

**Le varianti qualitative e quantitative
dello *splicing* e le malattie genetiche**

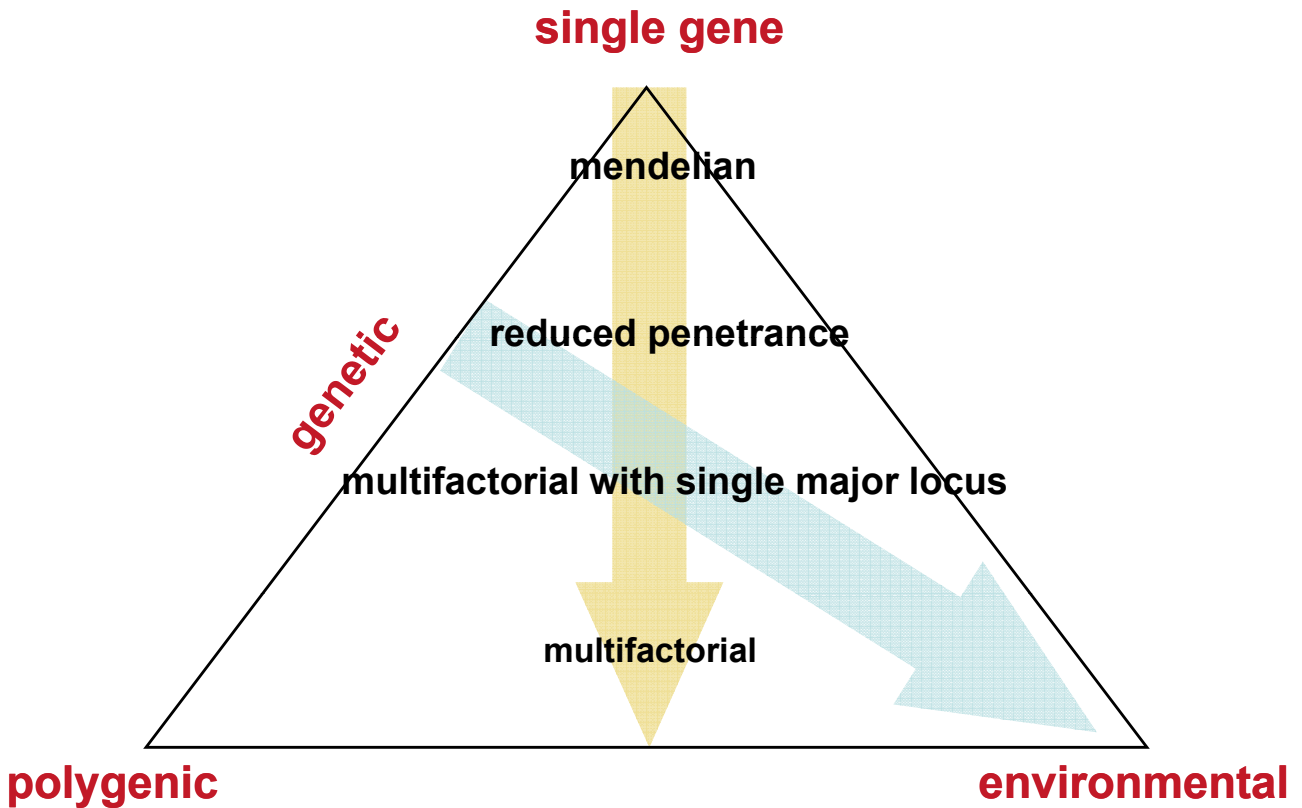
Tiziana Venesio

Laboratorio di Patologia Molecolare

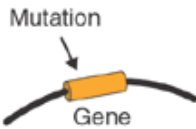
IRCC, Candiolo

THE SPECTRUM OF HUMAN CHARACTERS

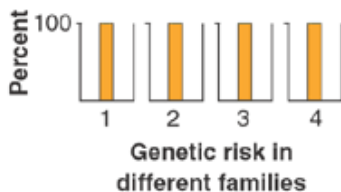
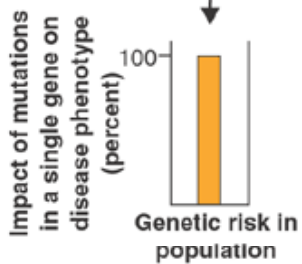
few characters are purely mendelian, purely polygenic or purely environmental



Monogenic disorder



Inheritance pattern
(dominant or recessive)



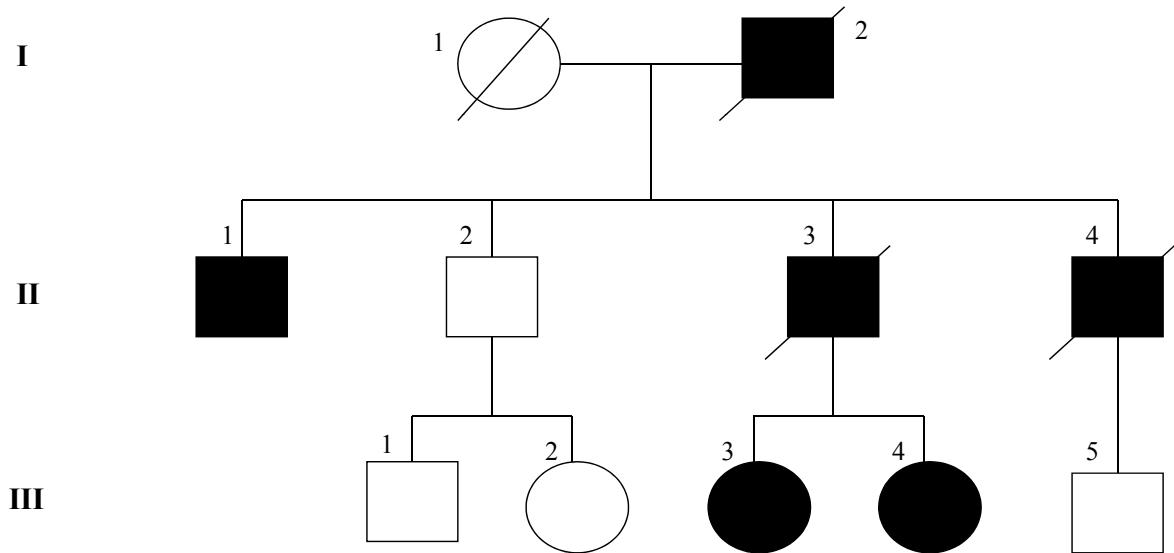
MONOGENIC DISEASES

In monogenic diseases, mutations in a single gene are both necessary and sufficient to produce the clinical phenotype and to cause the disease.

The impact of the gene on genetic risk for the disease is the same in all families.

From Leena Peltonen and Victor A. McKusick; Science 2001

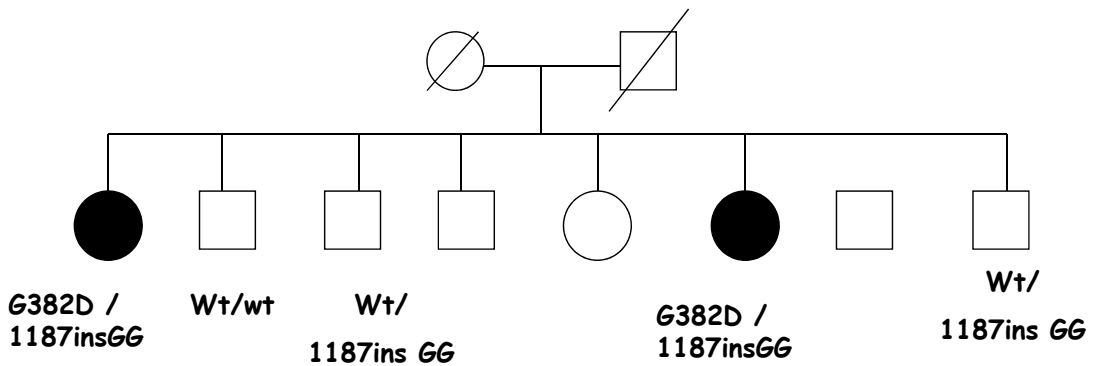
Eredità dominante



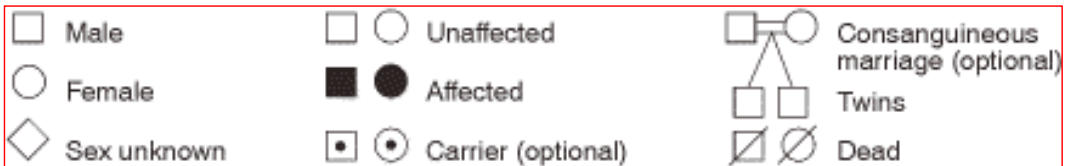
Tratto dominante = un solo allele malato è sufficiente per produrre la patologia

Poliposi adenomatosa familiare, HNPCC, gene per la suscettibilità al tumore della mammella e dell'ovaio etc

Eredità recessiva



Tratto recessivo = necessari entrambi gli alleli malati per esprimere la malattia : alcune forme di tumori da danno dei sistemi del riparo, alcune poliposi etc.

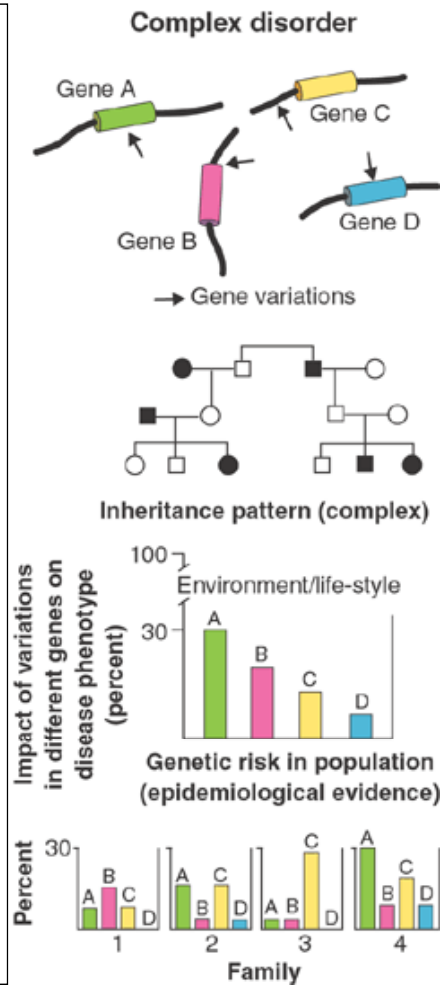


COMPLEX DISEASES

In complex disorders with multiple causes, variations in a number of genes result in a genetic predisposition to a clinical phenotype.

