

Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in
Fisiopatologia della morte cellulare XVI ciclo

TESI

Svolta presso l'Istituto di Scienze Neurologiche
C.N.R. Mangone (CS)

LA NEUROFIBROMATOSI DI TIPO I: UNO STUDIO DI CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO CONDOTTO SU PAZIENTI DEL SUD ITALIA AFFETTI DA NF₁

COORDINATORE

Ch.mo Prof. Roberto Testi

CANDIDATA

D.ssa Giuseppina Peluso

RELATORE

Ch.mo Prof. Roberto Testi

CORRELATORE

Ch.mo Prof. Aldo Quattrone

1	INTRODUZIONE	3
1.1	DEFINIZIONE	3
1.2	GENERALITA'	3
1.3	CLINICA	5
1.4	PATOGENESI	10
1.5	GENE NF ₁	15
1.6	PROTEINA	17
2	OBIETTIVI DELLA TESI	22
3	MATERIALI E METODI	23
3.1	PAZIENTI	23
3.2	METODOLOGIE SPERIMENTALI	24
3.2.1	CAMPIONI	24
3.2.2	PROCEDURA STANDARD DI ESTRAZIONE FENOLO/CLOROFORMIO	24
3.2.3	DOSAGGIO DEL DNA	26
3.3	PCR DEGLI ESONI DEL GENE NF ₁	26
3.4	ANALISI IN DHPLC	29
3.5	ANALISI DI SEQUENZA	33
4	RISULTATI	34
4.1	SCREENING DI MUTAZIONI IN DHPLC	34
4.2	SPETTRO MUTAZIONALE	36
5	DISCUSSIONE	42
6	BIBLIOGRAFIA	48

1 - INTRODUZIONE

1.1 Definizione

La Neurofibromatosi di tipo I (NF₁), anche conosciuta come malattia di von Recklinghausen, è una delle più comuni condizioni genetiche che colpisce da 1/3000 a 1/4000 individui nella popolazione generale.

Si trasmette in modo autosomico dominante con esordio in età pediatrica ed espressività completa entro i 5 anni di età. (Cnossen M.H. et al. 1998)

Non sono noti gruppi etnici in cui la NF₁ abbia una maggiore o minore prevalenza; inoltre non è una condizione progressiva, e la maggior parte delle manifestazioni sono età-dipendenti con un picco intorno all'età di 4 – 9 anni.

1.2 Generalità

E' una condizione estremamente variabile sia da un punto di vista clinico per l'espressione delle diverse manifestazioni che caratterizzano il disordine spesso anche in membri affetti di una stessa famiglia, (J. Szudek

et al. 2002) sia da un punto di vista genetico per la larga varietà di mutazioni che è stata individuata in pazienti NF₁.

La frequenza di mutazioni NF₁ finora trovata è tra le più alte osservate negli uomini con un range stimato da 1/7800 ad 1/23000 gameti. Non a caso il locus NF₁ è stato definito un “hot spot” mutazionale nel genoma umano. (Rasmussen S.A. et al. 2001)

La penetranza è virtualmente del 100% negli adulti, per cui individui con una mutazione del gene NF₁ hanno manifestazioni cliniche della patologia di solito intorno all'età di 6 anni.

Le mutazioni germinali si distribuiscono lungo tutto il gene; circa il 50% dei casi NF₁ proviene da una storia familiare, ma la frequenza di mutazioni “de novo” nei casi sporadici, è particolarmente alta.

Sono stati inoltre documentati mosaicismi somatici e germinali con caratteristiche NF₁ confinate a particolari aree del corpo. Tuttavia, la larga variabilità del fenotipo NF₁ in individui che portano la stessa mutazione del gene NF₁, ci suggerisce che altri fattori possono essere coinvolti nella determinazione delle manifestazioni cliniche; tali fattori potrebbero essere di natura genetica (geni modificanti tratti specifici) o epigenetica (fattori ambientali). (Upadhyaya M. et al. 1998)

Poiché molti pazienti posseggono delezioni della linea germinale o più precisamente mutazioni che portano a “perdita di funzione”, il gene NF₁ è stato classificato come “tumor-soppressore”: pazienti con NF₁ sono predisposti a sviluppare una varietà di tumori benigni e maligni molti dei quali riguardano il sistema nervoso centrale e la malignità è considerata la più comune causa di morte in questo disordine con una aspettativa di vita media ridotta dai 10 ai 15 anni.

1.3 Clinica

Nonostante le avanzate scoperte in genetica molecolare sulla Neurofibromatosi tipo I, la sua diagnosi rimane clinica, basata su criteri diagnostici stabiliti da una Consensus Conference NIH- 1988.

La variabilità clinica è molto elevata per cui un medico ben informato sulla malattia, può formulare la diagnosi nella maggior parte dei casi solo dopo un attento esame obiettivo.

Le manifestazioni più comuni e caratteristiche del disordine sono la presenza di:

- **Macchie caffè-latte;** è forse la caratteristica più frequente che ricorre in circa il 90 % dei pazienti affetti, e la più usata dai medici per potere formulare una diagnosi di NF₁. Le macchie

caffè-latte si presentano come chiazze scure sulla pelle disseminate lungo tutto il corpo e simili a “voglie”, con un range di larghezza da 5 mm a parecchi cm. In genere sono innocue, compaiono alla nascita ed aumentano di dimensioni e numero con l’età.

- **Neurofibromi dermali;** rappresentano la caratteristica più complessa della patologia da cui NF1 prende il nome. Sono tumori benigni, simili a protuberanze che crescono come discrete lesioni nel derma o nell’epidermide in un range compreso tra 0,1 cm e parecchi cm di diametro. Si distribuiscono attorno alla guaina dei nervi periferici (supporto strutturale e metabolico per i nervi stessi) per cui a volte possono essere molto dolorosi. Compaiono a qualsiasi età ma soprattutto in tarda infanzia o all’inizio dell’adolescenza con un numero variabile da 1 a un migliaio e, a seconda della loro localizzazione, arrivano ad essere sfiguranti. Una delle caratteristiche inusuali dei fibromi è la “eterogeneità cellulare” caratterizzata dalla presenza di tipi cellulari multipli che includono circa 60% di cellule di Schwann, neuroni, cellule perineurali, fibroblasti e mast-cellule.

