha predetto correttamente la presenza di entrambi i siti accettori di splicing; tuttavia, ha assegnato il valore di score più alto al sito di splicing responsabile dell'inclusione dello pseudoesone di 65 pb, che risulta essere meno utilizzato nel saggio sperimentale di splicing adottato.

Abbiamo quindi quantificato questi eventi alternativi di splicing, sia negli mRNA wild-type che mutati, misurando le aree dei picchi fluorescenti corrispondenti ai prodotti di amplificazione ottenuti dalla RT-PCR fluorescente eseguita con i primers  $\alpha$ 2-3 e Bra2, localizzati sugli esoni ibridi HBA1 ex.3/FN1 ex.24 e FN1 ex.25/HBA1 ex.3, rispettivamente (figura 4.6). Ponendo la somma di tutti i picchi misurabili uguale al 100%, nel minigene mutato l'inclusione dello pseudoesone di 104 pb è stata determinata nel 78,8% dei trascritti, mentre lo pseudoesone di 65 pb è stata osservata nel restante 21,2% delle molecole di mRNA. Nel minigene wild-type, invece, lo pseudoesone di 104 pb viene incluso nel 10,5% dei trascritti, la versione di 65 pb nel 2,9% delle molecole e la popolazione wild-type nel rimanente 86,6% dei trascritti, rappresentando l'evento di splicing predominante (Figura 4.6).







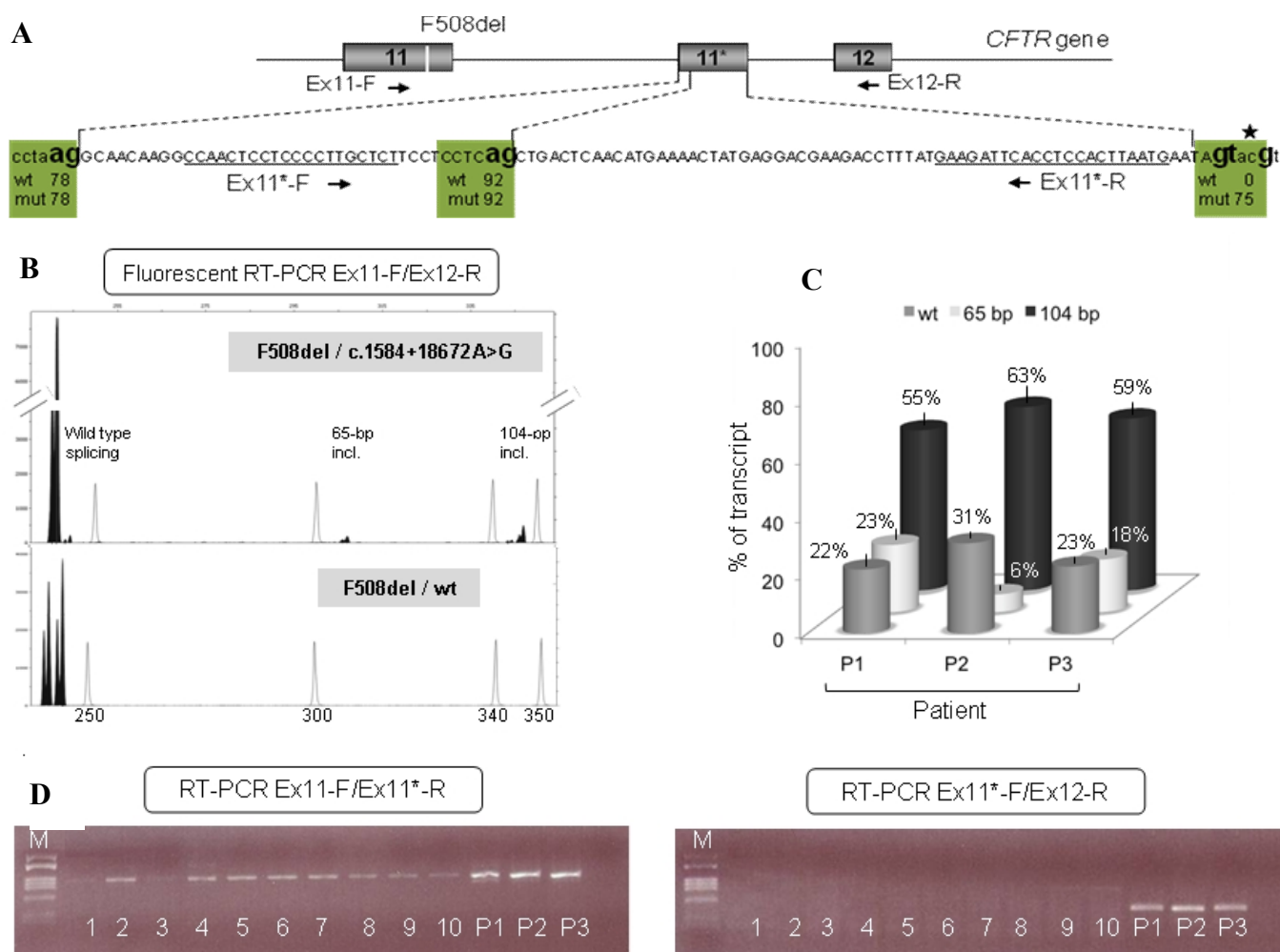
**Figura 4.6:** A) Rappresentazione del vettore pBS-KS-IVS11 nella forma coiled. B) Rappresentazione del minigene ibrido pBS-KS-IVS11\*, nella forma lineare: gli esoni di  $\alpha$ -globin (HBA1) e fibronectina (FN1) sono rappresentati da rettangoli grigi (le regioni non tradotte in bianco), mentre gli introni sono rappresentati da linee. Lo pseudoesone 11\* del CFTR e le regioni introni che fiancheggianti sono state clonate nel sito *NdeI* del vettore pBS-KS. La mutazione c.1584+18672 A>G è indicata da un asterisco. B) A sinistra, i prodotti di RT-PCR ottenuti dall'RNA delle cellule HeLa trasfettate con i costrutti minigenici wild type (wt) o mutato (mut), separati su un gel di agarosio al 2%. M: 50-bp ladder (Invitrogen). A destra, rappresentazione schematica dei tre prodotti di RT-PCR ottenuti. I primers utilizzati sono indicati da frecce. C) Quantificazione delle isoforme di splicing del CFTR mediante RT-PCR fluorescenti. I picchi di fluorescenza corrispondenti ai diversi trascritti del CFTR sono stati misurati mediante il software Gene Mapper v4.0. L'asse delle X rappresenta la dimensione dei prodotti; l'asse delle Y rappresenta le unità di fluorescenza. D) L'istogramma rappresenta la quantità relativa di ciascuna variante di trascritto (wild type, pseudoesone di 65 bp, pseudoesone di 104 bp), ottenuta calcolando il rapporto delle corrispondenti aree dei picchi di fluorescenza (con la somma di tutti i picchi posta uguale al 100%).

Un'osservazione interessante è rappresentata dal fatto che il rapporto tra gli pseudoesoni di 104 pb e 65 pb è equivalente nei costrutti wild-type e mutato: l'evento di inclusione dello pseudo esone di 104 pb risulta essere 3.7 volte più frequente rispetto a quello responsabile dell'inclusione delle 65 pb introniche.

### **Caratterizzazione in vivo della mutazione c.1584+18672 A>G**

Alla luce dei risultati ottenuti con il sistema sperimentale in vitro, abbiamo deciso di valutare i livelli dei prodotti alternativi di splicing in vivo, disegnando un saggio di RT-PCR fluorescente, compresa tra gli esoni 11 e 12 (Figura 4.6, primers Ex11-F+Ex12-R). Per ciascun evento di splicing (wild-type, inclusione di 65 pb ed inclusione di 104 pb), i prodotti di PCR derivati dai due alleli (c.1584+18672 A>G e F508del) sono stati facilmente discriminati grazie alla differenza di 3 nucleotidi. In accordo con i dati ottenuti in vitro, è stato osservato un livello residuo di inclusione dello pseudoesone di 104 pb (circa 1% dell'allele F508del) anche per l'allele non portatore della mutazione di splicing. Accanto a questo dato concordante, sono state osservate due rilevanti differenze nel sistema sperimentale in vivo: i) la quantità complessiva dei prodotti di RT-PCR derivati dall'allele c.1584+18672A>G risulta notevolmente ridotta, suggerendo un processo di degradazione selettiva dei trascritti portatori delle inclusioni out-of-frame degli pseudoesoni; ii) la mutazione c.1584+18672A>G non inibisce totalmente l'evento di splicing wild-type in vivo. Per verificare che la riduzione del livello di espressione dei trascritti prodotti dall'allele c.1584+18672 A>G non fosse determinata da artefatti sperimentali, abbiamo eseguito lo stesso saggio di RT-PCR