Pedigrees reveal no Mendelian inheritance, and gene mutations are often neither sufficient nor necessary to explain the disease phenotype.

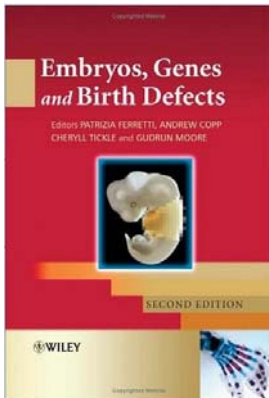
From Leena Peltonen and Victor A. McKusick; Science 2001



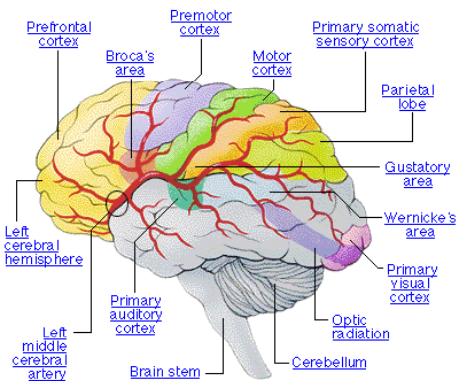
Complex Diseases



Cardio-vascular diseases

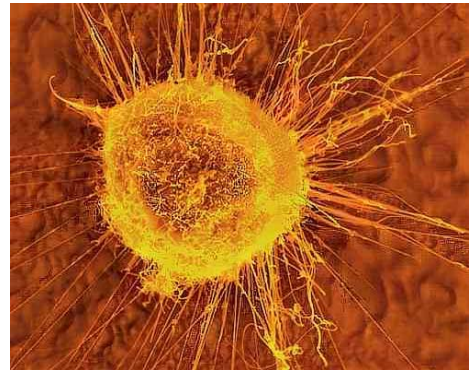


Non-syndromic birth defects



Psychiatric and degenerative disease of brain

Cancer



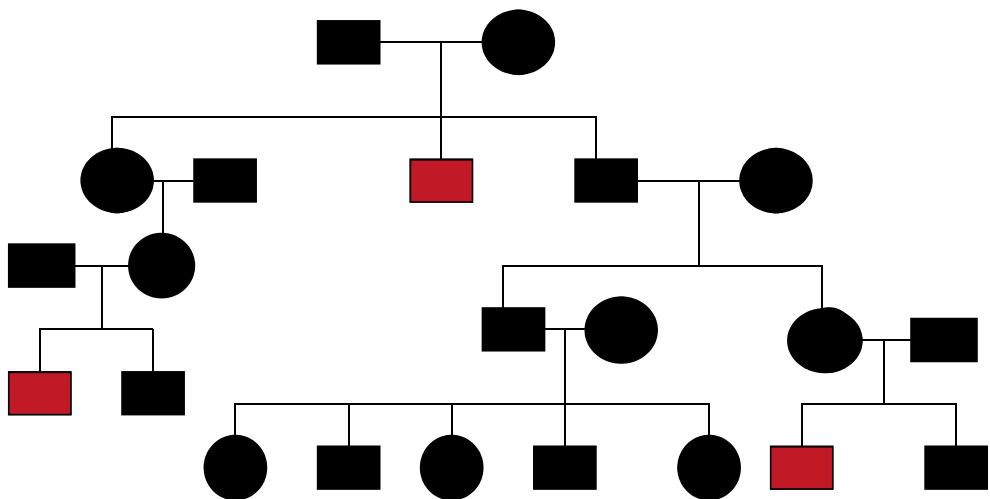
Complex Diseases

- **Selected Characteristics**

- Can aggregate in families but do not segregate in mendelian fashion
- Multigenic
- Multiple environmental factors
- Phenotypic and Genetic heterogeneity
- Incomplete (variable) penetrance
- Complex interplay between genetic and environmental factors

Complex Diseases

Can aggregate in families but do not segregate in Mendelian fashion



Qualsiasi mutazione è una VARIANTE

Le varianti possono determinare o no un cambio amino acidico, avere un'effetto funzionale o meno

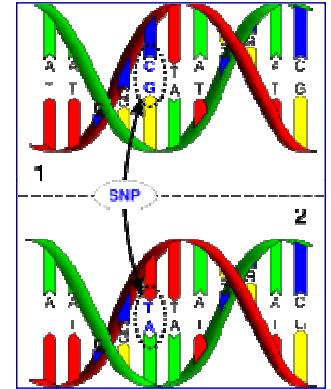
I risultati dello Human Genome Project hanno portato alla caratterizzazione dei Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)

SNP = è una variante (A, T, C o G) in una sequenza del DNA tra i membri di una stessa specie

Varianti della sequenza genomica presenti sia in sequenze codificanti che non-codificanti

Frequenza degli SNPs = 1/1000 bp

Totale SNPs genoma = 3×10^6



Una variante per essere considerata uno SNP deve essere presente almeno nell'1% della popolazione

LOCALIZZAZIONE E CLASSI DI VARIANTI PATOGENE

LOCALIZZAZIONE

- sequenze codificanti
- sequenze non-codificanti
- sequenze regolatrici
- alterazioni sequenze ripetute

CLASSI

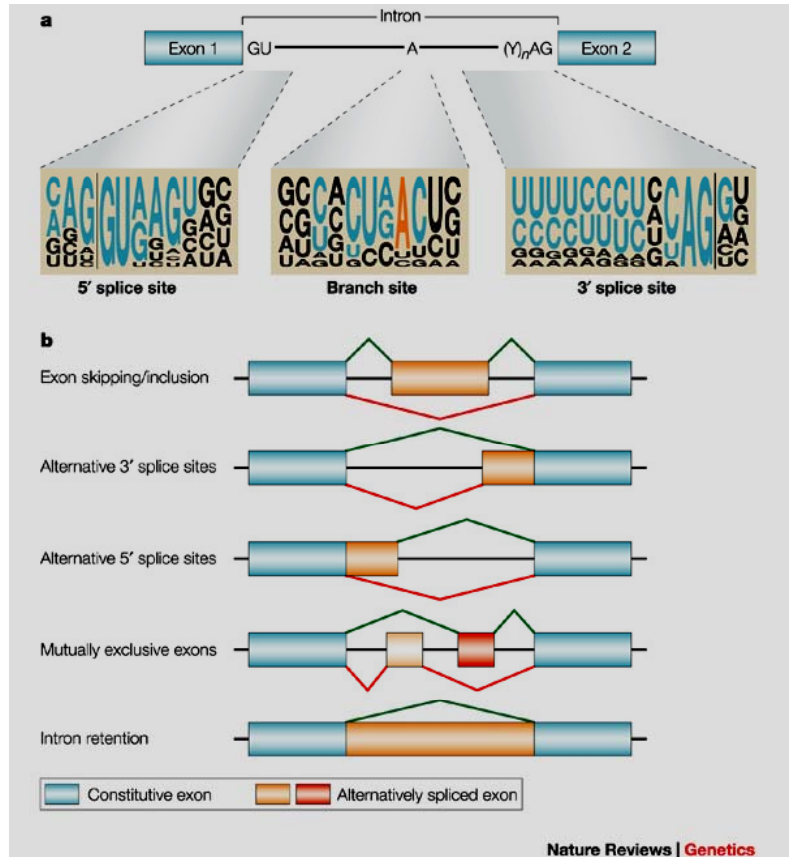
Deletions		DELETIONS	
• (truncating)			
BRCA1	normal		5'ATC TTA GAG TGT CCC.....3'
185delAG	mutant		5'ATC TTA GTG TCC C...ter 3'
• (in-frame deletion)			
MLH1	normal		5'T GAA GAA GAA G.....3'
ΔK617	mutant		5'T GAA GAA G.....3'
Insertion		INSERTIONS	
BRCA1	normal		5'AAT CCC AGG ACA GA.....3'
5382insC	mutant		5'AAT CCC CAG GAC AGA...3'
Single base p		SINGLE BASE PAIR SUBSTITUTION	
• missense	• missense		
CDKN2	normal		5'C GAT GTC TCA CG.....3'
val 118asp	mutant		5'C GAT GAC TCA G.....3'
(V118D)			
• splice dono	• splice donor site		
hMLH1	normal		5'A TCG taagt.....3'
IVS 15+ 1G→A	mutant		5'A TCG taagt.....3'

Lo splicing alternativo

Produzione di diverse isoforme dalla stessa unità di trascrizione

Motivi conservati vicini o a fianco degli introni :

GU, AG, tratto di polipirimidine precedente il 3'AG e i residui di A che servono come branchpoint



Cartegni et al., 2002

Le diverse forme di *splicing* alternativo possono modulare il fenotipo di geni diversi

Si stima che la % di geni caratterizzati da *splicing* alternativi nei mammiferi possa variare dal 22 al 74%

Una % degradata come *nonsense mediated mRNA decay (NMD)*

La > parte crea diverse isoforme proteiche funzionali

I trascritti alternativi sono meno soggetti a mutazioni deleterie e quindi rappresentano un *hotspot* per l'evoluzione della diversità proteica

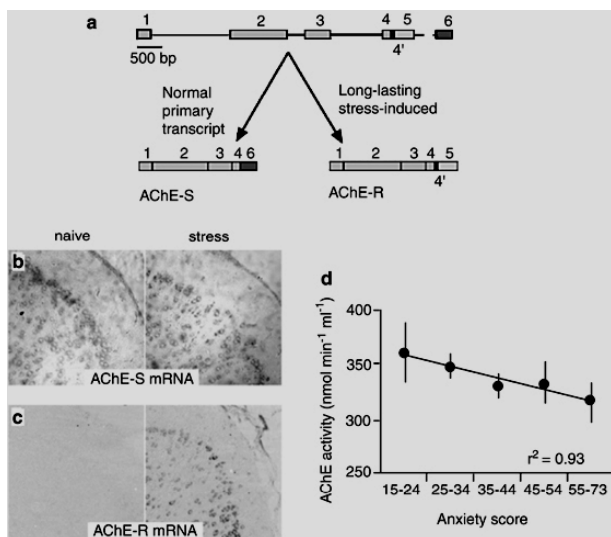
Le varianti genomiche possono influenzare la qualità e la quantità degli *splicing* alternativi

Gli *splicing* alternativi possono essere considerati alleli a bassa penetranza ?