- **Neurofibromi plessiformi;** a differenza di quelli dermali sono tipicamente piccoli e possono svilupparsi internamente lungo il plesso dei maggiori nervi periferici diventando abbastanza larghi al punto da coinvolgere un intero arto o regione del corpo (M. Upadhyaya and Cooper, 1998). In genere sono benigni ma possono essere debilitanti e progredire in maligni. La consistenza di queste lesioni è generalmente simile a quelle dermali, ma varia il tempo del loro sviluppo così come le caratteristiche nella crescita che possono essere indicatori del meccanismo d'inizio del tumore.
- **Noduli di Lisch;** anch'essi, come le macchie caffè-latte, sono tra le più comuni caratteristiche di NF₁ presenti in tutti gli adulti affetti da questa patologia. Si presentano come macule colore marrone (tumori benigni) nell'iride dell'occhio, con diametro di circa 2 mm. In genere compaiono durante l'infanzia, non sono cancerosi, ma danneggiano la visione.
- **Lentiggini ascellari;** appaiono in punti del corpo dove la pelle si ripiega - ascelle ed inguine. A differenza delle comuni lentiggini che in soggetti non patologici si manifestano tipicamente in aree del corpo esposte al sole, quelle ascellari

sono invece rare e pertanto considerate un valido indicatore di NF₁ quando questo è presente.

- **Piegamento o assottigliamento della tibia;** anche chiamato “osso stinco”, si presenta in circa il 5 % delle persone affette da NF₁. L’assottigliamento della tibia è anche riferito alla “pseudo artrosi”; non è dannoso ma può causare fratture dell’osso.
- **Gliomi ottici;** sono tumori benigni del nervo ottico che i pazienti NF₁ possono sviluppare. Raramente diventano cancerosi ed in genere non causano sintomi dannosi se non quello di peggiorare la vista.

Altre caratteristiche del disordine presenti non in tutti i soggetti affetti e che si manifestano anche nella popolazione in generale sono:

- Macrocrania;
- Difetti congeniti dell’osso
- Corta statura
- Scoliosi di tipo displastico (con una curvatura accentuata)
- Ipertensione arteriosa
- Ritardo mentale.

Una diagnosi di NF₁ in genere è basata su criteri clinici stabiliti, ed il metodo usato per formularla in modo preciso necessita della presenza di 2 o più caratteri maggiormente frequenti e distinti nella popolazione: 6 o più macchie caffè-latte che devono essere maggiori di 5 mm di diametro in individui in età prepubere e più di 15 mm di diametro dopo la pubertà; 2 o più neurofibromi di qualsiasi tipo o almeno un fibroma plessiforme; lentiggini nella regione ascellare o inguinale; un glioma del nervo ottico; 2 o più noduli di Lisch (amartomi dell'iride); una distinta lesione ossea (es. displasia dell'ala dello sfenoide o assottigliamento della corteccia dell'osso lungo con o senza pseudoartrosi), un parente di primo grado affetto (fratello) con NF₁ diagnosticato secondo i criteri di cui sopra. (Ruggieri M. 1999)

Pertanto l'ampia varietà di espressione clinica, il rischio di tumori e la totale imprevedibilità dell'evoluzione della malattia impongono un monitoraggio clinico regolare dei pazienti NF₁ che deve essere adattato all'età del paziente in modo da assicurare la gestione precoce delle complicanze. (Huson S.M. et al. 1994)

1.4 Patogenesi

Ciò che ancora non è stato spiegato nella NF₁ è l'estrema variabilità fenotipica del disordine, il coinvolgimento di svariati tessuti (cute, tessuto nervoso, osso, tessuto connettivo, ecc.), la possibilità di sviluppare tumori benigni e la loro eventuale trasformazione in tumori maligni, la possibilità di alcuni tumori (es. glioma delle vie ottiche) di rimanere stabili per tempi lunghi e poi regredire e la presenza di segni tipici sindromici (segni dismorfici, bassa statura, displasia scheletrica ecc.) che rendono la patogenesi molto complessa. Si pensa che altri fattori siano coinvolti nel determinare le manifestazioni cliniche ma la loro natura non è stata ancora individuata. (Carey J.C. et al. 1999)

Il fenotipo della NF₁ in alcuni soggetti può essere particolarmente grave; i neurofibromi benigni che all'inizio sono solo un problema estetico, possono diventare tali da essere sfiguranti e risultare un problema psicologico. I neurofibromi plessiformi che in circa il 15% dei pazienti con NF₁ possono estendersi nei tessuti contigui causando seri danneggiamenti e spesso morte, rappresentano il sito di sviluppo dei tumori maligni della guaina. Cambiamenti dell'osso così come "pseudoartrosi" sembrano manifestarsi nel 5% dei casi, spesso sono

benigni, ma possono portare a fratture che in alcuni casi richiedono amputazioni. Individui con NF₁ sembrano essere ad alto rischio di malignità, ma la grandezza di questo rischio è difficile da stimare data la scarsità di studi epidemiologici. Solo un recente studio danese su pazienti NF₁ ha riportato che le donne sono a più alto rischio rispetto agli uomini di contrarre certi tipi di tumori maligni. (Sonja A. Rasmussen et al. 2000)

Alcuni tumori si manifestano più frequentemente in individui affetti da NF₁; ad esempio i “neurofibrosarcomi” (tumori della guaina dei nervi periferici), tumori aggressivi, resistenti alle terapie e spesso letali, rappresentano le più comuni malignità, contribuendo all’aumento della frequenza di NF₁. Altri tumori del SNC più frequenti in NF₁ sono: astrocitomi, ependimomi e medulloblastomi. Inoltre, individui con NF₁ hanno un aumentato rischio di contrarre leucemie mieloidi e un relativo rischio per leucemie mielomonocitiche.