sull'RNA estratto da un soggetto eterozigote F508del e abbiamo constatato la capacità della PCR di determinare un'espressione allelica bilanciata in assenza di una degradazione dell'mRNA selettiva. L'analisi quantitativa delle aree dei picchi fluorescenti derivati dall'allele c.1584+18672 A>G nei tre pazienti ha confermato che questa mutazione di splicing mantiene un livello residuo di splicing wild-type (Figura 4.7). Tuttavia, i livelli relativamente elevati di splicing wild-type (22-31%) rilevati nell'esperimento sono influenzati dal fatto che i trascritti aberranti siano soggetti alla degradazione mediata da nonsense (NMD), mentre i trascritti wild-type sono plausibilmente stabili. Per valutare la forza dei siti di splicing dell'esone 11\*, sia nei pazienti che nei controlli, sono stati disegnati due saggi specifici di RT-PCR. I siti criptici accettori di splicing sono stati analizzati utilizzando un primer forward localizzato nell'esone 11 (Ex11-F) ed un primer reverse all'interno dello pseudoesone 11\* (Ex11\*-R), mentre la forza del sito criptico donatore di splicing è stato analizzato mediante un primer forward localizzato nell'esone 11\* (Ex11\*-F) ed un primer reverse nell'esone 12 (Ex12-R) (Figura 4.7, D). Questi esperimenti hanno mostrato che il sito criptico accettore di splicing responsabile dell'inclusione dello pseudoesone di 104 pb risulta costitutivamente attivato anche nei controlli, anche se ad un livello ridotto rispetto ai pazienti portatori della mutazione c.1584+18672 A>G. Al contrario, il sito donatore di splicing dell'esone 11\* deve essere attivato dalla mutazione c.1584+18672 A>G per essere efficientemente riconosciuto dal “macchinario” di splicing, come dimostrato dalla mancata amplificazione in tutti i controlli (Figura 4.7, D).



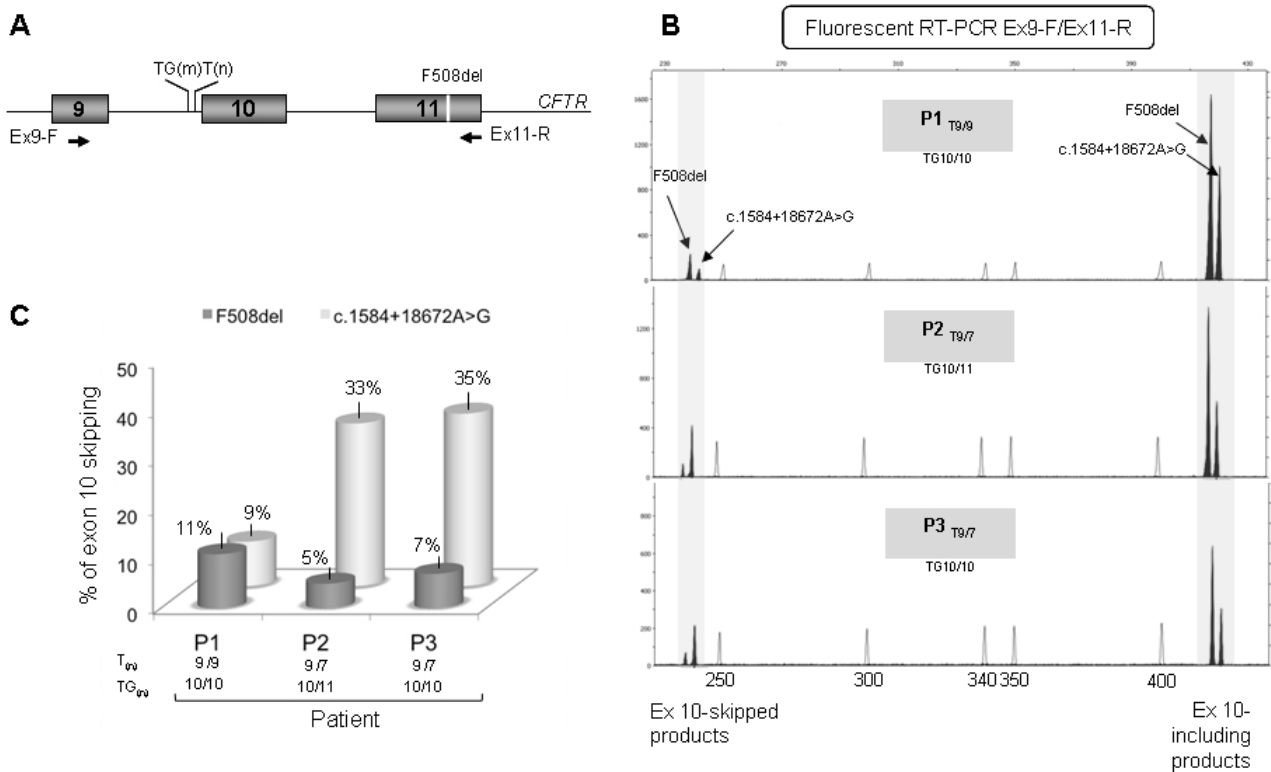
**Figura 4.7:** A) Rappresentazione schematica dello pseudoesone 11\* attivato dalla mutazione c.1584+18672 A>G. Gli esoni sono indicati da rettangoli grigi, mentre gli introni sono rappresentati da linee. La mutazione F508del è indicata da una barra bianca. Sono riportate le sequenze complete dello pseudoesone di 104 bp e dei siti di splicing fiancheggianti; i siti donatore e accettore di splicing sono in grassetto. Per ciascun sito è indicato anche lo score calcolato per le sequenze wild type e mutate (SpliceView software, [http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview\\_ex.html](http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html)). La mutazione puntiforme c.1584+18672A>G è indicata da un asterisco. I primers della RT-PCR sono indicati da frecce. B) Quantificazione dei trascritti del CFTR mediante RT-PCR fluorescente sull'RNA estratto con brushing nasale dal paziente 1 e da un portatore della F508del. Le aree dei picchi di fluorescenza, corrispondenti ai prodotti di RT-PCR allele-specifici sono stati misurati con il software Gene Mapper v4.0. L'asse delle X rappresenta la dimensione degli amplificati e l'asse delle Y le unità di fluorescenza. C) L'istogramma rappresenta la quantità relativa dei trascritti, ottenuta calcolando il rapporto delle corrispondenti aree dei picchi. D) Valutazione della forza dei siti di splicing dell'esone 11\* mediante RT-PCR. Gli amplificati prodotti dall'RNA dei pazienti (P1-3) e dei controlli (1-10) sono stati separati su un gel di agarosio al 2%. M: marcatore (pUC9-HaeIII).

Inoltre, abbiamo valutato, mediante un saggio di RT-PCR fluorescente allele-specifico, l'eventuale influenza della mutazione c.1584+18672 A>G sul processo fisiologico di skipping dell'esone 10. Come mostrato dalla figura 4.7, la quantificazione delle aree dei picchi fluorescenti ha rivelato che

il livello di skipping dell'esone 10 non è correlato in alcun modo alla presenza della mutazione c.1584+18672 A>G, ma, come atteso, risulta determinato dal genotipo PolyT, indipendentemente dalla lunghezza dei repeats TG.

Inoltre, la misura allele-specifica del livello di skipping dell'esone 10 è stata utile alla valutazione dell'effettiva quantità residua dei trascritti CFTR wild-type prodotti dall'allele c.1584+18672 A>G. In particolare, è stata disegnata un'ulteriore RT-PCR, compresa tra gli esoni 9 e 12. Confrontando le aree dei picchi relativi al trascritto full-length prodotto dall'allele c.1584+18672 A>G e dall'allele F508del, si evince che circa il  $3,5\% \pm 1,94\%$  delle molecole di mRNA prodotte dall'allele c.1584+18672 A>G risultano completamente wild-type, e probabilmente danno origine ad una proteina CFTR funzionale.

Infine, per misurare la stabilità dei trascritti del CFTR prodotti dall'allele c.1584+18672 A>G, abbiamo calcolato il rapporto tra le aree totali dei picchi generati da ciascun allele. Abbiamo deciso di valutare lo sbilanciamento allelico analizzando le aree dei picchi corrispondenti agli ampliconi compresi tra gli esoni 9 e 11 (Figura 4.8), invece del saggio sugli pseudoesoni 11\* al fine di minimizzare le differenze di efficienza di amplificazione dovute alla presenza/assenza degli pseudoesoni di 65 e 104 pb, che potrebbero inficiare l'accuratezza della quantificazione relativa. In questo modo abbiamo ottenuto che i trascritti prodotti dall'allele c.1584+18672 A>G sono soggetti ad una degradazione del  $40,7 \pm 2,9\%$ , rispetto a quelli derivati dall'allele F508del. Tale riduzione di espressione è plausibilmente riconducibile alla degradazione mediata da NMD dei trascritti che includono gli pseudoesoni di 65 e 104 pb.