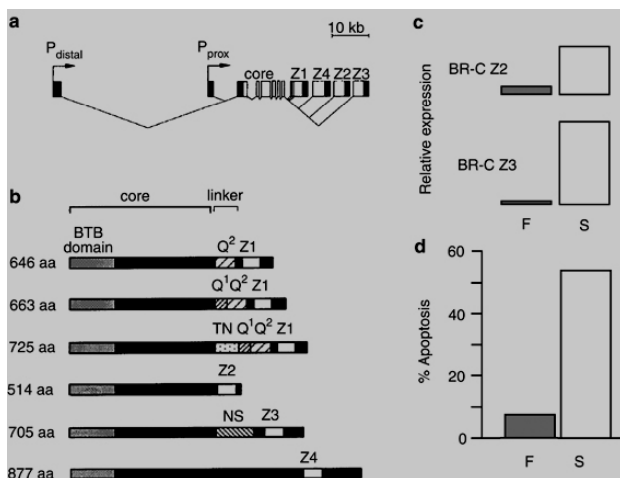
Variazioni quantitative negli splicing alternativi

effetti sul fenotipo

Risposte neurologiche allo stress associate allo splicing alternativo dell'acetilcolinesterasi (AChE)



Stato nutrizionale e controllo dello sviluppo delle uova associato allo splicing alternativo del gene *Broad complex* negli insetti



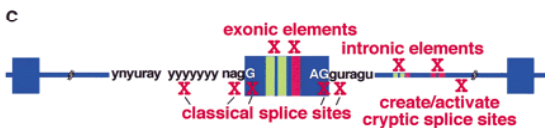
10-15% delle mutazioni che causano malattie genetiche interessano lo *splicing* del pre-mRNA



Splicing aberranti sono causati da varianti che agiscono in *cis* e in *trans*



Varianti in *cis*: siti di splicing, i punti di *branchpoint* e gli elementi ausiliari (es. ESE, ESS, etc)



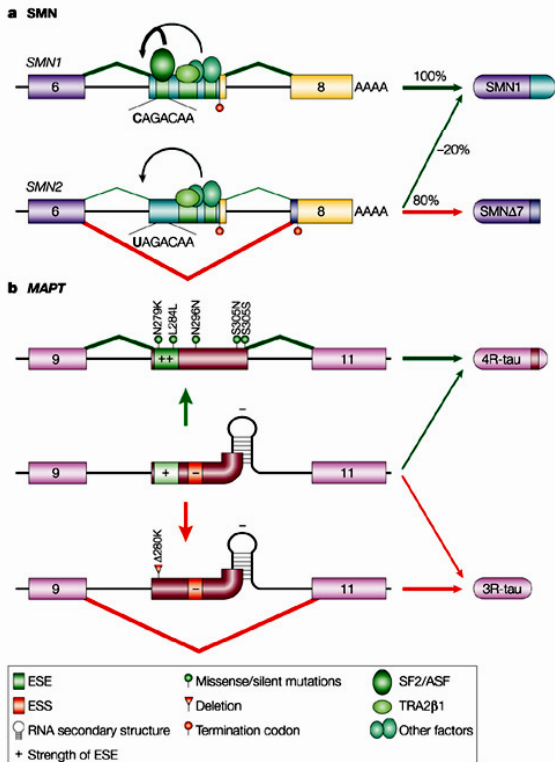
Varianti in *trans*: componenti del macchinario di splicing o proteine che regolano gli splicing alternativi

La maggior parte delle patologie presenta varianti in *cis*

Varianti nelle sequenze conservate dei siti di splicing: aboliscono completamente il riconoscimento esonico

Varianti missenso o silenti che coinvolgono i siti di legame per le proteine SR importanti per lo splicing alternativo

Alterazioni di *splicing* causate da mutazioni esoniche



a. Splicing dei geni *SMN1* ed *SMN2* coinvolti nell'atrofia muscolare spinale

In *SMN2* una transizione silente C>T in posizione +6 dell'esone 7, inattivando una sequenza ESE, determina un'inclusione inefficiente di questo esone

b. Splicing del gene *MAPT* coinvolto nella demenza e nel parkinsonismo associato al cromosoma 17

L'esone 10 contiene elementi ESE ed ESS. Varianti in queste sequenze alterano il rapporto fra 4R-tau e 3R-tau causando la malattia

Cartegni et al., 2002

Correlazione genotipo-fenotipo delle varianti di *splicing*

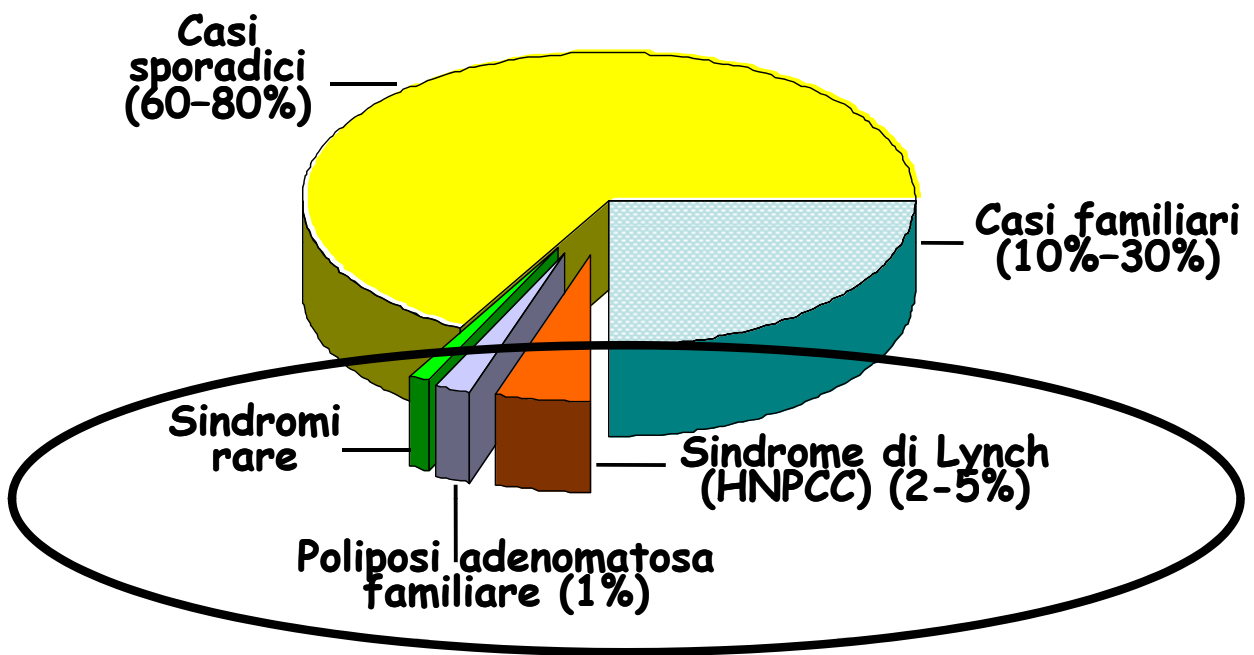
La severità della malattia può correlare con il livello di mRNA trascritto dai geni portatori di varianti di *splicing* e con il rapporto fra isoforme alternative

Disease	Gene	Mutation	Absent RNA	Level of absent RNA (%)	Phenotype tissue	Analyzed	Refs
MD	ATP7A	IVS6+1 G→A	Exon 6 ⁻	100	Severe	Fibroblasts	[7]
		IVS6+5 G→A		100	Severe		
OHS	SMN2	IVS6+6 T→A	Exon 7 ⁻	95-98	Mild	Lymphoblastoid cells	[17]
SMA		IVS6+6 T→C		61	Type I		
				47	Type II		
CF	CFTR	3849+10kb C→T	+84 bp cryptic exon	50-99	Mild-severe ^b	Lung, pancreas, ileum, colon	[9,12]
CF	CFTR	IVS8-5T	Exon 9 ⁻	63-94	Mild-severe ^b	Lung, epididymia	[10,12,13]
FD	IKBKAP	IVS20+6 T→C	Exon 20 ⁻	100	Severe	Brain	[8]
				NA	Mild-severe ^b		
Sandhoff	HEXB	P417L	Exon 11 ⁻	30-40	Mild-severe ^b	Fibroblasts	[41]
PDH	PDH E1α	A175T	Exon 6 ⁻	100	Severe	Fibroblasts	[42,43]
		G185G		50-80	Mild		
BMD	Dystrophin	R1314X	Exon 29 ⁻	10 ^a	Mild	Muscle	[44]
BMD	Dystrophin	E1211K	Exon 27 ⁻	10-20	Mild	Muscle	[15]

Le alterazioni di *splicing* possono essere costituzionali- associate a sindromi monogeniche -, ma anche somatiche -associate a malattie poligeniche come i tumori