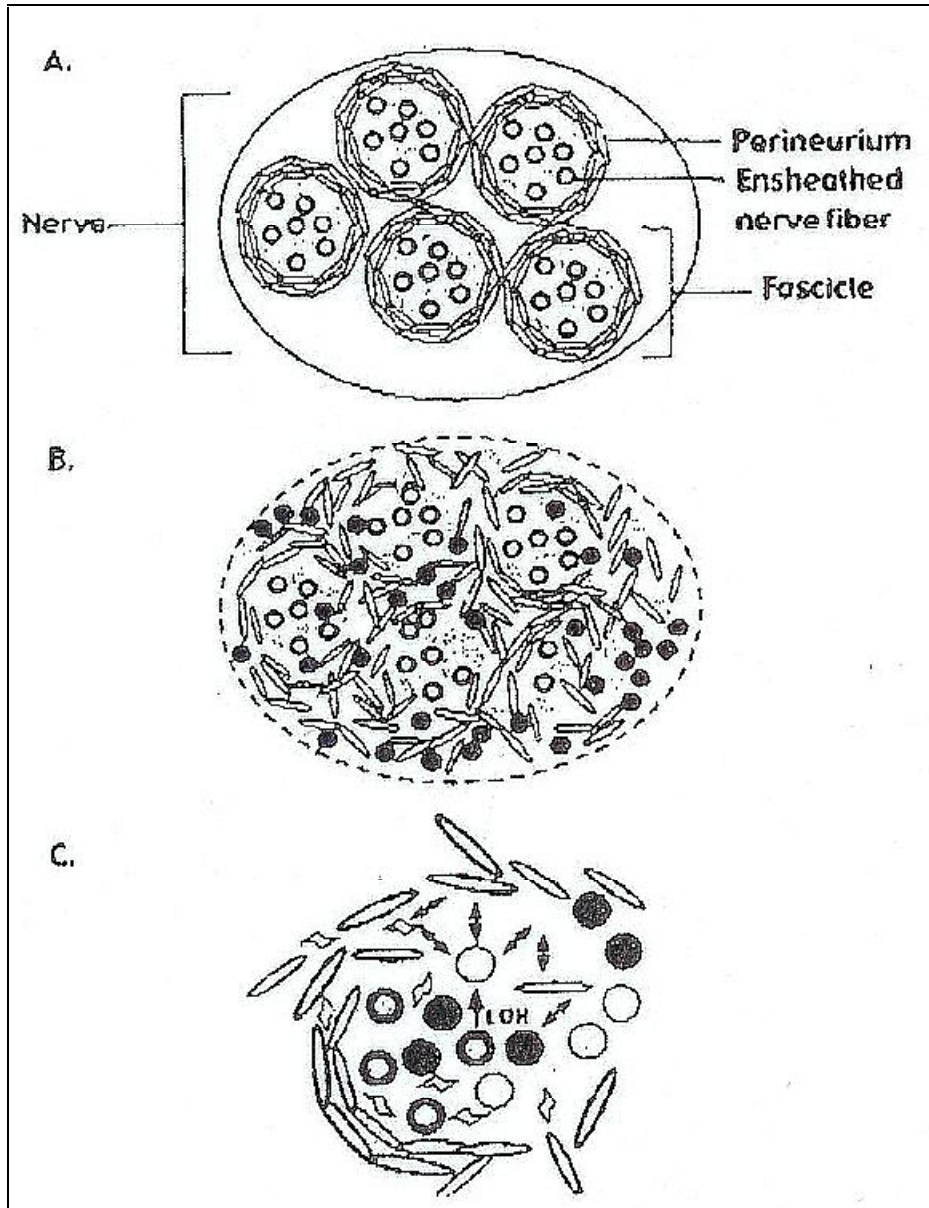
Alcuni soggetti manifestano neurofibromatosi di tipo “segmentale” con caratteristiche di NF1 confinate a particolari aree del corpo. Questo tipo di neurofibromatosi probabilmente deriva da una mutazione somatica del gene NF1 che si manifesta nello sviluppo embrionale poiché casi esaminati finora in letteratura, oltre al mosaicismo somatico hanno mostrato tipica NF1. (Ruggieri M. et al. 2001)

La comparsa della maggior parte delle caratteristiche del disordine è età-dipendente: macchie caffè-latte presenti alla nascita possono aumentare in numero nella prima infanzia; macchie superficiali lentiginose sono più spesso osservate successivamente; neurofibromi possono apparire precocemente ed aumentare tra l'età di 10 e 20 anni; noduli di Lisch che compaiono nella prima infanzia, possono essere presenti in quasi tutti gli adulti con NF₁.

Oltre alla genetica e all'approccio di modelli su topi ingegnerizzati, recentemente studi cellulari su colture di cellule prelevate da neurofibromi: cellule di Schwann, neuroni, cellule perineurali, fibroblasti e mast-cellule, hanno dimostrato che, la mancanza dell'allele normale NF₁ in un solo tipo cellulare, è sufficiente per poter spiegare la base patologica di alcuni fenotipi come appunto i neurofibromi, poiché scatena una serie di eventi che vanno ad alterare il microambiente delle cellule circostanti e tra loro interdipendenti, inducendo la proliferazione cellulare e l'inizio della tumorigenesi. Studi di micrografia elettronica ed analisi istologiche hanno evidenziato che: mentre in uno stato non patologico una singola fibra di un nervo periferico si trova associata ad una cellula di Schwann, così come molte fibre nervose e cellule di Schwann associate clusterizzano in un fascicolo di nervi circondato a sua volta da strati

concentrici di cellule perineurali, in presenza del neurofibroma invece, il numero di tutti i tipi cellulari che lo compongono aumenta notevolmente seguito da modificazioni strutturali come la dissociazione delle cellule di Schwann dai neuroni stessi (K. Cichowski et al. 2002) (fig. 1)

Fig. 1: NERVO PERIFERICO NORMALE E MODELLO DI SVILUPPO DI UN NEUROFIBROMA.



- A) Nervi periferici con tipi cellulari diversi: neuroni, cellule di Schwann, cellule perineurali, fibroblasti e mast-cellule.
- B) Neurofibromi con aumento di tutti i tipi cellulari. Cell. Di Schwann dissociate dai neuroni; perineurio distrutto.
- C) Inizio di neurofibroma da mutazione – perdita dell'allele normale NF1 ereditato nelle cellule di Schwann (NF₁ -/-).

1.5 Gene NF₁

La sindrome della neurofibromatosi tipo I è associata a mutazioni nel gene NF₁. Informazioni riguardo la normale funzione del gene, specialmente in tessuti dove questo funziona maggiormente, potrebbero essere dedotte dai sintomi del disordine stesso, anche se finora l'unico dato certo è che larghe delezioni del gene danno un fenotipo abbastanza grave.

Il gene NF₁ fu clonato nel 1990 nei laboratori da Collins e White. È un gene molto lungo, espandendosi oltre 350 kb lungo il DNA genomico, e localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 nella regione 17q11.2.

È diviso in 60 esoni organizzati in 4 cluster e separati da 4 larghi introni. La sua espressione risulta in 11 – 13 kb di RNA messaggero NF₁ con molte varianti di siti di splicing alternativo. È un gene altamente conservativo tra le specie, tant'è che esiste circa un 98% di omologia del suo prodotto proteico tra topo e uomo e circa il 60% tra drosophila e uomo. (Li Y., O'Connell P. et al. 1995)

L'aumentato rischio di malignità in NF₁ e il fatto che molti pazienti posseggono mutazioni con perdita di funzioni della linea germinale è compatibile con la scoperta che il gene NF₁ è un "tumor-soppressore";

infatti gli esoni 21-27 del gene codificano per un dominio correlato alle proteine Ras-GAP, (come spiegheremo successivamente in dettaglio) le quali hanno la funzione di aumentare l'attività GTPasica del proto-oncogene Ras.

Il gene NF₁ ha anche una elevata omologia con le proteine regolatrici inibitorie del lievito (IRA) coinvolte a loro volta nella regolazione del pathway dei segnali-Ras. Non ci sono altre aree significativamente omologhe ad altri geni. Uno degli introni nel gene contiene 3 geni molto vicini tra loro: OMGP, EVI1A ed EVI1B, la cui funzione è sconosciuta, che sono trascritti in un orientamento opposto al gene stesso.