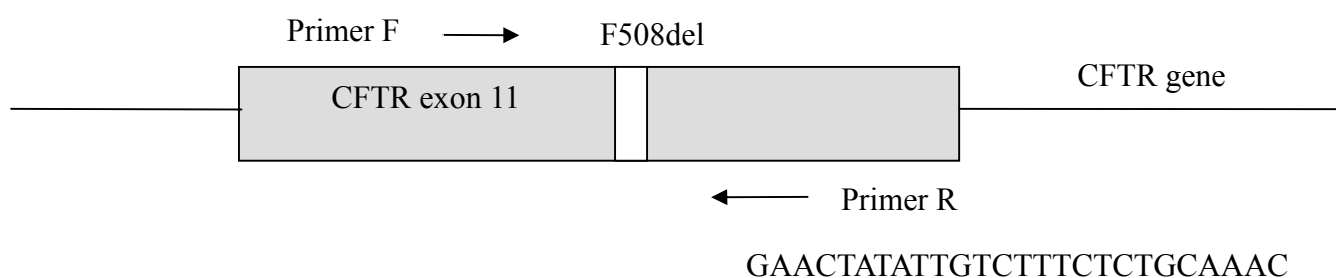
**Figura 4.8:** A) Rappresentazione schematica della regione genomica del CFTR compresa tra gli esoni 9 e 11. I primers utilizzati per le RT-PCR sono indicati da frecce. B) Grafici di Gene Mapper con i picchi di fluorescenza corrispondenti ai diversi trascritti amplificati per RT-PCR dall'RNA dei pazienti P1-3. Per ciascun paziente, sono riportati il numero di T per il polimorfismo T(n) e di TG per il polimorfismo TG(m). C) Valutazione allele-specifica dello skipping dell'esone 10. L'istogramma rappresenta la quantità specifica dei trascritti con skipping dell'esone 10 prodotti dagli alleli c.1584+18672 A>G e F508del. Per ciascun allele, la percentuale di skipping dell'esone 10 è stata stimata calcolando il rapporto tra l'area del picco del prodotto con skipping dell'esone 10 e la somma delle aree dei picchi di tutti i trascritti (posta uguale al 100%). Il grafico mostra come il livello di skipping dell'esone 10 correli con il genotipo polyT dei pazienti e non sia associato con la mutazione c.1584+18672 A>G.

## 4.2 VALUTAZIONE DI LINFOCITI E LINEE LINFOBLASTOIDI ALLESTITE DA PAZIENTI FC COME TESSUTO TARGET PER L'ANALISI DEL TRASCritto DEL CFTR.

Per valutare la possibilità di utilizzare tessuti target alternativi all'epitelio nasale per l'analisi del CFTR a livello di RNA, è stato sviluppato uno studio sperimentale di estrazione dell'RNA dai linfociti ottenuti da un prelievo di sangue periferico, mediante stratificazione su Ficoll. L'esigenza di valutare tessuti target alternativi nasce dalla consapevolezza che l'analisi del trascritto basata sull'esecuzione del brushing nasale comporta la perdita di un discreto numero di pazienti al follow up; infatti, il brushing nasale viene rifiutato da alcuni pazienti e non viene eseguito su pazienti di età inferiore ai 9 anni. Quest'ultimo requisito costituisce il principale limite insito nella metodica, soprattutto alla luce del fatto che la Fibrosi Cistica è da considerarsi principalmente una malattia pediatrica.

In particolare, per capire se i profili di espressione del CFTR nei linfociti rispettino quanto osservato a livello dell'epitelio respiratorio, abbiamo preso in considerazione una casistica di pazienti eterozigoti composti per la mutazione F508del e portatori sull'altro allele di una mutazione potenzialmente soggetta a degradazione mediata da NMD. In seguito a consenso informato, è stato ottenuto un campione di sangue periferico dei pazienti selezionati, da cui è stato ricavato l'RNA estratto da linfociti. È stato disegnato un opportuno saggio di RT-PCR fluorescente nella regione dell'esone 11, dove è localizzata la F508del, al fine di consentire l'analisi di espressione dei trascritti specificamente prodotti dai due alleli (Figura 4.10). Considerando l'espressione dell'allele F508del equivalente all'espressione di un allele wild-type, secondo quanto riportato in letteratura, il rapporto tra la quota di trascritto prodotto dall'allele mutato X e la quota di trascritto prodotto dall'allele F508del avrebbe dovuto suggerire l'eventuale livello di degradazione NMD indotto dalla presenza della mutazione X.

[6FAM]GCCTGGCACCATTAAAGAAA



**Figura 4.9:** Rappresentazione schematica del saggio di RT-PCR fluorescente condotto su RNA estratto da linfociti.

I risultati ottenuti dalle RT-PCR fluorescenti condotte su un numero significativo di campioni di RNA da linfociti di pazienti FC, hanno tuttavia fatto emergere un fenomeno di allele drop-out, causato dal livello di espressione molto ridotto del CFTR nei linfociti. I dati quantitativi, riassunti nella tabella 4.3, risultano marcatamente inattendibili, suggerendo l'impossibilità di sostituire l'epitelio nasale con i linfociti per gli studi di espressione del CFTR.

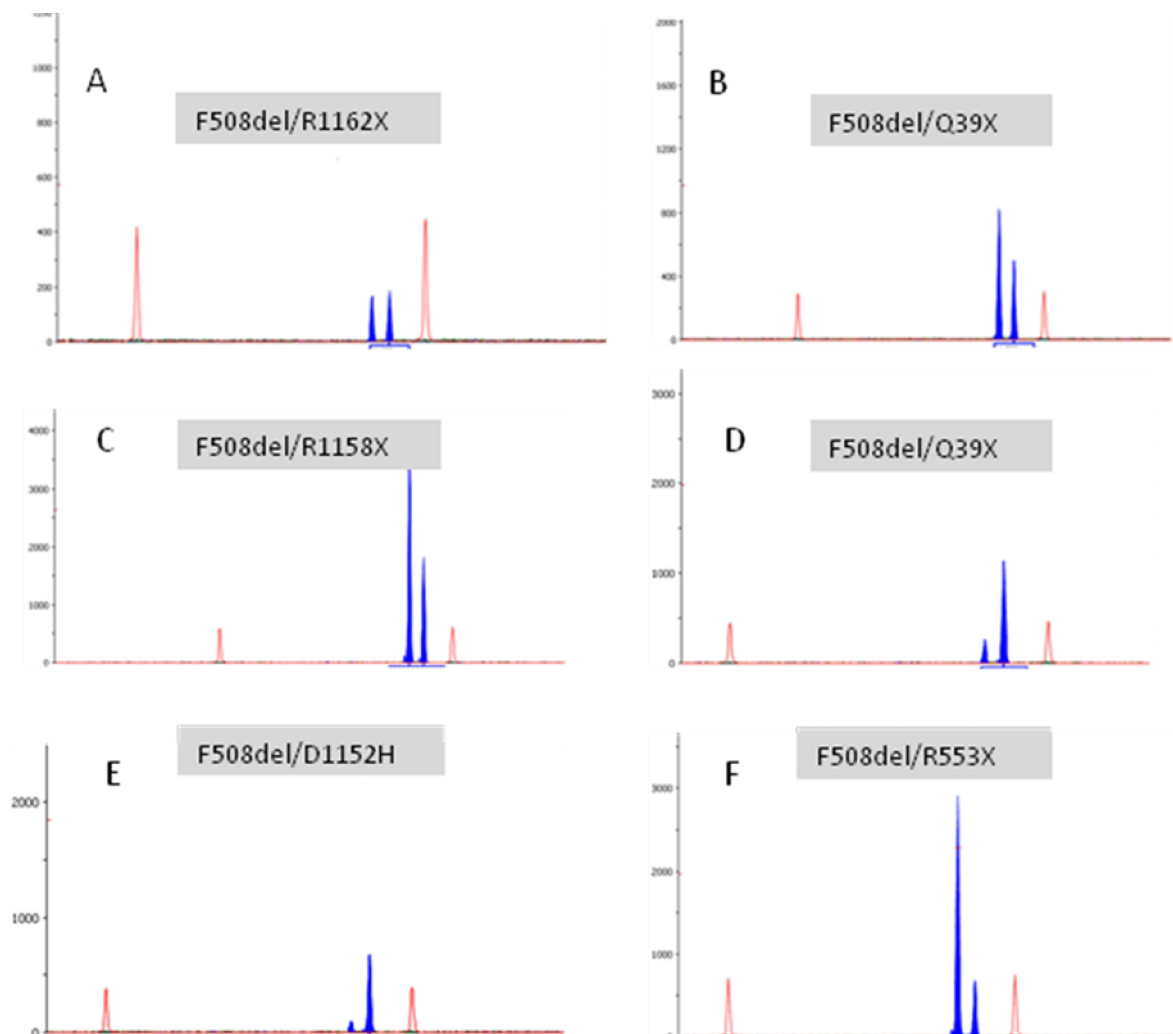
PAZIENTE	ALLELE 1	ALLELE 2	PROFILO DI ESPRESSIONE
FC1	F508del	c.3484 C>T (R1162X)	Espressione del solo allele R1162X
FC2	F508del	G1244E	Espressione del solo allele G1244E
FC3	F508del	c.1624G>T (G542X)	Espressione di entrambi gli alleli
FC4	F508del	c.1624G>T	Espressione del solo allele c.1624G>T
FC5	F508del	c.1624G>T	Espressione del solo allele c.1624G>T
FC6	F508del	c.3889dup (4016insT)	Espressione del solo allele 4016insT
FC7	F508del	c.3472 C>T (R1158X)	Espressione del solo allele F508del
FC8	F508del	1782delA	Espressione del solo allele 1782delA
FC9	F508del	c.2657+5G>A	Espressione di entrambi gli alleli
FC10	F508del	c.2657+5G>A	Espressione del solo allele c.2657+5G>A
FC11	F508del	c.2657+5G>A	Espressione di entrambi gli alleli
FC12	F508del	c.2657+5G>A	Espressione del solo allele c.2657+5G>A
FC13	F508del	c.2657+5G>A	Espressione del solo allele c.2657+5G>A
FC14	F508del	c.948delT (1078delT)	Espressione di entrambi gli alleli
FC15	F508del	c.3909 C>G (N1303K)	Espressione del solo allele F508del
FC16	F508del	c.1585-1G>A	Espressione del solo allele c.1585-1G>A