Disease	Gene	Mutation	Splicing isoforms	Change	Analyzed tissue	Refs
FTDP-17	<i>Tau</i>	$\Delta 380K$	Exon10+/-	↓	Brain	[20-22]
		IVS10+13/14/16 L284L, N296N N279K, S305N		↑		
NF2	<i>NF2</i>	1737+3 A→T	Exon 15+/-	↓	Brain	[46]
Frasier	<i>WT1</i>	IVS9+4/5/6	KTS+/-	↓	Gonadal tissue	[47,48]
Wilms tumor	<i>WT1</i>	-	KTS+/-	↑	Tumor tissue	[49]
Wilms tumor	<i>WT1</i>	-	Exon5+/-	↓	Tumor tissue	[49]
Breast and ovarian cancers	<i>BRCA1</i>	G1694X	Exon18+/-	↓	Breast carcinoma cells	[16,50]
Breast cancer	<i>BRCA2</i>	-	Exon12+/-	↓	Breast carcinoma cells	[51]
Renal, lung and urothelial cancers	<i>CD44</i>	-	CD44v6-CD44v8+/-	↑	Tumor tissue	[52]
Gastric cancer	<i>CD44</i>	-	CD44v5, CD44v6+/-	↑	Serum	[24]
Papillary thyroid cancer	<i>CD44</i>	-	CD44v6-CD44v10+/-	↑	Papillary thyroid carcinoma	[53]
HNSCC, lung cancer	<i>FHIT</i>	-	Full length/ variable exon skipping	↓	HNSCC cells, lung cancer tissues	[54,55]
Invasive breast cancer	<i>MDM2</i>	-	Full length/ variable exon skipping	↓	Breast carcinoma	[56]
Giant cell tumors of bone	<i>MDM2</i>	-	Mdm2/mdm2-b	↓	Giant cell tumors of bone	[57]
Prostate cancer	<i>FGFR-2</i>	-	IIIb/IIIc	↑	Prostate cancer cells	[58]
Melanoma	<i>Bin1</i>	-	Exon12A+/-	↑	Melanoma cells	[59]
Prostate cancer, lymphoma, gastric carcinoma	<i>Bcl-2</i>	-	Bcl-2 α/β	↑	Prostate cancer cells, follicular lymphomas, gastric carcinoma	[33]
Lymphoma, breast cancer	<i>Bcl-x</i>	-	Bcl-xL/S	↑	Lymphoma cells, breast carcinoma	[23]
Oral and oropharyngeal cancers	<i>Bax</i>	-	Bax- α/w	↓	Oral and oropharyngeal carcinomas	[23]

Il carcinoma del colon-retto



Poliposi Adenomatosa Familiare

- è una condizione autosomica dominante in *linkage* con le mutazioni sul gene oncosoppressore *APC*

• è caratterizzata dalla comparsa di centinaia-migliaia di polipi adenomatosi che conferiscono un elevato rischio di cancro in giovane età (ca. 40 aa)

- considerevole varietà fenotipica
- gli affetti possono sviluppare anche:
lesioni retiniche, tumori desmoidi , osteomi mandibolari



Oltre alla "poliposi classica" esiste:

Poliposi Adenomatosa Familiare Attenuata (AFAP)

- i pazienti mostrano < 100 adenomi, l'insorgenza dei polipi e del cancro è tardiva e l'espressione delle manifestazioni extracoliche è limitata

Poliposi
Adenomatosa
Familiare
FAP

APC è un gene oncosoppressore

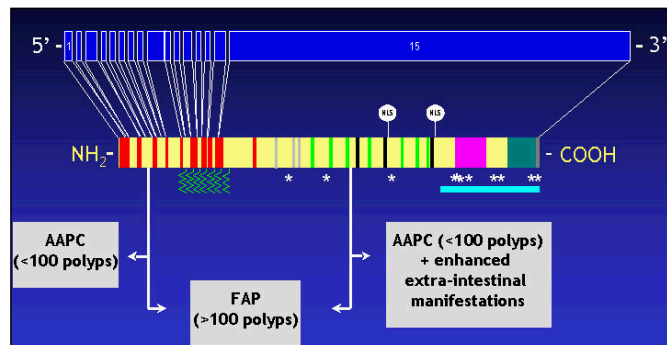
- identificato con l'analisi di *linkage* e positional cloning su 5q21
- 100 Kb, 15 esoni, 2843 aa

APC è un gene ad alta penetranza

La maggior parte (95%) delle alterazioni identificate sino ad ora determinano la formazione di una proteina tronca

Le mutazioni vengono identificate

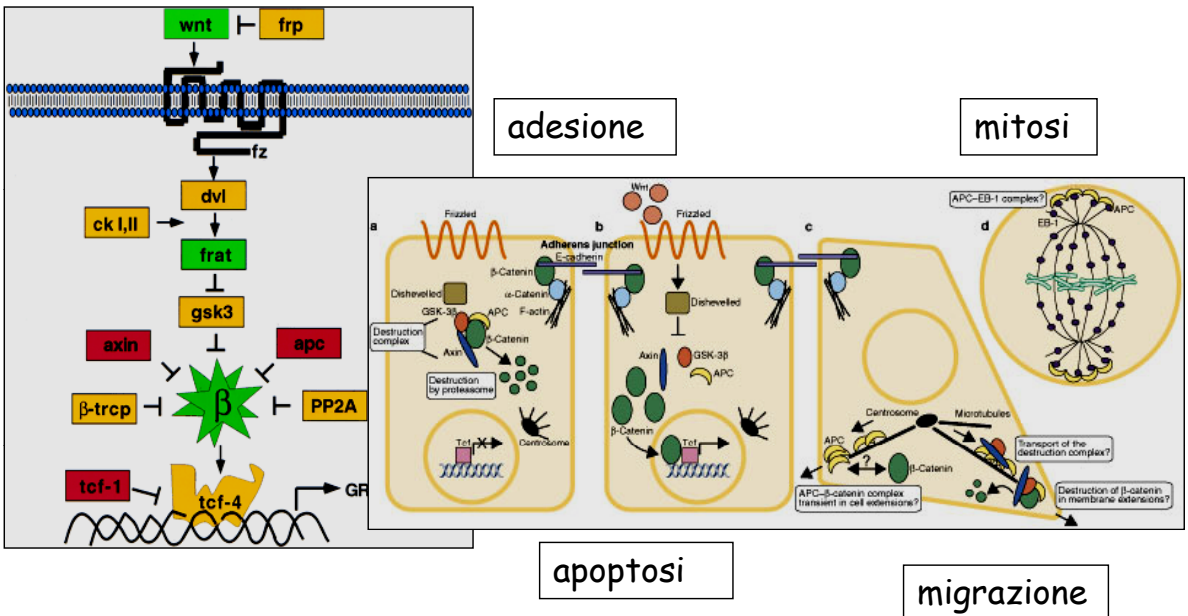
- nel 70% dei pazienti con poliposi classica
- nel 10% dei pazienti AFAP
- esiste una certa correlazione genotipo-fenotipo



Poliposi
Adenomatosa
Familiare
FAP

APC è una proteina multifunzionale che prende parte a diversi processi cellulari

Il ruolo principale è regolare i livelli citoplasmatici di β -catenina nel *pathway* Wnt



Poliposi
Adenomatosa
Familiare
FAP

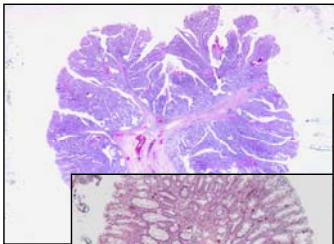
La correlazione genotipo-fenotipo

I pazienti affetti da FAP mostrano una consistente variabilità fenotipica

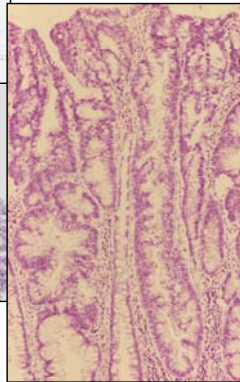
- variabilità nel numero dei polipi
- presenza di carcinomi
- presenza di manifestazioni extracoliche
- variabilità nell'istotipo dei polipi

Geni modificatori ?

Geni "alternativi " ad *APC*
in *linkage* con la sindrome ?

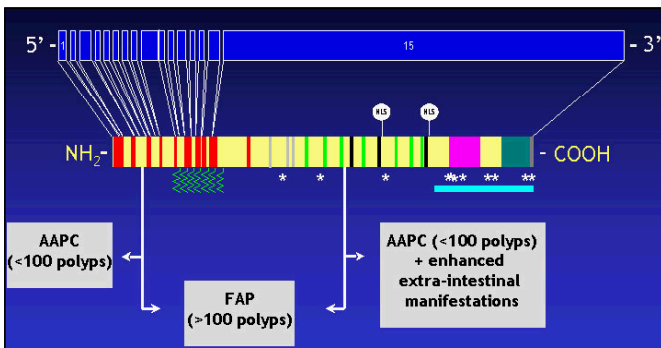


polipi iperplastici



adenomi serrati

APC e gli splicing alternativi



Horii et al., 1993

Almeno 5 forme di sequenze non codificanti generate da *splicing* alternativi

Meccanismi di splicing regolati in modo tessuto specifico; uno dei trascritti specifico nel cervello

Oshima et al., 1993

Splicing alternativi costituzionali dell'esone 7, 9 e 14

Samowitz et al., 1995

Identificate in pazienti 2 forme di splicing alternativi mancanti degli esoni 2 e 4 correlate con la forma attenuata della sindrome

Bala et al., 1997

Alterazioni nei rapporti della isoforma contenente l'esone 14 e non in una famiglia affetta da poliposi

Young et al., 1998

Una famiglia con la forma attenuata presentava una mutazione nella regione soggetta a splicing alternativo dell'esone 9

Valutare se in pazienti AFAP, negativi per mutazioni troncanti di APC, alterati livelli del trascritto potessero associarsi o modulare il fenotipo patologico

26 pazienti AFAP

Privi di mutazioni troncanti
sul gene APC

Vs.