Il gene NF₁ è ubiquitariamente espresso, ciò potrebbe giustificare le diverse manifestazioni cliniche del disordine anche se i più alti livelli d'espressione sono stati visti nei tessuti neurali. Sono presenti in esso 3 esoni di spliced alternativo (isoforme), oltre ad altre varianti spliche con più bassi livelli d'espressione.

L'isoforma alternativa più comunemente espressa comprende l'esone 23.a (che consta di 63 paia di basi) localizzato nella regione GAP. due altri comuni esoni di spliced alternativo sono il 9.a (circa 30 paia di basi) ed il 48.a (54 paia di basi). L'isoforma contenente l'esone 48.a è altamente espressa nel tessuto muscolare mentre quella che comprende

l'esone 9.a è stata vista durante lo sviluppo embrionale della testa; tuttavia le funzioni di queste due ultime isoforme non sono ancora note. (Rasmussen S.A. et al 2000)

La regione 3' non tradotta dell'RNA messaggero NF₁ condivide una forte omologia con quella del topo, suggerendo che è importante per la stabilità dello stesso RNA messaggero. A questa regione legano alcune proteine tra cui la "HuR", nota per legare gli RNA messaggeri dei proto-oncogeni, citochine e fattori di trascrizione. Recentemente l'RNA messaggero è stato identificato come un potenziale bersaglio verso le zone di adesione intercellulari (K. Chichowski et al. 2001).

1.6 Proteina

Il prodotto del gene NF₁ è una proteina detta anche "Neurofibromina" che consiste in 2818 aminoacidi con peso molecolare di 220-280 Kdalton. È espressa in una varietà di tipi cellulari sia nell'adulto che durante lo sviluppo embrionale, sebbene la sua espressione risulta abbondante nel sistema nervoso centrale e periferico dell'adulto.

Studi di localizzazione sub cellulare hanno dimostrato che la proteina NF₁ è frequente in particolati e frazioni solubili di citoplasma associata con microtubuli, filamenti di actina, mitocondri, reticolo endoplasmatico,

area nucleare e perinucleare. La sua emivita è regolata da un meccanismo post-traslazionale che probabilmente dipende dalla fosforilazione della proteina stessa. È strutturalmente e funzionalmente omologa alle proteine GAP (GTPase – attivant – protein) poiché possiede un dominio GAP-correlato “**GRD**” (GAP-Related-Domain) che è una regione di similarità con i domini catalitici della proteina dei mammiferi “p120 Ras-GAP.”

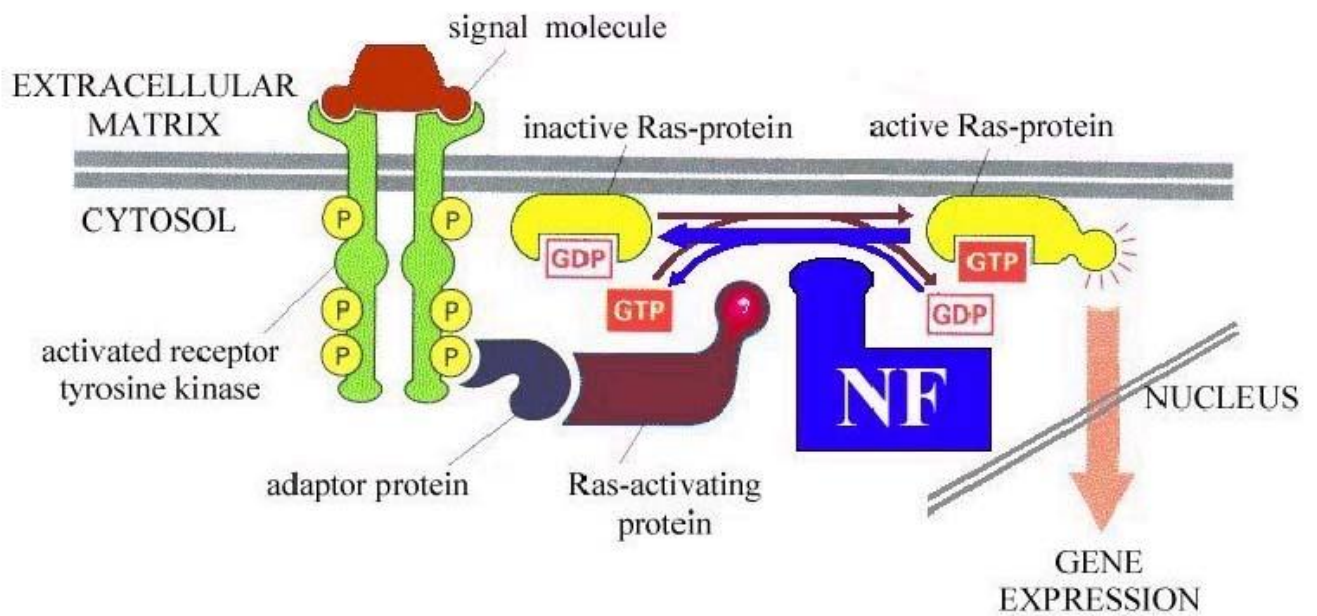
Il GRD è lungo circa 300-400 aminoacidi, situato nel mezzo del prodotto proteico e la sua funzione più conosciuta è quella di agire come un Ras-GAP. (Upadhyaya M. et al. 1997)

Ricordiamo le **Ras-GAP**: sono una famiglia di proteine evolutivamente conservate anche note come GTPase-attivanti che funzionano da inibitori (regolatori negativi) di un gruppo di proteine GTPasi monomeriche (a basso peso molecolare) alle quali appartiene anche l'oncogene Ras. Quest'ultimo è coinvolto nelle vie dei segnali di trasduzione recettore-mediati che promuovono la crescita, proliferazione, differenziazione e sopravvivenza delle cellule.

L'attività delle proteine Ras-GAP è proprio quella di promuovere la “GTPase-intrinseca” della via di Ras catalizzando l'idrolisi di Ras-GTP attivo a Ras-GDP inattivo e convertendo quindi il protooncogene dalla sua forma attiva a forma inattiva. Ras-GTP si trova quindi costantemente

inattivato dalle proteine Ras-GAP tra cui NF₁-protein. Mutazioni nel gene NF₁ che riguardano grosse delezioni o sostituzioni aminoacidiche relative ai domini GAP, portano a proteine truncating che hanno perso la loro funzione putativa di tumor-soppressore conferitagli dai domini GAP-Related, e risultano quindi correlate a fenotipi maligni che includono proliferazioni, invasività, abilità ad indurre neovascolarizzazione e soprattutto difetti nell'apoptosi. Tali processi sono legati a loro volta alla trasformazione di Ras-GDP inattivo a Ras-GTP, che attiva a sua volta una cascata di segnali il cui maggiore bersaglio a valle è la proteina MAPK kinase, potente mitogeno che porta ad un aumento di funzioni di alcuni protooncogeni tra cui Ras che in conseguenza a ciò si trasforma in oncogene (Fig. 2)

Fig. 2: FUNZIONE DELLA NEUROFIBROMINA COME UN RAS-GAP



Le proteine Ras-GAP, così come la Neurofibromina, inattivano Ras catalizzando l'idrolisi di Ras-GTP in Ras-GDP.