**Tabella 4.3:** Riassunto dei risultati di RT-PCR fluorescente ottenuti su cDNA estratto dai linfociti di pazienti FC eterozigoti composti per la F508del.

Inoltre, per escludere che il fenomeno di allele drop-out fosse riconducibile ad un insufficiente quantitativo di linfociti estraibili da un singolo prelievo di sangue periferico, è stato effettuato un ulteriore studio su linee linfoblastoidi di pazienti FC eterozigoti per la F508del, gentilmente fornite dal centro FC di Verona. Applicando il medesimo saggio di RT-PCR fluorescente, sono stati ottenuti profili di espressione ugualmente non realistici. In particolare, in figura 4.9 sono riportati i grafici



dell'RT-PCR eseguita su cDNA da linee linfoblastoidi di sei pazienti FC a genotipo noto. I pannelli B e D, relativi a due soggetti entrambi portatori delle mutazioni F508del e Q39X, mostrano l'assoluta mancanza di riproducibilità del livello di espressione di un determinato allele; inoltre, nel pannello E l'allele F508del presenta un'espressione significativamente ridotta, dato non giustificabile con le conoscenze appurate in letteratura.



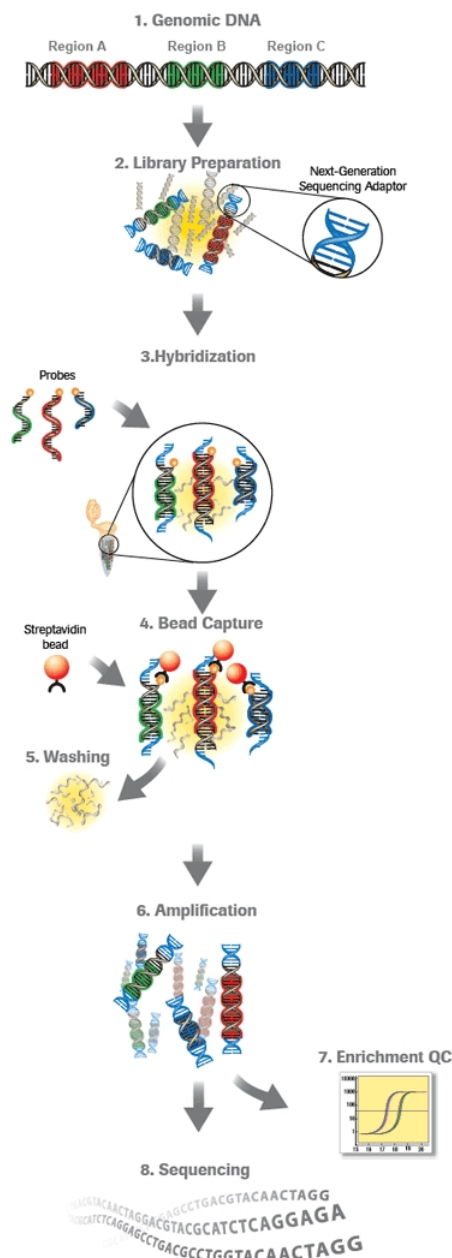
**Figura 4.10:** Rappresentazione dei prodotti di RT-PCR condotta su alcune linee linfoblastoidi ottenute da pazienti FC, il cui genotipo è segnalato. Le aree dei picchi di fluorescenza, corrispondenti ai prodotti di RT-PCR allele-specifici, sono stati misurati con il software Gene Mapper v4.0. L'asse delle X rappresenta la dimensione degli amplificati e l'asse delle Y le unità di fluorescenza. I grafici mostrano la mancanza di corrispondenza tra il genotipo ed il profilo di espressione osservato: in particolare, i pannelli B e D, relativi a due pazienti diversi con uguale genotipo, mostrano profili di espressione opposti, mentre il pannello E mostra un basso livello di espressione dell'allele F508del, non giustificabile con i dati riportati in letteratura.

### **4.3 APPLICAZIONE DEL SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE PER LA RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE CFTR**

Al fine di incrementare ulteriormente la detection rate nella caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da fibrosi cistica, è stato sviluppato un progetto pilota per validare l'applicazione della next-generation sequencing (NGS) su una casistica selezionata di campioni, costituita da pazienti con diagnosi di fibrosi cistica e genotipo non caratterizzato (UN/UN o Mutazione nota/UN) e da alcuni campioni controllo a genotipo noto (Tabella 4.2). Tutti i campioni analizzati presentano un fenotipo classico di Fibrosi Cistica. In particolare, è stato scelto un approccio basato su target-enrichment e NGS, disegnando probes specifiche per l'intero CFTR (sia regioni esoniche che introniche) e per le porzioni esoniche dei geni SCN1A, SCN1B e SCN1G.

Per tale esperimento è stato scelto un kit di custom capture, Nimblegen SeqCap EZ library, Roche, ed il sequenziatore di nuova generazione HiSeq 2000 platform, Illumina. I campioni sono stati analizzati in collaborazione con Yale Genome Center (Yale University, USA).

I dati grezzi forniti dall'esperimento di NGS verranno analizzati mediante l'ausilio di diversi softwares: in primo luogo, le sequenze di ciascun campione verranno allineate con le sequenze di riferimento dei geni considerati; le variazioni di sequenza emerse da tale allineamento verranno valutate utilizzando i database dei polimorfismi noti per escludere le variazioni nucleotidiche non significative. A conclusione di questa flowchart emergeranno nuove variazioni di sequenza che verranno studiate a livello funzionale per verificare l'eventuale ruolo patogenetico e consentire la caratterizzazione molecolare dei pazienti considerati.



**Figura 4.11:** Rappresentazione schematica del protocollo per il custom target resequencing utilizzando il sistema SeqCap EZ Library, Roche.