20 soggetti non affetti

senza storia familiare per
poliposi o carcinoma del colon

9 pazienti < 15 adenomi

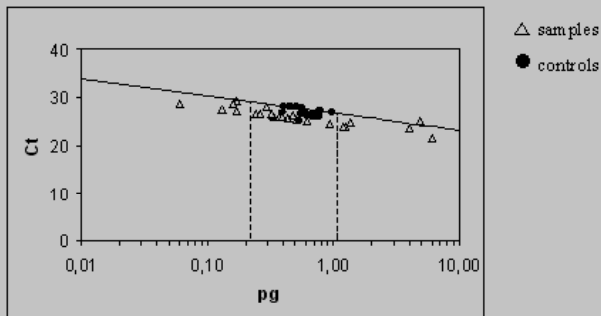
11 pazienti 15-70 adenomi

6 pazienti 70-100 adenomi

Sia sui pazienti AFAP che sui soggetti non affetti abbiamo misurato la
quantità di trascritto del gene APC

Tecnica utilizzata *Real Time RT-PCR* di tipo quantitativo (metodo Taq-Man)

Livelli di mRNA di APC nei pazienti AFAP rispetto alla distribuzione nella popolazione di controllo



Paziente	Quantità mRNA pg
8	0,06±0
9	0,13±0,01
11	0,17±0,02
13	1,24 ±0,21
15	1,20±0,4
17	0,17±0,03
18	4,86±1,67
20	1,35±0,26
22	4,01±0,7
23	0,16±0,03
24	6,04±0,78

**11 pazienti AFAP (42%)
presentano una quantità di mRNA
< 0.22 pg o > 1.11 pg**

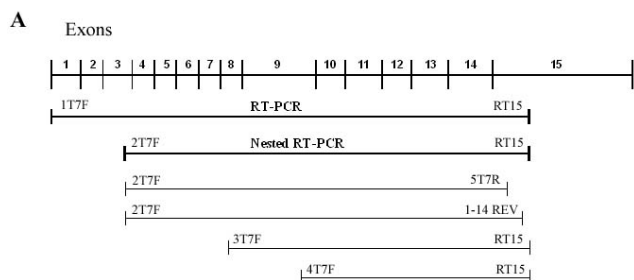
Alterati livelli di trascritto possono essere dovuti a riarrangiamenti costitutivi del gene *APC* (delezioni o duplicazioni)



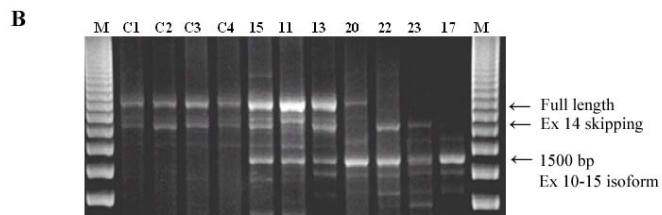
Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Paziente	Quantità mRNA	Alterazione
9	0,13 pg	delezione intero gene <i>APC</i>
24	6,04 pg	duplicazione ex. 1

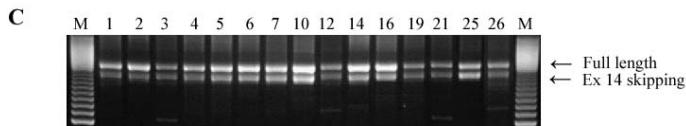
Analisi dei trascritti alternativi di *APC* tramite *nested* RT-PCR



Set di *nested* primers utilizzati



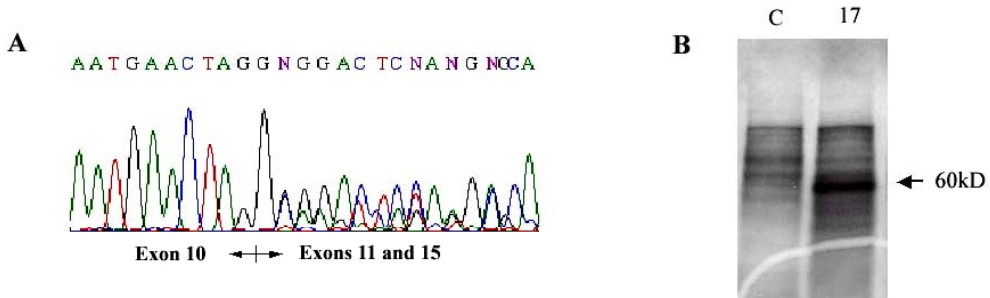
In 4 pazienti (20, 22, 23, 17) l'elevata espressione di questo trascritto si associava ad una diminuzione del prodotto *full-length*



Popolazione di controllo non-afetta

A. Il sequenziamento diretto della nested RT-PCR ha evidenziato uno splicing alternativo tra gli esoni 10 e 15 già descritto in linee cellulari (Sulekova et al. 1995).

Tale splicing causa la perdita del *reading frame* con l'introduzione di un codone di stop all'inizio dell'esone 15



B. Lo splicing alternativo 10-15 dà un prodotto proteico stabile ?

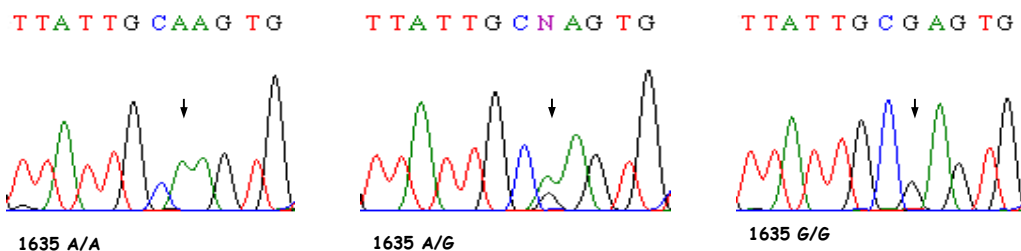
Il Protein Truncation Test sul frammento di nested RT-PCR compreso tra gli esoni 1 e 15 ha dimostrato la presenza di una proteina tronca

Disegnando un primer specifico tra gli esoni 10 e 15 abbiamo evidenziato in sequenza lo stesso splicing anche nella popolazione di controllo

Sequenziamento su DNA genomico di tutti gli esoni compresi tra 1 e 14 e la regione regolatrice del promotore

Nessuna mutazione nei siti accettore/donatore di splicing

Identificata una variante silente su una sequenza ESE dell'esone 13: 1635 A>G

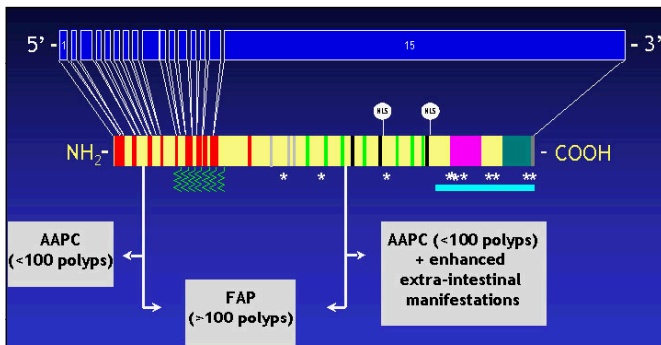


La transizione A>G del nucleotide 1635 sull'esone 13 distrugge un motivo ESE e abbassa l'affinità di questa regione per la proteina SRp40 coinvolta nello splicing

SR	Variante	Proteina	Soglia di significatività	Significatività del wild-Type	Significatività della variante
	1635 A→G	SRp40	2,67	2,83	0,28

Tre pazienti AFAP che mostravano lo splicing 10-15, risultavano eterozigoti A/G e uno (17) risultava omozigote G/G per la variante

Gli splicing alternativi di APC e la poliposi



Aretz et al., 2004

Identificate sostituzioni nelle posizioni ESE dell'esone 4 e dell'esone 14 che causano exon-skipping in pazienti negativi per mutazioni

Il *pattern di splicing* è stato confrontato con controlli normali ed è stata studiata la co-segregazione nelle famiglie.

Goncalves et al., 2008

Il fattore di splicing SRp20 è un target del pathway di attivazione di *Wnt*.

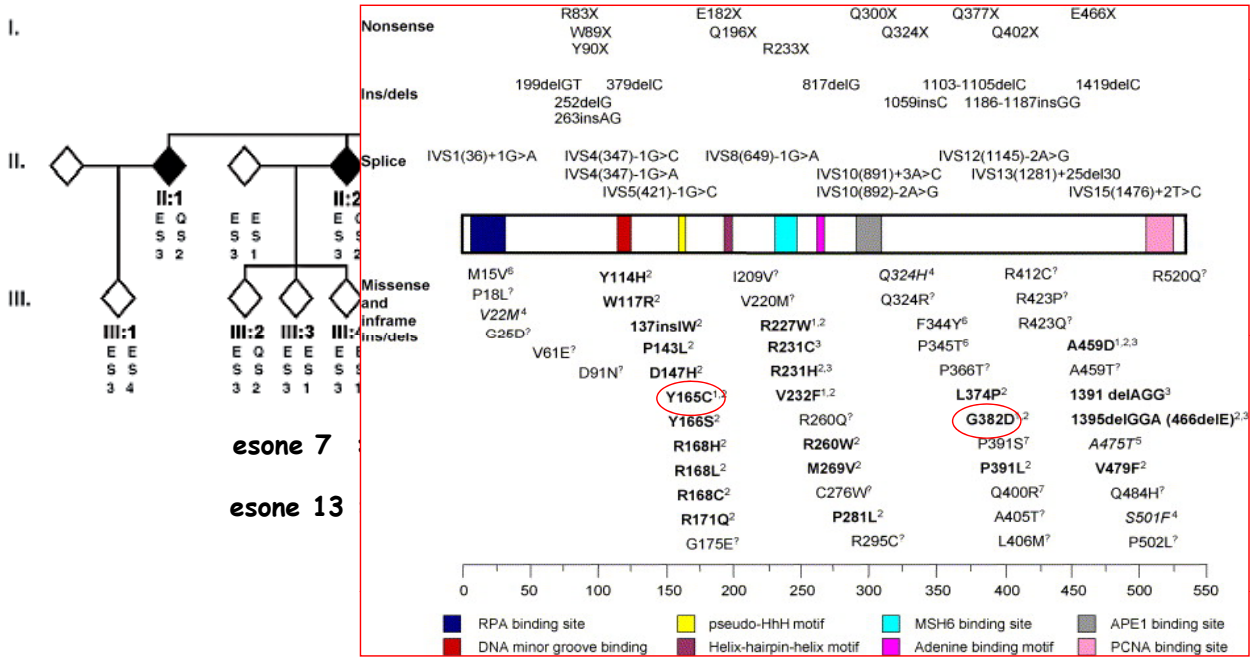
Dimostrato con un mini-gene che il pathway attivato promuove la trascrizione di splicing alternativi

Goncalves et al., 2009

La mutazione missenso c.1918 C>G determina la formazione di un codone di stop sull'esone 14 con conseguente exon skipping. In *silico* questa mutazione causa un cambiamento nel sito di legame con SRp55, hnRNP o ASF/SF2. L'utilizzo di RNA interference ha dimostrato che solo ASF/SF2 è necessario per l'inclusione dell'esone 14.