Recenti studi effettuati su cellule prelevate da individui affetti da NF₁ e topi geneticamente modificati, hanno dimostrato che l'espressione dell'antigene Fas è regolata dalla via dei segnali di p21^{Ras}. È stato visto infatti che, in assenza di NF₁ ^{-/-}, l'oncogene p21^{Ras} down-regola l'espressione dell'antigene Fas nelle mast-cellule presenti nella popolazione cellulare che compone i neurofibromi, rendendole così resistenti all'apoptosi Fas-ligand mediata. Questo è un valido esempio di come la neurofibromina permette l'appropriata temporale induzione dell'apoptosi nei tessuti, regolando negativamente l'attività di Ras. (Kelly Hiatt et al. 2004)

2- OBIETTIVI DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è stato principalmente quello di indagare, attraverso uno studio di correlazione genotipo-fenotipo mirato a un gruppo di soggetti caratterizzati clinicamente e selezionati per tipologia di manifestazioni e con problemi specifici e particolari della NF₁, le potenziali basi molecolari che determinano la variabilità d'espressione della malattia, al fine di contribuire a definire meglio lo spettro mutazionale della linea germinale di NF₁.

I pazienti esaminati in questo studio provenivano da una ben definita area geografica del sud Italia (Sicilia e Calabria) e presentavano manifestazioni cliniche tipiche dell' NF₁ con complicanze associate a disturbi del SNC. Da un punto di vista metodologico è stato effettuato su questi pazienti, uno screening mutazionale di tutto il gene NF₁ (60 esoni) mediante la combinazione di due metodiche laboratoristico-strumentali: DHPLC e sequenziamento del DNA, atte a ricercare una eventuale associazione tra la mutazione rivelata e il fenotipo clinico presente nell'individuo affetto.

3- MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

L'indagine del nostro studio è stata condotta su un pannello di 85 pazienti affetti da NF₁ di origine calabrese e siciliana includenti 41 maschi di età compresa tra 2 – 55 anni e 44 femmine di età compresa tra 3 – 70 anni di cui 43 erano casi familiari (15 famiglie), 42 sporadici. Questi pazienti, che hanno frequentato la Clinica Neurologica del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Catania, fino al mese di Marzo 2004, sono stati monitorati costantemente con controlli clinici e studi strumentali. Sono stati inoltre caratterizzati clinicamente e selezionati per tipologia di manifestazioni cliniche e complicanze associate quali ad esempio disturbi del SNC (convulsioni, epilessia, ritardo mentale), displasie ossee, lesioni cerebrali, accompagnate da una diagnosi accurata fatta mediante la collaborazione dell'equipe coordinata dal Dott. Martino Ruggieri (Ricercatore c/o CNR Catania). La diagnosi di NF₁ per questi pazienti è stata fatta in accordo con i criteri NIH (NIH Consensus Conference Sviluppo, 1988-rivisti da Guthman et al. 1997) previo consenso informato ottenuto da parte degli stessi (o dai loro genitori).

I tumori di colori che ne erano affetti (la maggior parte gliomi cerebellari ed intraventricolari) sono stati completamente rimossi in modo tale da non lasciare alcuna lesione residua patologica da 3 a 10 anni di follow-up e con buon risultato clinico; tranne per 4 di questi soggetti in cui era presente un glioma cerebrale delle vie ottiche (OPG) ben caratterizzato istologicamente (di grado I° -WHO).

Parallelamente abbiamo analizzato un gruppo di controllo costituito da 50 individui (100 cromosomi) sani, provenienti dalla Sicilia e dalla Calabria.

3.2 Metodologie Sperimentali

3.2.1 Campioni

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue intero raccolto in provette contenenti EDTA, con la procedura standard di estrazione fenolo-cloroformio.

3.2.2 Procedura standard di estrazione fenolo-cloroformio

Tale procedura ha previsto una fase iniziale di lisi dei globuli bianchi mediante Lysis buffer (Applied Biosystem) e di digestione della

componente enzimatica ad opera della proteinasi K a temperatura ambiente per tutta la notte, oppure a 58°C per 2 ore. Dopo tale periodo è stato addizionato fenolo-cloroformio in egual volume e le provette sono state messe ad agitare per 20 min. a temperatura ambiente.

Si è proceduto successivamente alla centrifugazione per isolare le fasi, a 2500 rpm per 20 min; è stato prelevato il sovrantante e ripetuta la fase di agitazione con fenolo-cloroformio seguita da centrifugazione. Nel passaggio successivo è stato aggiunto cloroformio puro al fine di eliminare i residui di fenolo e dopo agitazione e centrifugazione alle medesime condizioni, è stato prelevato il sovrantante al quale è stato aggiunto 1/10 del volume di sodio acetato e il doppio del volume di etanolo assoluto, agitando delicatamente la provetta.

In queste condizioni, il DNA è precipitato sotto forma di filamento visibile che è stato possibile prelevare. Un ulteriore lavaggio con etanolo al 70% seguito da centrifugazione, essiccamento e risospensione in TE, ha reso il DNA disponibile per le successive fasi di lettura e amplificazioni.

Materiali utilizzati:

Lysis buffer: Applied Biosystem;

Proteinasi K: 10 mg/ml;

Fenolo-cloroformio: Applied Biosystem;

Cloroformio:	Carlo Erba;
Sodio Acetato:	2M
TE 1X:	0.01M Tris-HCl pH 8 + 0.001M EDTA pH 8 per litro di soluzione

3.2.3 Dosaggio del DNA

Il dosaggio del DNA è stato effettuato mediante Biophotometer utilizzato per eseguire rapide e semplici misurazioni. Per la lettura della concentrazione non nota del DNA, 10 μ l del campione risospeso in TE, sono stati diluiti in 990 μ l di TE. Inizialmente si è proceduto ad azzerare lo strumento con un campione di bianco che è consistito in TE 1x, step dopo il quale è stato possibile misurare la concentrazione del DNA espressa in ng/ μ l.

3.3 PCR degli esoni del gene NF1

Per l'amplificazione di tutti i 60 esoni del gene NF₁, sono stati disegnati "ad hoc" 55 coppie di oligonucleotidi specifici per ciascun esone. La scelta dei primers è stata effettuata sulla base di dati riportati in letteratura. In accordo con Hans et al. 2001 sono state scelte le coppie di primer per i seguenti esoni: ex 1, 2, 3, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 9, 9a, 10a,

10b, 10c, 11, 12a, 12b, 13, 14, 15, 17, 18, 19°, 20, 21, 22, 23.1, 23.2, 24, 25, 26, 27b, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 48a, 49.