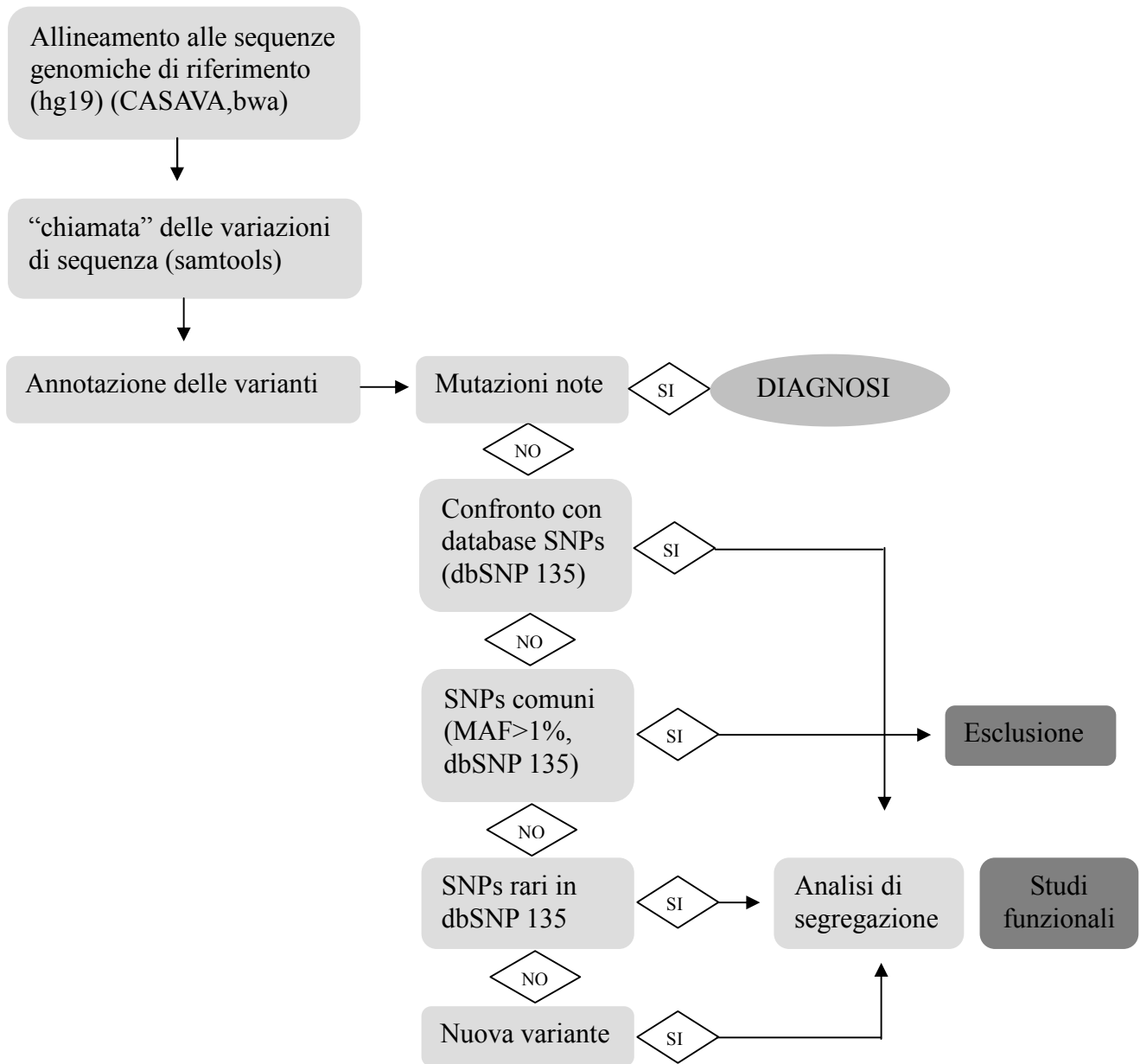
- DNA genomico: il pool di oligo SeqCap EZ viene disegnato specificamente per le regioni target del genoma (CFTR, SCN1A, SCN1B e SCN1G);
- Preparazione della libreria: a partire dal DNA genomico viene preparata la libreria di sequenziamento secondo la metodica standard shot-gun;
- Hibridizzazione: la libreria di sequenziamento viene ibridata al pool di oligo SeqCapEZ;
- Cattura delle biglie: Le biglie di streptavidina vengono utilizzate per catturare il complesso degli oligo e dei frammenti di DNA;
- Lavaggio: i frammenti di DNA vengono rimossi;
- Amplificazione: Il pool arricchito dei frammenti specifici di DNA è amplificato per PCR;
- Arricchimento QC: La qualità dell'arricchimento viene valutata da PCR quantitative su loci di controllo;
- Sequenziamento: Il prodotto finale è il sequenziamento della libreria arricchita per le regioni target, utilizzate per il sequenziamento high throughput.

Nel pannello sottostante è rappresentata la piattaforma HiSeq 2000, Illumina, utilizzata per il sequenziamento di nuova generazione.



Campione	GENOTIPO		Sesso, età	Fenotipo clinico
	Allele 1	Allele 2		
CF1	c.220 C>T-c.3808 G>A (R74W-D1270N)	UN	F, †	TS positivo, infezioni respiratorie, fenotipo FC classico
CF2	c.1585-1 G>A (1717- 1G>A)	UN	F, 36	
CF3	UN	UN	M, 48	
CF4	c.1585-1 G>A	UN	F, 28	
CF5	2789+5G>A	UN	M, 27	
CF6	Y89C	UN	M, 33	
CF7	UN	UN	M, 35	
CF8	F508del	UN	M, 5	
CF9	F508del	UN	F, 13	
CF10	c.2657+5 G>A (2789+5G>A)	UN	M, 10	
CF11	R347P	UN	M, 10	
CF12	c.54_273del	UN	F, 39	Portatrice
CF13	UN	UN	M, 50	TS positivo, infezioni respiratorie ricorrenti
CF14	UN	UN	F, 25	
CF15	c.1002- 1110_1113delTAAG	c.182C>T	M, 13	
CF16	T338I	UN	M, 18	
CF17	G542X	c.1002- 1110_1113delTAAG	F, 30	
CF18	G542X	R117C	M, 31	
CF19	UN	UN	F, 5	
CF20	c.3140-26 A>G (3272-26A>G)	UN	M, 8	
CF21	P449A	UN	M, 7	

Tabella 4.3: Casistica dei pazienti FC sottoposti a sequenziamento NGS. I campioni CF12, CF15, CF17 e CF18 sono stati utilizzati come controlli positivi per valutare la sensibilità e specificità del sistema di cattura custom e dei softwares di analisi applicati. Il campione CF12, controllo interno per l'identificazione di delezioni, è un genitore portatore eterozigote di un affetto FC.



**Figura 4.12:** Flowchart dell'analisi dei dati grezzi prodotti dal sequenziamento di nuova generazione, finalizzata all'identificazione di mutazioni note o di nuove varianti di significato patogenetico.

## 5 DISCUSSIONE

Attualmente, l'analisi molecolare del gene CFTR ha condotto all'identificazione di oltre 1800 mutazioni, polimorfismi e riarrangiamenti (dati raccolti dal Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

Il laboratorio di Genetica Molecolare del Policlinico di Milano, presso il quale è stato svolto tale progetto di dottorato (in collaborazione con il laboratorio del Prof. Duga, Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale), raccoglie la casistica dei pazienti FC afferenti al Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica in Lombardia; la ricerca mutazionale nel gene CFTR, basata su tre step progressivi (screening del pannello di mutazioni più frequenti, ricerca di riarrangiamenti genici e sequenziamento delle regioni codificanti del CFTR), consente di raggiungere una detection rate di circa il 94%. La necessità di incrementare la capacità diagnostica delle analisi molecolari ha portato ad estendere lo studio del gene CFTR a livello del trascritto, mediante l'estrazione dell'RNA dall'epitelio nasale, che costituisce il tessuto con le caratteristiche fisiologiche dell'epitelio respiratorio delle basse vie aeree più facilmente prelevabile. L'analisi dell'mRNA del CFTR ha consentito di identificare nuove mutazioni patogenetiche, di rilevare il danno molecolare di varianti considerate polimorfiche e di indagare i complessi meccanismi indotti dalle mutazioni di splicing, responsabili di un significativo 12% degli alleli FC a livello mondiale. Lo studio del trascritto del CFTR, attualmente riconosciuto come approfondimento diagnostico, ha fatto registrare nel nostro laboratorio un incremento dello 0,6% della detection rate. In particolare, in questo lavoro di dottorato sono stati caratterizzati tre diversi difetti molecolari:

- ✓ A) Una duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18 del gene CFTR;
- ✓ B) Una variazione di sequenza (c.2679G>T), inizialmente considerata polimorfica, responsabile della formazione di un sito di splicing, che porta allo skipping di una porzione dell'esone 17;
- ✓ C) Una mutazione di splicing nell'introne 11 (c.1584+18672 A>G), responsabile della formazione di due varianti aberranti di trascritto, con l'inserzione di pseudoesoni di 65 e 104 nucleotidi.