Background

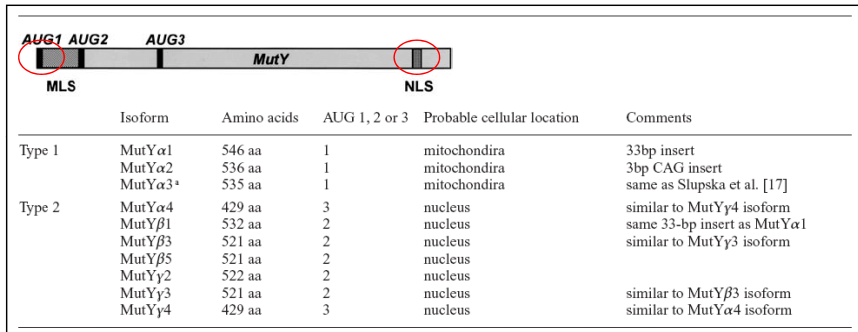
Al-Tassan et al., 2002 *Cheadle and Sampson, 2007*



Non è stata identificata una correlazione genotipo-fenotipo

Background

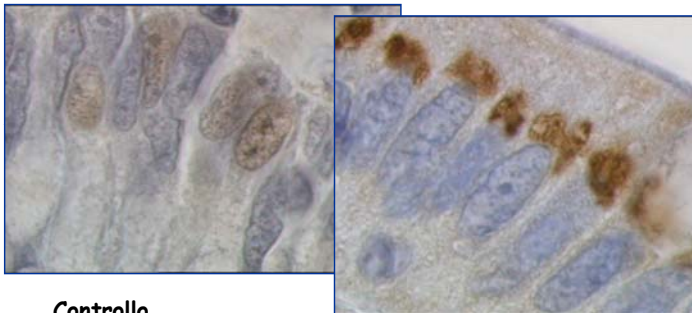
Parker and Eshleman, 2003



MUTYH origina 10 trascritti alternativi

MUTYH è espresso sia nel nucleo che nei mitocondri.

I pazienti MAP con mutazioni costituzionali bialleliche di **MUTYH** mostrano nelle cellule della mucosa colica e degli adenomi un'espressione della proteina citoplasmatica compartmentalizzata, ma non nucleare



Controllo

Paziente MAP

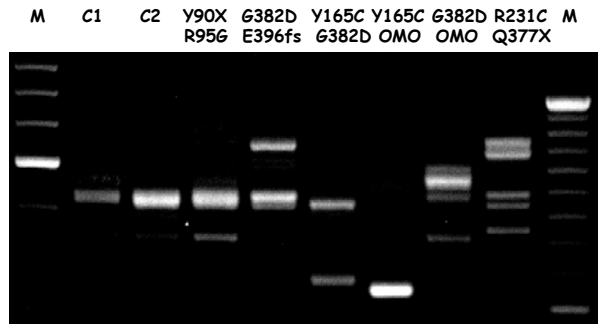
Correlazione fra la compartmentalizzazione e i tipi di mutazione costituzionale ?

Scopo:

le diverse mutazioni costituzionali del gene *MUTYH* modulano i livelli di trascrizione e di espressione della proteina ?

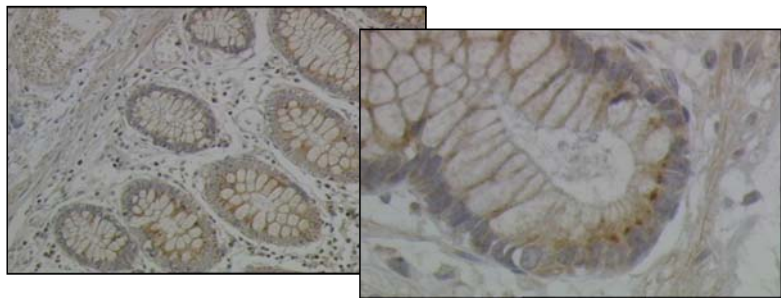
Dati preliminari:

a. Mutazioni bialleliche costituzionali diverse cambiano il pattern delle isoforme di mRNA



b. L' espressione positiva della proteina in IIC può essere eterogenea

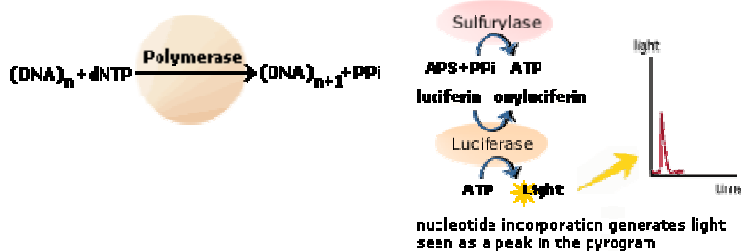
Differenze nella distribuzione e dimensione dei granuli citoplasmatici



Disegno sperimentale :

Valutazione dei livelli di trascritto delle diverse mutazioni germinali di *MUTYH*

Analisi con *pyrosequencing* di cDNA e DNA da campioni di sangue periferico di affetti con diverso *genotipo* di *MUTYH*



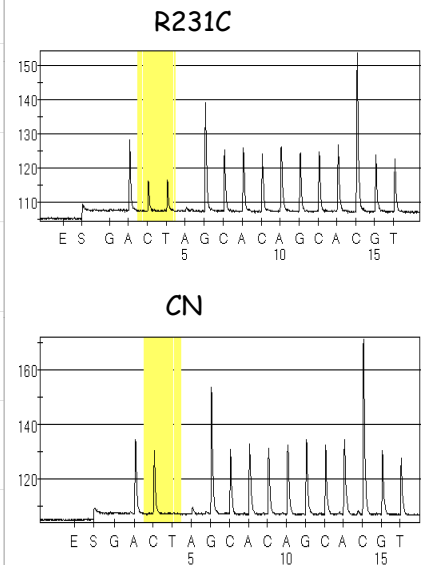
Sequenziamento quantitativo

Analisi dell'espressione proteica negli adenomi e nella mucosa normale di portatori di diverse mutazioni germinali di *MUTYH*

Analisi con **IIC** utilizzando un Policlonale diretto contro la regione compresa fra gli aa 531 e 546

Livelli di trascritto con *pyrosequencing*: eterozigoti composti affetti

Paziente	Mutazione	Esone	cDNA	DNA genomico
CM	Y165C G382D	7 13	165 → 52% 382 → 48%	165 → 50,1% 382 → 49,9%
CMC	G382D E396fs	13	382 → 43,7% 396 → 56,3%	382 → 51% 396 → 49%
GA	Y165C E355X	7 12	165 → 54% 355 → 46%	165 → 52% 355 → 48%
LBG	Y90X W160X	3 7	90 → 52% 160 → 47%	90 → 50,6% 160 → 49,4%
NL	R231C Q377X	9 12	231 → 51,5% 377 → 48,5%	231 → 52,5% 377 → 47,5%
MD	Y90X R95G	3	90 → 50% 160 → 50%	90 → 50% 160 → 50%

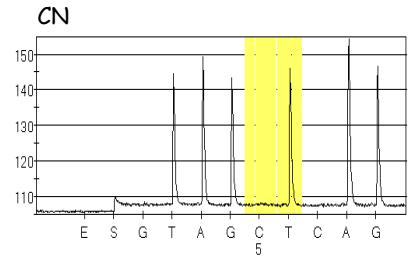
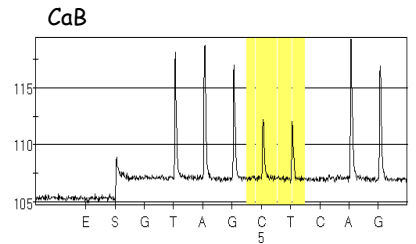


- Variabilità intrallelica maggiore nel cDNA rispetto al DNA (0-12 vs 0-5)
- La stessa mutazione mostra un'efficienza di trascrizione simile nelle diverse coppie di eterozigoti composti

Livelli di trascritto con *pyrosequencing*: *eterozigoti non affetti*

Paziente	Mutazione	Esone	cDNA	DNA genomico
CaB	Y165C	7	165 → 50% norm → 50%	165 → 50% norm → 50%
FaP	Y165C	7	165 → 50,5% norm → 49,5%	165 → 50% norm → 50%
MP	Y165C	7	165 → 49,5% norm → 50,5%	165 → 50,1% norm → 49,9%