Due coppie di primers degli esoni 19b e 27a sono state disegnate in accordo con Fashold et al. 2000; le rimanenti 3 coppie di primers degli esoni 16, 28 e 40 usate, disegnate, come precedentemente descritto da De Luca et al. 2003.

Le temperature di ibridazione (Tannealing) sono state individualmente ottimizzate per ciascun amplicone in un range compreso tra i 53°C – 66°C. (Tab. 1)

La miscela di reazione della Pcr genomica è stata portata a un volume finale di reazione di 50µl con i seguenti componenti: 130 ngr di DNA genomico, 20 pmoli di primer forward e reverse, 200µM di dNTPs, 5 µl di Buffer di reazione 1x (Transgenomic) 2.5 U di Taq DNA Polimerase (Transgenomic OptimaseTM Polymerase), 1.5 mM di Mg SO₄.

Il profilo termico di amplificazione ha previsto una pre-denaturazione a 95°C per 5' e 35 cicli di:

1° step: denaturazione a 95°C per 5 min.

2° step: T annealing specifica per ciascuna coppia di primer per 45 sec.

3° step: estensione a 72°C per 1 min.

4° step: estensione finale a 72°C per 4 min.

La reazione di amplificazione con profilo termico specifico per ciascun esone, è stata impostata ed effettuata mediante l'amplificatore PTC-100 (™Programmable Thermal Controller – Genenco).

Per valutare la qualità dell'amplificato, 1/10 del volume di ciascun amplicone è stato caricato su gel d'agarosio al 2% in TAE (Tris-Acetato 40mM EDTA 1mM) a cui è stato aggiunto Etidio Bromuro 0,5 ngr/μl.

I campioni caricati nei pozzetti del gel, sono stati mescolati a 2μl di tracciante elettroforetico (Xilene Cianolo 0.25%, glicerolo 30%). Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato controllato agli UV per verificare la presenza dell'amplificato visibile sotto forma di banda. Quest'ultima fase, preliminare all'analisi in DHPLC, è risultata utile per valutare la qualità e la purezza dell'amplificato, condizione questa indispensabile per poter sottoporre successivamente un prodotto di Pcr puro ad analisi in DHPLC, senza dover correre il rischio di analizzare aspecifici.

3.4 Analisi in DHPLC

L'analisi in DHPLC è stata fatta usando il Wave™ DNA FRAGMENT ANALYSIS SYSTEM (Transgenomic; O'Donovan et al, 1998).

Questa tecnica è basata sulla differente velocità di migrazione in un mezzo, la colonna, di eteroduplici e omoduplici che vengono separati da una cromatografia liquida per mezzo di una coppia di ioni in fase inversa in accordo con le loro differenze nelle temperature di quasi-denaturazione (T_{melting}) (Xiao et Oefner, 2001).

I frammenti di DNA a doppio filamento carichi negativamente e parzialmente denaturati al calore, interagiranno in lunghezza ed in modo sequenza-specifico con una matrice non porosa di polistirene-divinilbenzene (DNA, Transgenomic). L'eluizione dalla matrice sarà ottenuta con un gradiente lineare di acetonitrile ad una velocità di flusso di 0.9 ml/minuto con una fase mobile composta da una miscela di Buffer A (0.1 M/L di TEAA) e Buffer B (25% di acetonitrile in 0.1 M/L di TEAA). Il risultato sarà che, alla temperatura di quasi-denaturazione, l'omoduplex si troverà ancora sotto forma di doppia elica, mentre l'eteroduplex alla stessa temperatura e nelle medesime condizioni

mostrerà una parziale denaturazione in corrispondenza del punto dove si è verificato il misappaiamento (cambio di base).

Ciò comporterà differenti tempi di ritenzione nella colonna, per cui l'eteroduplex sarà più veloce (meno trattenuto) rispetto all'omoduplex che sarà eluito più tardi.

Cromatograficamente tutto questo verrà evidenziato sotto forma di più picchi per l'eteroduplex rispetto al "wild" omoduplex che si risolverà in un unico picco. In questo lavoro si è proceduto nel seguente modo: innanzitutto è stata calcolata e stabilita sperimentalmente la temperatura di quasi-denaturazione mediante un software Transgenomic situato nell'apparecchio (Stanford DHPLC Melting Program) che, analizzando il profilo di melting dello specifico frammento di DNA, calcola la temperatura di quasi-denaturazione specifica per la sequenza in esame di ciascun esone. (Tab. 1) Dopodichè si è proceduto ad analizzare tutti i campioni alle stesse condizioni come segue: i nostri campioni, precedentemente amplificati con i protocolli standard di Pcr, sono stati sottoposti a 2 step aggiuntivi:

1° - denaturazione a 95° per 5 min.

2° - riappaiamento mediante raffreddamento lento a T.a. per 30 min al fine di consentire la formazione degli eteroduplici prima dell'analisi in DHPLC.

Infine, la micropiastra di Pcr è stata posizionata sull'autocampionatore del sistema che ha provveduto a prelevare 2-5 μ l di amplificato Pcr (circa 20-50 ngr di DNA) e ad iniettarlo nel sistema DHPLC.

Tab 1: TEMPERATURE DI ANNEALING DELLA PCR E CONDIZIONI DI ANALISI IN DHPLC PER GLI AMPLICONI NF₁.

Exonic fragment	PCR annealing temp.°C	DHPLC Oven temp °C	Start % buffer B	Exonic fragment	PCR annealing temp.°C	DHPLC Oven temp °C	Start % buffer B
1	66	63.3, 66.7	56, 53	23-2	56	53.3, 59.3	53, 49
2	60	55.6	52	23a	58	53.9, 54.9, 58	57, 56, 53
3	60	55.7	53	24	58	58.1	51
4a	58	54, 58	58, 53	25	56	56.8	46
4b	62	54	53	26	56	56.8, 58.8	51, 49
4c	58	54.8	54	27a	60	57.7	55
5	58	53.2	49	27b	53	55.4	54
6	60	55.1, 57.1	54, 52	28	57	55.8, 60.8	58, 53
7	60	54, 57	56, 52	29	58	58, 61	54, 52
8	60	55.7, 58.5	54, 52	30	56	58.4	50
9	56	53.9	53, 49	31	57	57,6	57
9a	60	54.1, 60	55, 51	32	58	53.3, 58.3	55, 51
10a	58	57, 59, 60	50, 48	33	58	57.2	54
10b	58	54.8	51	34	57	52.3, 57.5, 59.5	57, 54, 53
10c	58	57.3, 59	51	35	58	52.2, 57.2	55, 50
11	60	52.9	52	36	58	55.1, 59.1	53, 48
12a	60	53.7, 55.7	54, 51	37	58	55.1	50
12b	60	56.8	54	38	58	57.3, 61.3	53, 48
13	60	57.3, 61	54, 53	39	60	53.4, 58.4	54, 51
14	58	60.3	50	40	58	55.9	57
15	62	56.6	50	41	56	56	54
16	58	56.2, 60.2	56, 52	42	58	52, 55.5, 60	55, 53, 51
17	60	55.6	54	43	58	54.8	53
18	60	55.2	52	44	60	56.1, 58.1	52, 51
19a	58	55.7	52	45	60	56.7	52
19b	58	54.4, 57.4	53, 51	46	56	57	51
20	55	57	54	47	58	56.4	49
21	57	57, 59	55, 53	48	58	55.1, 61.1	56, 51
22	58	58.3	53	48a	58	54.2, 59.2	54, 51
23-1	58	56.6	55	49	58	57.3, 63.3	56, 51