A) La duplicazione estesa dall'esone 7 all'esone 18, riportata per la prima volta da Pepermans et al. (23/09/2010), è stata identificata in una paziente FC di un anno di età, eterozigote composta per la F508del, e caratterizzata da un fenotipo clinico FC severo, analogo a quello descritto da Pepermans per la ragazza brasiliana di 14 anni portatrice del medesimo riarrangiamento. La duplicazione,

inizialmente identificata su DNA mediante metodica MLPA, è stata caratterizzata e confermata dall'applicazione degli array-cgh e dall'analisi del trascritto. In particolare, il sequenziamento del cDNA ha permesso di definire le regioni di giunzione della duplicazione: l'ultimo nucleotide dell'esone 18 è seguito esattamente dal primo nucleotide dell'esone 7 duplicato, e l'ultimo nucleotide dell'esone 18 duplicato è seguito dall'esone 19. Tale riarrangiamento determina quindi un'inserzione out-of-frame di 2244 basi, con la formazione di un codone di stop dopo 8 aminoacidi dall'inizio dell'esone 7 duplicato. Il segnale di stop è localizzato nella regione NBD2 e plausibilmente causa la produzione di una proteina non funzionante. Per caratterizzare in maggiore dettaglio il meccanismo sottostante a tale riarrangiamento, sono state analizzate le regioni fiancheggianti i punti di rottura della duplicazione, utilizzando i softwares RepeatMasker e RECON. Questi tools bioinformatici hanno rilevato la presenza di due elementi SINE e di un elemento ripetuto semplice nell'introne 6 e la presenza di tre elementi SINE e due LINE nell'introne 18. L'allineamento di queste sequenze Alu, tuttavia, non mostra un livello di omologia tale da giustificare un eventuale evento di ricombinazione omologa causativa della duplicazione. Eseguendo un allineamento multiplo tra l'introne 6 e l'introne 18 mediante software ClustalW, è emersa invece una regione omologa di 230 nucleotidi, che potrebbe aver favorito un meccanismo di ricombinazione.

B) La caratterizzazione del ruolo patogenetico della mutazione sinonima c.2679 G>T, inizialmente considerata come variante polimorfica, evidenzia l'importanza di estendere l'analisi molecolare a livello del trascritto. Anche le mutazioni sinonime, infatti, possono indurre meccanismi di splicing aberrante, creando nuovi siti di splicing all'interno dell'esone; nel caso specifico, la mutazione c.2679 G>T determina la formazione di un nuovo sito donatore di splicing, causando lo skipping di 230 nucleotidi dell'esone 17. La perdita di questa regione codificante si traduce in una proteina mancante di 76 aminoacidi posti nel IV loop proteico contenente due siti glicosilati e nell'ottavo dominio transmembranario, in cui è localizzata l'asparagina 934; tale residuo, interagendo con l'arginina 367 del sesto dominio di membrana, determina la stabilizzazione dell'architettura dei pori, favorendo il trasporto del cloro.

I meccanismi patogenetici indotti da mutazioni sinonime, inoltre, risultano abbastanza frequenti: circa un quarto delle variazioni sinonime negli esoni 10 e 13 del gene CFTR danno origine a difetti di splicing [Pagani F, Buratti E et al, 2003; Pagani F, Stuani C et al, 2003; Aznarez I, Chan EM et al, 2003].

C) La mutazione c.1584+18672 A>G, inizialmente identificata in due pazienti eterozigoti composti per la F508del e sottoposti a brushing nasale, è stata riscontrata in altri tre soggetti FC in seguito all'inserimento dell'introne 10 nel sequenziamento del CFTR su DNA. Tale variazione registra una significativa frequenza dell'1% all'interno della casistica studiata nel nostro laboratorio. Nonostante la comune origine geografica (Italia settentrionale) dei cinque probandi suggerisse un'origine mutazionale da un ancestore comune, l'analisi dell'aplotipo condotto mediante l'utilizzo di otto marcatori localizzati nel locus del CFTR, ha dimostrato che la mutazione ha avuto origine da almeno due eventi indipendenti. Lo studio degli effetti indotti dalla c.1584+18672 A>G sullo splicing del CFTR è stato realizzato mediante un approccio combinato in vivo ed in vitro, dal quale è emerso che:

- Il trascritto aberrante che include lo pseudoesone viene prodotto a bassi livelli anche in assenza della mutazione;
- La mutazione determina la formazione di due diverse varianti di trascritto aberrante, causate dall'attivazione di due siti criptici accettori di splicing.

Dagli studi in vivo condotti su tre pazienti mediante RT-PCR fluorescenti, abbiamo potuto riscontrare una riproducibilità nel profilo di espressione delle tre specie di mRNA prodotte in presenza della mutazione c.1584+18672 A>G (wild type, inserzione di 65 bp ed inserzione di 104 bp), ad eccezione del livello di espressione del trascritto che include lo pseudoesone di 65 bp nel paziente P2, caratterizzato da un aplotipo differente. Questa osservazione potrebbe suggerire la presenza di eventuali elementi regolatori in cis, modulatori dell'espressione delle diverse isoforme di splicing. La maggiore efficienza di riconoscimento del sito accettore di splicing associato all'inserzione di 104 nucleotidi, riscontrata sia negli studi in vivo che in vitro, inoltre, si contrappone ai valori di forza di splicing predetti in silico per i siti criptici specificamente indotti dalla mutazione. Questa discrepanza sottolinea la complessità dei meccanismi di regolazione coinvolti nei processi di splicing e suggerisce l'importanza acquisita dagli studi sperimentali nella caratterizzazione delle mutazioni di splicing.

Un altro interessante contributo consiste nella dimostrazione che la mutazione c.1584+18672 A>G mantiene un livello residuo di splicing wild type del CFTR. Dati in letteratura indicano che mutazioni di splicing compatibili con splicing wild type residui compresi tra il 4 ed il 20% sono associati a fenotipi clinici moderati [*Rave-Harel N, Kerem E et al, 1997; Chu CS, Trapnell BC et al., 1993*]. Nei nostri pazienti, l'espressione del trascritto CFTR completamente wild-type è riconducibile al  $3.5\% \pm 1.94\%$ , in linea con il 4% dell'mRNA WT del CFTR misurato in un paziente portatore della mutazione 2789+5G>A e caratterizzato da un fenotipo simile (sufficienza pancreatica, infezioni respiratorie moderate ed infertilità maschile) [*Highsmith WE, Burch LH et al,*



1997].

Il livello minimo di trascritto del CFTR necessario per una corretta funzionalità differisce tra i vari organi implicati nella fisiopatologia della FC, e i vasi deferenti sembrano costituire il tessuto maggiormente sensibile [Rave-Harel N, Kerem E et al, 1997]. Infatti i due probandi di sesso maschile che si sono sottoposti ad una valutazione dello spermogramma presentano CBAVD, fenotipo atteso in pazienti portatori di mutazioni che mantengono livelli di mRNA wild type del CFTR inferiori al 4%. Dati di letteratura indicano che mutazioni associate al 5% di mRNA completamente wild-type (ad esempio, la mutazione 3272-26 A>G), sono invece compatibili con la fertilità maschile [Ramalho A.S., Beck S., et al, 2002].

La valutazione qualitativa e quantitativa di eventuali livelli residui di trascritto wild-type associato a mutazioni di splicing risulta quindi fondamentale per predire il fenotipo clinico atteso tra i diversi tessuti; in particolare, mentre è appurato in letteratura che un'espressione del 4% di trascritto CFTR wild-type è sufficiente a garantire una sintomatologia respiratoria moderata, rimane da chiarire la soglia di funzionalità del CFTR necessaria per il mantenimento della fertilità maschile. A tale scopo, sarebbe interessante sviluppare uno studio dell'espressione del CFTR specifica per il tessuto testicolare.

Inoltre, alla luce dei bassi livelli di funzionalità del CFTR compatibili con fenotipi clinici moderati, si evince che la fibrosi cistica possa costituire un buon target per lo sviluppo di terapie geniche e di approcci finalizzati al ripristino di una funzione minima del canale del CFTR (ad esempio utilizzo di small interfering RNA e di molecole che consentono di bypassare codoni di stop generati da mutazioni). Mentre allo stato attuale gli studi clinici di terapia genica non hanno raggiunto i risultati attesi a causa delle difficoltà incontrate nell'efficienza e durata di espressione di vettori contenenti una copia wild type di CFTR [Davies et al, 2001], maggiori prospettive sembrano avere approcci terapeutici mutazione-specifici [Kerem E, 2006; Linde L e Kerem B, 2008; Wilschanski M e Kerem M, 2011].

In funzione di una futura medicina personalizzata, in questo progetto di dottorato abbiamo sviluppato due diversi filoni di ricerca, volti a migliorare l'analisi molecolare del gene CFTR:

- valutazione dell'uso di linfociti e linee linfloblastoidi ottenute da pazienti FC come tessuto target per lo studio del trascritto del CFTR;
- messa a punto di un kit di sequenziamento di nuova generazione per l'estensione dello screening mutazionale del CFTR all'intero gene.