- La variabilità intrallelica dei cDNA diminuisce ed è comparabile con il DNA



Livelli di trascritto in *eterozigoti affetti*

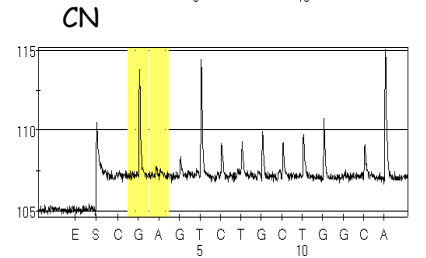
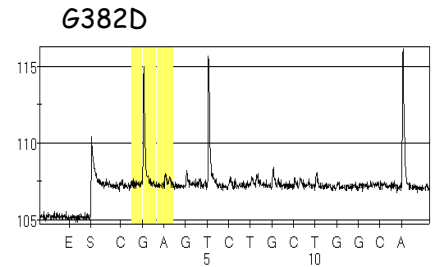
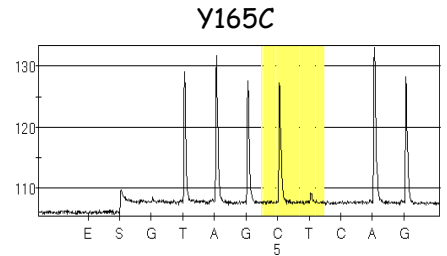
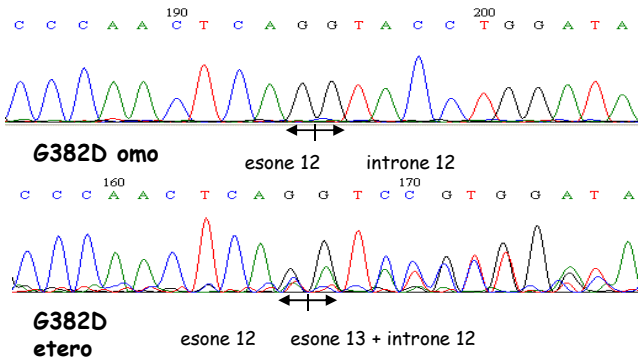
Paziente	Mutazione	Esone	cDNA	DNA genomico
MA	IVS2+30A>G G382D	Intr2 13		? → 54,3% 382 → 45,7%
GB	Y165C	7	165 → 53,5% ? → 46,5%	165 → 49 % ? → 51%

Seconda
alterazione ?

Livelli di trascritto con *pyrosequencing*: omozigoti affetti

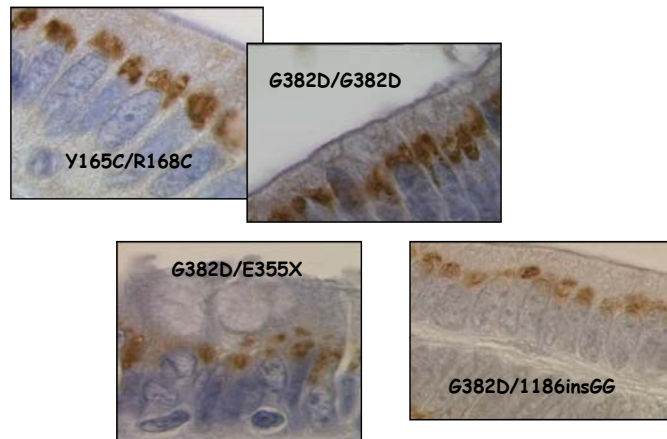
Paziente	Mutazione	Esone	cDNA	DNA genomico
FM	Y165C (omo)	7	165 → 92%	165 → 95%
CR	Y165C (omo)	7	165 → 94%	
LI	G382D (omo)	13	382 → 0%	382 → 100%
SA	G382D (omo)	13	382 → 0%	382 → 100%

- La mutazione G382D mostra livelli molto bassi di trascritto rispetto ai controlli e al DNA



Espressione proteica negli adenomi e nella mucosa normale di pazienti MAP con diverse mutazioni germinali di *MUTYH*

Paziente	Mutazioni	Esoni	Area granuli (µm ²)
FMG	Y165C (omo)	7	15
FM	Y165C (omo)	7	16
LI	G382D (omo)	13	19
CM	Y165C G382D	7 13	18
CG	G382D E396fs	13	14
CMC	G382D E396fs	3 12	17
GA	Y165C E355X	7 12	11
CM	V67fs A368fs	3 12	10
AL	Q127fs Q324X	5 12	7
BR	R231C Q324X	3 12	6



• Mutazioni diverse si associano ad aree dei granuli differente:

• G382D (17) > Y165C (15) > altre (7,5)

Disponibili sul web risorse per facilitare l'identificazione di sostituzioni nucleotidiche che possono alterare lo splicing (analisi *in silico*)

ESE finder, RescueESE and PESX

Le predizioni *in silico* non correlano sempre con i difetti di splicing *in vivo*

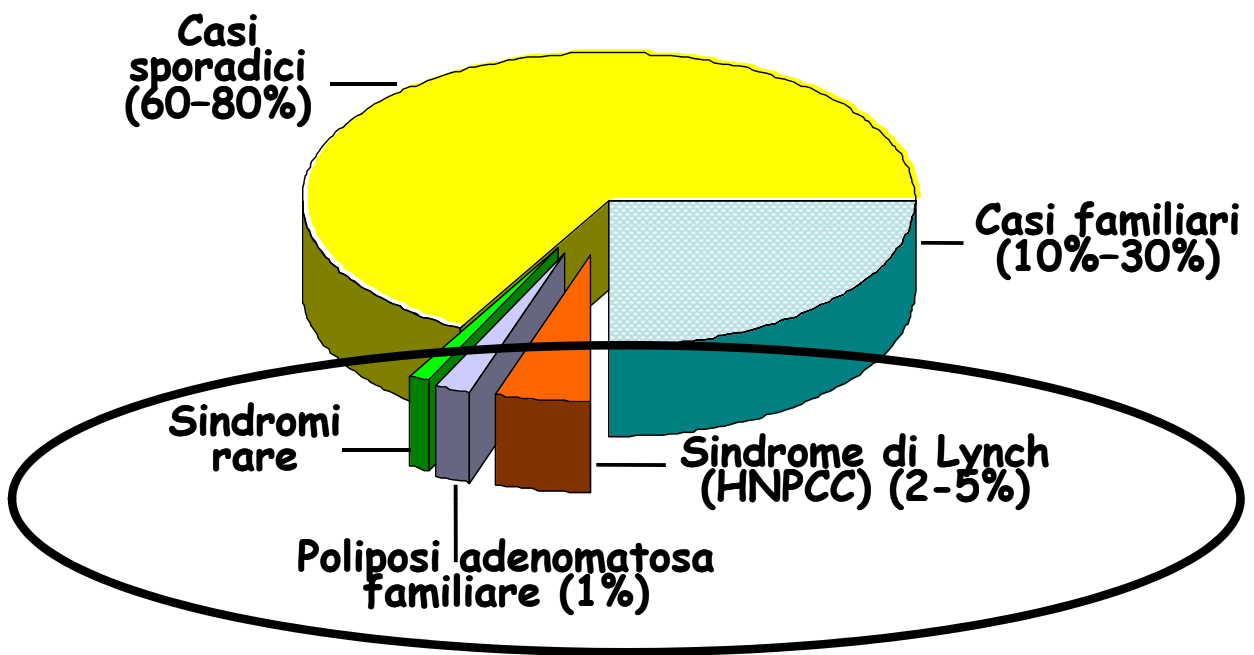
Lastella et al., 2006

Verificare se le predizioni fatte *in silico* correlano con gli esperimenti *in vitro*

Analizzate 99 mutazioni *missenso* nei geni *MLH1* ed *MSH2* per la predisposizione del tumore del colon non associato a poliposi (*HNPCC*), riportate nei database, con 6 differenti algoritmi

Effettuate analisi *in vitro* su 20 di queste mutazioni

Il carcinoma del colon-retto



Cancro del colon-retto non
associato a poliposi
HNPCC

E' la forma più comune di CCR ereditario
Più generazioni colpite, sviluppo di CCR in
età giovanile prevalentemente localizzati
nel colon destro

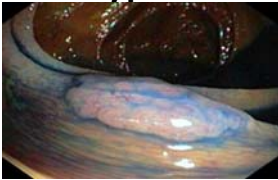
CCR sincroni e metacroni

Tumori extra-colici (c. endometrio,
stomaco, apparato urinario e
biliopancreatico)

Polypoid



Non Polypoid

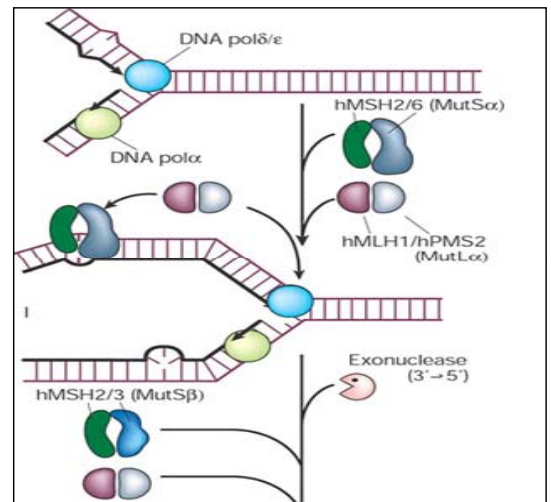


Cancro del colon-retto non
associato a poliposi
HNPCC

La predisposizione ereditaria è trasmessa
in modo autosomico dominante

È causata da una mutazione costitutiva in
un gene del "DNA mismatch repair" (MMR)

gene MMR	crom.	fr.mut.
<i>MSH2</i>	2p21	38%
<i>MLH1</i>	3p21-23	49%
<i>PMS1</i>	2q31-33	0.3%
<i>PMS2</i>	7p22	2%
<i>MSH6</i>	2p21	9%
<i>MLH3</i>	14q24.3	2%



Cancro del colon-retto non associato a poliposi
HNPCC

Geni "caretakers"

- I geni del MMR coinvolti nell'HNPCC sono stati identificati con l'analisi di *linkage* negli anni '90
- Mutazioni trovate nel 40-80% delle "famiglie Amsterdam I"

MSH2 ed *MLH1* presentano in alcuni casi mutazioni "missenso" di significato patogenetico

Dimostrata recentemente l'inattivazione costituzionale di *MLH1* per metilazione

Correlazione genotipo-fenotipo

Non è evidente; un fenotipo più lieve si associa con le mutazioni di *MSH6*

gene MMR	crom.	fr.mut.
<i>MSH2</i>	2p21	38%
<i>MLH1</i>	3p21-23	49%
<i>PMS1</i>	2q31-33	0.3%
<i>PMS2</i>	7p22	2%
<i>MSH6</i>	2p21	9%
<i>MLH3</i>	14q24.3	2%