3.5 Analisi di Sequenza

La metodica DHPLC, pur rivelando la presenza di una mutazione all'interno del frammento analizzato, non ci ha consentito di caratterizzarne il tipo, per cui è stato necessario procedere con l'analisi di sequenza. I frammenti di Pcr da individui con NF₁ che hanno evidenziato la formazione di anomali eteroduplici in DHPLC comparati ai controlli normali, sono stati sequenziati mediante l'uso di un sequenziatore ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem) seguendo le raccomandazioni della casa ed in collegamento con un programma ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystem, Foster City, CA USA).

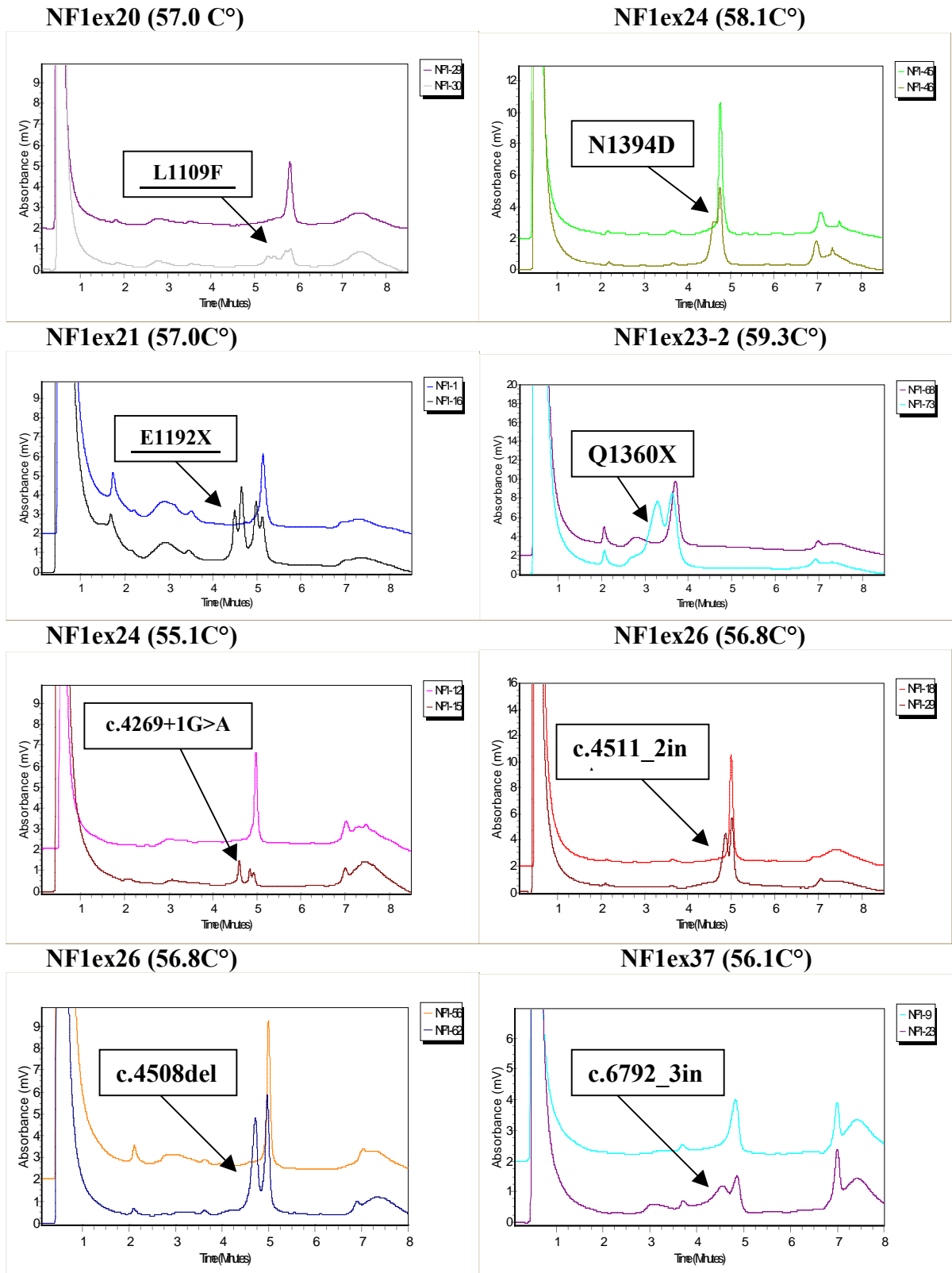
4- RISULTATI

4.1 Screening di mutazioni in DHPLC

Un pannello di 42 casi sporadici e 43 casi familiari (85 pazienti NF₁ del sud Italia) sono stati indagati per tutti i 60 esoni del gene NF₁ mediante DHPLC e sequenziamento del DNA. Degli 85 pazienti NF₁ esaminati, 64 hanno mostrato profili di eluizione anomali nell'analisi in DHPLC, con picchi multipli dovuti al ridotto tempo di ritenzione nella colonna del DNA eteroduplice, mentre i prodotti di Pcr di controllo sono risultati tutti altamente simili mostrando un singolo picco di DNA omoduplice. (Fig. 3)

Tutte le mutazioni sono state confermate con ripetute amplificazioni e sequenziamento e le posizioni delle mutazioni a livello del DNA sono state numerate usando la GeneBank NF₁ sequenza mRNA M82814.

Fig. 3 CROMATOGRAMMI IN DHPLC PER ALCUNE MUTAZIONI IDENTIFICATE NEGLI ESONI: 20, 21, 23.2, 24, 26 E 37.



I profili dei campioni mutati sono comparati con un controllo normale (le frecce indicano i diversi pattern di eluizione).