I) Le cellule dell'epitelio nasale, prelevate mediante uno spazzolamento effettuato con un citobrush, costituiscono ad oggi il tessuto target ideale per l'analisi del trascritto del CFTR, in quanto

garantiscono un ottimo livello di espressione del gene e risultano accessibili con una metodica non particolarmente invasiva. Tuttavia, poichè il brushing nasale non può essere effettuato su soggetti pediatrici di età inferiore ai 9 anni e talvolta non viene accettato come approfondimento diagnostico dai pazienti, non sempre è possibile completare l'analisi molecolare del CFTR a livello di trascritto. Questi limiti insiti nella metodica ci hanno portato a valutare la possibilità di utilizzare i linfociti e/o le linee linfoblastoidi come tessuto alternativo per l'estrazione di RNA. Il progetto pilota applicato ai linfociti estratti da un prelievo di sangue periferico, è stato sviluppato su una casistica di pazienti eterozigoti composti per la F508del e per una mutazione potenzialmente soggetta a NMD (mutazioni nonsense e di splicing che determinano la formazione di un codone di stop prematuro). Il saggio di RT-PCR fluorescente disegnato nella regione della F508del, discriminando tra i due alleli, avrebbe dovuto consentire di apprezzare i diversi livelli di espressione associati alla F508del (equivalente all'espressione di un allele wild-type) e alla mutazione nonsense/splicing. I risultati ottenuti, invece, presentano un profilo random attribuibile al fenomeno dell'allele drop-out, causato dal basso livello di espressione del CFTR nei linfociti. Sono state quindi condotte prove sperimentali su linee linfoblastoidi ottenute da pazienti FC (F508del/mutazione nonsense), che non hanno risolto il problema di espressione tessuto-specifica del CFTR. In conclusione, in accordo con i dati presenti in letteratura, l'epitelio nasale rimane attualmente il miglior tessuto target per le analisi condotte sul trascritto del CFTR.

II) Benchè l'analisi del trascritto del CFTR e gli studi funzionali siano necessari per la corretta caratterizzazione del danno molecolare indotto da una specifica mutazione, è auspicabile che l'applicazione di tecniche di sequenziamento di nuova generazione, estendendo lo scanning del gene alle regioni non codificanti, possa incrementare la detection rate, contribuendo ad identificare nuove variazioni introniche e regioni modulatrici del gene CFTR. Ad esempio, un recente paper [Amato F, Seia M et al., 2013] ha mostrato l'importanza di sequenziare la regione del 3'UTR, in cui sono localizzate sequenze riconosciute da microRNA modulatori dell'espressione del CFTR. Per lo scanning completo del gene del CFTR è stato selezionato un kit di cattura custom, Nimblegen SeqCap EZ library (Roche) applicato alla piattaforma HiSeq 2000 (Illumina). Il sequenziamento, eseguito in service presso lo Yale Genome Center (Yale University, USA), è stato condotto su una casistica di 21 pazienti FC, di cui 3 a genotipo noto per validare la funzionalità del sistema, 5 con due alleli non caratterizzati e 13 con una sola mutazione identificata. In seguito all'analisi dei dati prodotti dal sequenziamento mediante diversi tools bioinformatici, ci aspettiamo di trovare nuove potenziali mutazioni, che verranno caratterizzate mediante approcci combinati in vitro ed in vivo.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

L'identificazione delle due mutazioni causative della FC, anche in presenza di una chiara diagnosi clinica, sta acquisendo un'importanza crescente, non solo ai fini di una corretta consulenza genetica, ma soprattutto in previsione di un efficace trattamento terapeutico. L'analisi molecolare del gene CFTR deve quindi estendersi ai livelli del trascritto e del corrispondente prodotto proteico, avvalendosi di studi funzionali in vivo ed in vitro per indagare il ruolo patogenetico di nuove variazioni di sequenza/riarrangiamenti.

Parallelamente alla messa a punto di una nuova metodica diagnostica basata sulle tecnologie di NGS ed array-gch, che miglioreranno l'efficienza della ricerca mutazionale a costi competitivi, sarà interessante sviluppare diverse linee di ricerca:

- ✓ Valutazione dell'efficacia di small interfering RNA mutazione-specifici nel ripristino della funzionalità del CFTR: in particolare, la mutazione c.1584+18672 A>G caratterizzata in questo progetto, potrebbe rappresentare un buon candidato per un approccio mediato da siRNA.
- ✓ Caratterizzazione mediante studi funzionali di eventuali nuove mutazioni identificate dal sequenziamento NGS condotto su una casistica di 18 pazienti FC;
- ✓ Valutazione del ruolo assunto dai microRNA nella modulazione dell'espressione del CFTR e nello sviluppo di particolari meccanismi patogenetici sottostanti la malattia della FC.

## 6 BIBLIOGRAFIA

Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation *N Eng J Med* 2010;363:1991-2003.

Aherns R, Rodriguez S, Yen K, Davies JC. VX-770 in subjects 6 to 11 years with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *Ped Pulm* 2011;46(Suppl):A203.

Al-Nakkash L, Hu S, Li M, Hwang TC. A common mechanism for cystic fibrosis conductance regulator protein activation by genistein and benzimidazole analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:464–72.

Amato F, Seia M, Giordano S, Elce A, Zarrilli F, et al. (2013) Gene Mutation in MicroRNA Target Sites of CFTR Gene: A Novel Pathogenetic Mechanism in Cystic Fibrosis? *PLoS ONE* 8(3): e60448. doi:10.1371/journal.pone.0060448

Aznarez I, Chan EM, Zielenski J, Blencowe BJ, Tsui LC: Characterization of disease-associated mutations affecting an exonic splicing enhancer and two cryptic splice sites in exon 13 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Mol Genet* 2003, 12:2031–2040

Baudouin-Legros Maryvonne, Franck Brouillard, Marc Cougnon, Danielle Tondelier, Tony Leclerc, and Aleksander Edelman. Modulation of CFTR gene expression in HT-29 cells by extracellular hyperosmolarity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278: C49-C56

Baralle M, Baralle D, De Conti L, Mattocks C, Whittaker J, Knezevich A, EFrench-Constant C, Baralle FE. Identification of a mutation that perturbs NF1 agene splicing using genomic DNA samples and a minigene assay. *J Med Genet* 2003;40:220-2.

Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, et al., Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 2009;302:1076-83.

Bedwell DM, Kaenjak A, Benos D et al., Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 1997;3:1280-1284.

Bertrand J, Boucherle B, Billet A, Melin-Heschel P, Dannhoffer L, Vandebrouck C, et al.

Identification of a novel water-soluble activator of wild-type and F508del CFTR: GPact-11a. *Eur Respir J* 2010;36:311–22.

Bienvenu T, Beldjord C, Chelly J, Fonknechten N, Hubert D, Dusser D, Kaplan JC. Analysis of alternative splicing patterns in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using mRNA derived from lymphoblastoid cells of cystic fibrosis patients. *Eur J Hum Genet* 1996;4: 127–134.

Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003;72: 291–336.

Bobadilla J.L. et al. Cystic Fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlations with incidence data and application to screening. *Hum Mut* 2002, 19: 575-606

Cai Z, Sheppard DN. Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. *J Biol Chem* 2002;277:19546–53.

Cai Z, Taddei A, Sheppard DN. Differential sensitivity of the cystic fibrosis (CF)-associated mutants G551D and G1349D to potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl<sup>-</sup> channel. *J Biol Chem* 2006;281:1970–7

Chiba-Falek O, Kerem E, Shoshani T, Aviram M, Augarten A, Bentur L, Tal A, Tullis E, Rahat A, Kerem B. The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849+10 kb C→T mutation. *Genomics* 1998;53: 276–283

Chillon M, Dork T, Casals T, Gimenez J, Fonknechten N, Will K, Ramos D, Nunes V, Estivill X. A novel donor splice site in intron 11 of the CFTR gene, created by mutation 1811+1.6kbA→G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 1995;56: 623–629

Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1683-1692

Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, DE Boeck K, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB, Pilewski JM, et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an

investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* 2012;67:12-18.

Clementi F., Fumagalli G., et al. *Farmacologia generale e molecolare*. UTET 1999; pp 217-219.

Colombo C. Liver disease in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:529-536.

Costantino L, Claut L, Paracchini V, Coviello DA, Colombo C, Porcaro L, Capasso P, Zanardelli M, Pizzamiglio G, Degiorgio D, Seia M. A novel donor splice site characterized by CFTR mRNA analysis induces a new pseudo-exon in CF patients. *J Cyst Fibros* 2010 Dec;9(6):411-8.