Il database InSIGHT (marzo del 2003) riportava 382 diverse mutazioni per
MLH1 ed *MSH2*

La maggior parte alterazioni *nonsense* o *frameshift* con effetto patogenetico

Molte delle mutazioni *missense* di questi due geni (ca. 25% del totale) sono localizzate nelle sequenze ESE (Gorlov et al., 2003)

Lastella et al., 2006

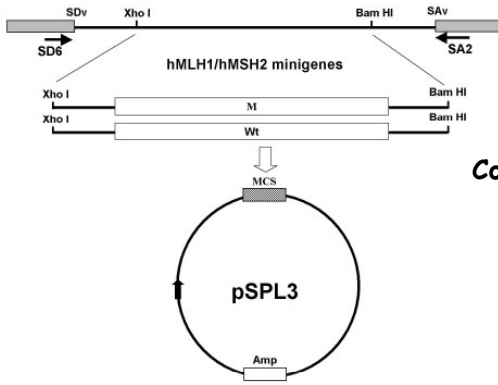
Analizzate 99 mutazioni di *MLH1* e *MSH2* con *ESE finder*, *RescueESE* and *PESX*

- 7 mutazioni erano in siti ESE per tutti e tre gli algoritmi,
- solo 2 causavano lo stesso tipo di potenziale sostituzione
- solo in 1 caso prevedevano l'alterazione di una ESE senza la formazione di una nuova ESE

Selezionate 20 mutazioni con diversi effetti predetti sulle ESE utilizzando un saggio *in vitro*

Critério di selezione: abrogare/creare un sito ESE con almeno uno dei programmi

Rappresentazione del costrutto reporter utilizzato negli *splicing assays*

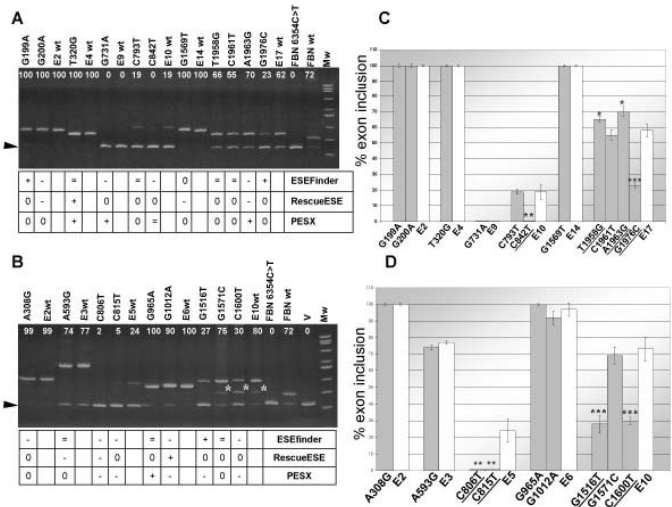


Trasfezioni nelle cellule *Cos-7*

Controllo positivo con mutazione C6354T nell'esone 51 del gene *FBN1*

8 mutazioni si associavano ad una alterazione dello splicing e 6 causavano una diminuzione di almeno il 50% nel *rate* di inclusione dell'esone rispetto al controllo

4 casi correlavano con ESEfinder, 6 con PESX e 3 con RescueESE

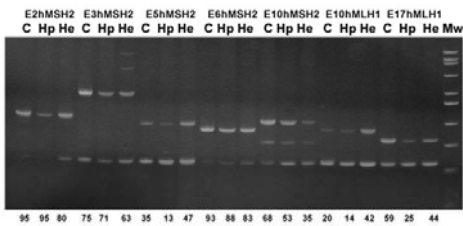


Le 99 mutazioni sono state analizzate anche con altri programmi disponibili :

NNSPLICE, SpliceSite finder e GENSCAN

6 causavano un cambiamento consistente con *GENSCAN*, ma con risultati contrastanti quando testate con lo *splicing assay*.

A

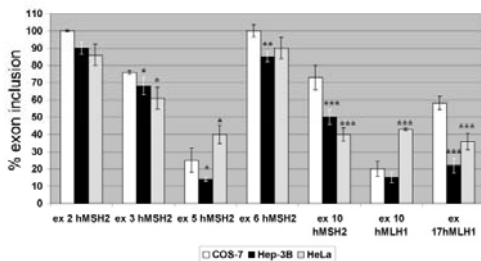


Gli stessi costrutti sono stati analizzati in altre 2 linee cellulari:

HeLa e Hep3B

- Inclusione dell'esone 10 di *MSH2* diminuito del 30-45%
- Inclusione dell'esone 5 di *MSH2* e del 10 di *MLH1* incrementato di 60-115%

B



- Le mutazioni situate negli esoni soggetti a splicing alternativi mostravano variabilità nei livelli d'inclusione nelle diverse linee cellulari

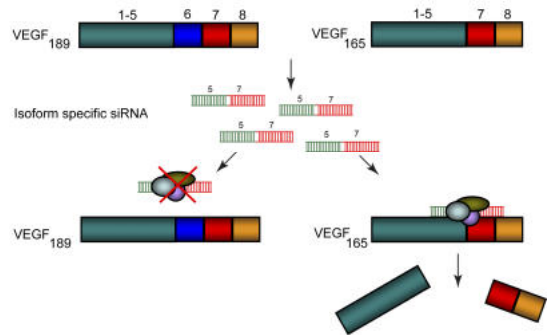
RNA interference : un potenziale terapeutico per le isoforme associate alle malattie

- Importante disegnare siRNA selettivi per un mRNA associata alla malattia e non con il prodotto wt o l'isoforma funzionale
- Difficile disegnare un *exon-exon junction* siRNA

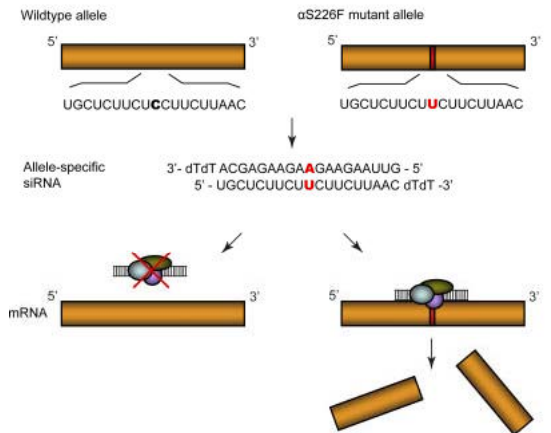
2 tipi di approcci :

- *Knockdown* mediata da RNAi di malattie associate alle isoforme di splicing
- *Knockdown* mediata da RNAi di malattie associate a varianti di splicing allele specifiche

A Isoform-specific RNAi



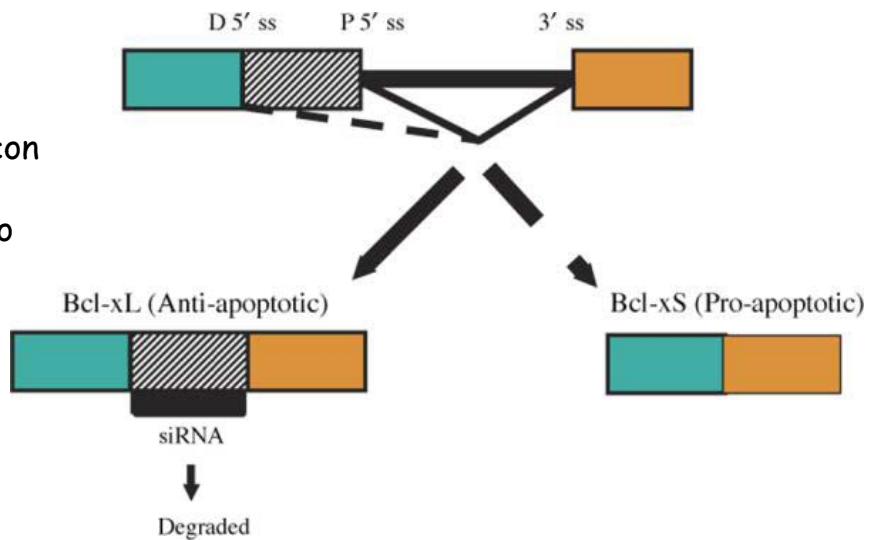
B Allele-specific RNAi



**Downregulation di una isoforma di splicing:
il caso di *Bcl-xL***

Bcl-X, membro della famiglia *Bcl-2*, regola l'apoptosi
2 isoforme: *Bcl-xL*, anti apoptotico e *Bcl-xS*, apoptotico

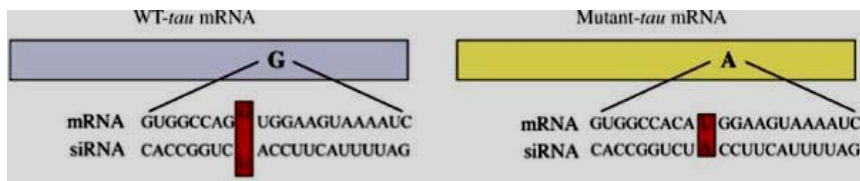
Il *knockdown* di *Bcl-xL* con
RNAi può essere una
terapia contro il cancro



***Downregulation* di varianti di splicing
il caso dell'isoforme del gene *tau***

Alcune mutazioni di *tau* promuovono *splicing* aberranti, altre conducono all'espressione di proteine aberranti

La mutazione V337M, localizzata nell'esone 12 è stata associata alla demenza fronto temporale



Identificato un siRNA in grado di silenziare l'allele mutato senza alterare l'espressione del gene normale



Percorso in salita , ma molto promettente !!!!

- Dr. Tiziana Venesio
- IRCC - Lab. Patologia Molecolare
- tiziana.venesio@ircc.it
- Tel 011 993 3456
- ...is waiting for your visit !