Costantino L, Rusconi D, Soldà G, Seia M, Paracchini V, Porcaro L, Asselta R, Colombo C, Duga S. Fine characterization of the recurrent c.1584+18672 A>G deep-intronic mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013 May;48(5):619-25.

Costantino L, Rusconi D, Claut L, Colombo C, Novara F, Paracchini V, Porcaro L, Capasso P, Zuffardi O, Seia M. A wide methodological approach to identify a large duplication in CFTR gene in a CF patient uncharacterised by sequencing analysis. *J Cyst Fibros* 2011 Dec;10(6):412-7.

Darnell RB. Developing global insight into RNA regulation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2007; LXXI:1-7.

Davis P., Drumm M., Konstan M. Cystic fibrosis: State of the art; *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1996; 154:1229-1256

Davies JC, Alton EFW. Gene therapy for cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2010;7:408-14.

Davies JC, Geddes DM, Alton EFW Gene therapy for cystic fibrosis *J Gene Med* 2001; 3: 409-417.

De Boeck K et al. Cystic Fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006 : 61: 627-635.

Dérand R, Bulteau-Pignoux L, Becq F. Comparative pharmacology of the activity of wild-type and G551D mutated CFTR chloride channel: effect of the benzimidazolone derivative NS004. *J Membr Biol* 2003;194:109-17.

Doring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS, Consensus Study Group. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis; *J Cyst Fibros* 2012 Dec;11(6):461-479.

Drumm ML, Constan MW, Schluchter MD et al, Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;353(14):1443-53.

Farmen Sara L, Philip H. Karp, Philip Ng, Donna J. Palmer, David R. Koehler, Jim Hu, Arthur L. Beaudet, Joseph Zabner, and Michael J. Welsh. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl<sup>-</sup> transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L1123-L1130, 2005.

Gabriel S., Brigman K., Koller B., Boucher R., Stutts M. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model; *Science* 1993; 266:107-109

Gorini L, Kataja E. Phenotypic repair by streptomycin of defective genotypes in E.coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;51:487-493.

Haardt M et al. C-terminal truncations destabilize the Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30; 274(31): 21873-7.

Hermann T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1841-1852.

Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, Gorvoy JD, Quittel L, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Collins FS, Knowles MR. Identification of a splice site mutation (2789+5G>A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum Mutat* 1997;9:332-338.

Hoffmann LR, Bonnie WR. Cystic Fibrosis Therapeutics. *CHEST* 2013;143;1:207-213.

Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 1996;4:467-469

Kaiser J. Personalized medicine. New cystic fibrosis drug offers hope, at a price. *Science* 2012;335:645.

Kerem E, MD, Corey M, M Sc, Kerem B, et al. The relations between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation ( $\Delta F508$ ). *N Engl J Med* 1990, Vol. 323, N° 22, 1517-22.

Kerem E. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy *Pediatr Pulmonol* 2005;40:183-196.

Kim E, Goren A, Ast G. Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays* 2007;30:38–47.

Knowles MR, Durie PR. What is cystic fibrosis? *N Engl J Med* 2002; 347: 439-42.

Jones A., Wallis C., Kearney C.; 2004; Recombinant human deoxyribonuclease for cystic fibrosis. The Cochrane Library, Issue 3, Chichester, UK; John Wiley & Sons, Ltd

Le Hir, H. et al. The exon–exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 2001;20, 4987–4997.

Lejeune, F. et al. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 2003;12, 675–687.

Lewis M., Lewis E., Amos J., Tsongalis G. Cystic fibrosis; *Am. J. Clin. Pathol.* 2003; 120:3-13.

Linde L e Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic disease. *Trends in Genetics* 2008;24;11.

Linde, L. et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J. Clin. Invest.* 2007;117, 683–692

Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy *Clinical Biochemistry* 45 (2012) 1132–1144.

Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 2011;144:16–26.

Marden JH. Quantitative and evolutionary biology of alternative splicing: how changing the mix of alternative transcripts affects phenotypic plasticity and reaction norms. *Heredity* 2006; 100:111–20.

Nissim-Rafinia M, Chiba-Falek O, Sharon G, Boss A, Kerem B. Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations. *Hum Mol Genet*



2000;9: 1771–1778.

Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002;18: 123–127.

Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, Eidelman O, Pollard HB, Yankaskas JR, Kerem B. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep* 2004;5: 1071–1077

Orestein D., Rosestein B., Stern R.; 2000; *Cystic fibrosis medical care*; Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia.

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

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE. Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J Biol Chem*. 2003 Jul 18;278(29):26580-8.

Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, Casals T, Baralle FE. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet* 2003;12: 1111–1120

Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ, Verkman AS. Small-molecule correctors of defective deltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 2005;115:2564-2571

Pier G. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97:8822-8828

Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27: 619–627

Ramalho AS, Beck S, Penque D, Gonska T, Seydewitz HH, Mall M, Amaral MD. Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525–1G>A shows use of multiple alternative

splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers. *J Med Genet* 2003;40: e88

Ratjen F e Doring G. Cystic Fibrosis. *Lancet* 2003;22;361:681-9.

Rave-Harel N, Kerem E, Nissim-Rafinia M, Madjar I, Goshen R, Augarten A, Rahat A, Hurwitz A, Darvasi A, Kerem B. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1997;60: 87–94

Riordan J.R. et al. Identification of the Cystic Fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066–73.

Roque T, Boncoeur E, Saint-Criq V, Bonvin E, Clement A, Tabary O, et al. Proinflammatory effect of sodium 4-phenylbutyrate in DF508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator lung epithelial cells: involvement of extracellular signal-regulator protein kinase 1/2 and c-Jun-NH2-terminal kinase signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326:949–56.

Rowe S, Sermet-Gaudelus I, Konstan M, Kerem E, Wilschanski M, DeBoeck K, Accurso F, Miller NL, Elfring GL, Barth J, Ajayi T. Results of the phase 3 study of ataluren in nonsense mutation cystic fibrosis *Ped Pulmonol* 2012;I 35 (Suppl):A193

Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, Bismuth E, REinert P, Lenoir G, Lesure JF, Rousset JP, Edelman A. In vitro prediction of stop codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 2007;5:5.

Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, Miller NL, Constantine S, Reha A, Ajayi T, Elfring GL, Miller LL, Ataluren (PTC124) induces CFTR protein expression and activity in children with nonsense-mutation cystic fibrosis *Am J Respir Care Med* 2010;182:1262-1272

Trapnell BC, Chu CS, Paakko PK, Banks TC, Yoshimura K, Ferrans VJ, Chernick MS, Crystal RG. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 1;88(15):6565-9.

Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Tumbull A, Singh A,

Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. PNAS 2009;106:18825-18830.

Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc Natl Acad Sci USA 2011;108:18843-18848.

Vankeerberghen A et al. The Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. J Cystic Fibrosis. 2002; 1: 13–29.

Varga K, Goldstein RF, Jurkuvenaite A, Chen L, Matalon S, Sorscher EJ, Bebok Z, Collawn JF. Enhanced cell-surface stability of rescued deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by pharmacological chaperones Biochem J 2008;410:555-564

Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. N Engl J Med 2003;349:1433-1441.

Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Cohen M, Armoni S, Yaakov Y, Pugatsch T, Cohen-cymerknoh M, Miller NL, Reha A, Northcutt VJ, Hirawat S, Donnelly K, Elfring GL, Ajayi T, Kerem E. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis Eur Respir J 2011;38:59-69.

Wilschanski M and Kerem E. New drugs for cystic fibrosis. Expert Opin. Investig Drugs 2011;20(9):1285-1292.

Wilschanski M. Novel therapeutic approaches for cystic fibrosis Discov Med 2013;15(81):127-33.

Wilmott RW. Making the diagnosis of Cystic Fibrosis. J Pediatr 1998; 132: 563-65.

Zielenski J, Bozon D, Markiewicz D, Aubin G, Simard F, Rommens JM, Tsui LC. Analysis of CFTR transcripts in nasal epithelial cells and lymphoblasts of a cystic fibrosis patient with 621+1G→T and 711+1G→T mutations. Hum Mol Genet 1993;2: 683–687

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof.ssa Colombo per la disponibilità dimostratami durante tutto il percorso del dottorato di ricerca.

Ringrazio la Dott.ssa Seia e il Prof. Duga per avermi permesso di lavorare nei loro laboratori, supportandomi con la loro esperienza e le loro competenze.

Ringrazio Lucy per avermi trasmesso i suoi preziosi insegnamenti, che mi hanno fatto crescere professionalmente e umanamente.

Ringrazio tutte le persone che hanno condiviso con me il lavoro in laboratorio.

Ringrazio mio marito Michele per la serenità e la forza che riesce a trasmettermi.

Ringrazio i miei suoceri e gli amici che mi accompagneranno nella fase finale di questo progetto di dottorato.