4.2 Spettro mutazionale

Lo screening mutazionale del gene NF₁ sui pazienti da noi esaminati, ha rivelato la presenza di 36 differenti mutazioni in totale che includono: 10 mutazioni di stop, 9 sostituzioni nucleotidiche, 6 piccole inserzioni, 8 piccole delezioni e 3 siti di splicing. In particolare, 16 sono rappresentate da:

8 mutazioni nonsense: c. 910C>T (**R304X**) localizzata nell'esone 7 in 5 pazienti; c.1246C>T (**R416X**) nell'esone 9; c.1318C>T (**R440X**) nell'esone 10.a; c.3826C>T (**R1276X**) nell'esone 22 in 3 pazienti; c.5839C>T (**R1947X**) nell'esone 31 in 2 pazienti; c.6792C>A (**Y2264X**) nell'esone 37; c.7285C>T (**R2429X**) nell'esone 41 in 2 pazienti; c.7846C>T (**R2616X**) nell'esone 45. Tutte queste mutazioni riguardano la trasformazione di arginina o tirosina in codoni di stop.

4 mutazioni missense: (sostituzioni aminoacidiche): c.1466A>G (**Y489C**=> trasformazione di Tirosina in Cisteina) nell'esone 10.b trovata in due pazienti; c.2342A>C (**H781P**=> Istidina in Prolina) nell'esone 15; c.4255A>C (**K1419Q**=> Lisina in Glutamina) nell'esone 24 in 3 pazienti; c.4267A>G (**K1423E**=> Lisina in Acido Glutamico) nell'esone 24.

2 piccole delezioni: c.495_8 del TGTT nell'esone 4.b; c.3456_9 del ACTC nell'esone 20

1 inserzione: c.6791_2ins.A nell'esone 37.

1 mutazione nel sito di splicing nell'introne 2 in due pazienti: c.204+1G>T.

Oltre alle mutazioni note sono state identificate 20 mutazioni nuove negli esoni: 4.a, 8, 20, 21, 23.2, 24, 26, 27.a, 29, 33, 34, 37, 39, 41; e negli introni 24 e 44 del gene NF₁. Più specificatamente sono state trovate 2 differenti mutazioni negli esoni: 21, 24, 26 e 39.

Dodici mutazioni sono state identificate in casi sporadici, otto in casi familiari (Tab 2); in particolare hanno generato:

2 codoni di stop: c.3574G>T (**E1192X**=> Acido glutamico in codone di stop); C.4078C>T (**Q1360X**=> Glutamina in cod. di stop) in 3 pazienti.

5 sostituzioni nucleotidiche: c.3327A>C (**L1109F**=> Leucina trasformata in Fenilalanina) in 2 pazienti; c.3577T>A (**F1193I**=> Fenilalanina in Isoleucina); c.4180A>G (**N1394D**=> Asparagina in Acido aspartico); c.4193T>A (**V1398D**=> Valina in Acido aspartico); c.6364G>C (**E2122Q**=> Acido glutamico in Glutamina) in 4 pazienti.

5 piccole inserzioni: c.310_1insTAGCATAACGATGCTGGTCCAGCA in 4 pazienti; c.1074_5insGAACCTGCTTTTT in 3 pazienti; c.4511_2insA; c.6488_9insA; c.6792_3insC in 2 pazienti.

7 piccole delezioni: c.4508del G; c.4625del A in 2 pazienti; c.5524del A; c.7017delT in 2 pazienti; c.7084_9del AACTCT; c.7365delT.

2 mutazioni nel sito di splicing: c.4269+1G>A; c.7806+1G>A in 3 pazienti (Tab 3).

Sono state identificate inoltre 4 differenti mutazioni nel gene NF₁ in 4 individui affetti da glioma ottico cerebrale di I° grado (WHO): c.1466A>G (**Y489C**) nell'esone 10.b; c.3327A>C (**L1109F**) nell'esone 20; c.4078C>T (**Q1360X**) nell'esone 23.2, c.4267A>G (**K1423**) nell'esone 24. Nel corso di tale analisi, sono stati inoltre individuati in totale 11 polimorfismi intronici nel gene NF₁, di cui 8 nuovi. Nessuna delle nuove mutazioni è stata rilevata in 50 pazienti (100 cromosomi di controllo) in un gruppo di individui sani provenienti dalla Sicilia e dalla Calabria.

Tab. 2 MUTAZIONI IDENTIFICATE IN QUESTO STUDIO.

Pazienti ID	Storia	Frammento esonico	Mutazioni	Sostituzioni aminoacidiche	Tipo di mutazione
NF1-51,52,53,54	Familial	4a	c.310_1ins TAGCATAAACGAT GCTGGTCCAGCA		Frameshift
NF1-27	Sporadic	4b	c.495_8delTGTT		Frameshift
NF1-36,77	Sporadic	7	c.910 C>T	R304X	Nonsense
NF1-66,75,76	Familial	7	c.910 C>T	R304X	Nonsense
NF1-19,20,21	Familial	8	c.1074_5ins GAACCTGCTTTTT		Frameshift
NF1-48	Sporadico	9	c.1246 C>T	R416X	Nonsense
NF1-78	Sporadico	10a	c.1318 C>T	R440X	Nonsense
NF1-7,8	Familiare	10b	c.1466 A>G	Y489C	Missense
NF1-34	Sporadico	15	c.2342 A>C	H781P	Missense
NF1-31	Sporadico	20	c.3456_9delACTC		Frameshift
NF1-26,30	Sporadico	20	c.3327 A>C	L1109F	Missense
NF1-16	Sporadico	21	c.3574 G>T	E1192X	Nonsense
NF1-14	Sporadico	21	c.3577 T>A	F1193I	Missense
NF1-32,45,61	Sporadico	22	c.3826 C>T	R1276X	Nonsense
NF1-73,74,79	Familiare	23.2	c.4078 C>T	Q1360X	Nonsense
NF1-46	Sporadico	24	c.4180 A>G	N1394D	Missense
NF1-69,70,82	Familiare	24	c.4255 A>C	K1419Q	Missense
NF1-65	Sporadico	24	c.4267 A>G	K1423E	Missense
NF1-56	Sporadico	24	c.4193 T>A	V1398D	Missense
NF1-62	Sporadico	26	c.4508delG		Frameshift
NF1-29	Sporadico	26	c.4511_2insA		Frameshift
NF1-3,4	Familiare	27a	c.4625delA		Frameshift
NF 1-9	Sporadico	29	c.5524delA		Frameshift
NF1-39,40	Familiare	31	c.5839 C>T	R1947X	Nonsense
NF1-41,42,49,50	Familiare	33	c.6364 G>C	E2122Q	Missense
NF1-55	Sporadico	34	c.6488_9insA		Frameshift
NF1-81	Sporadico	37	c.6791_2insA		Frameshift
NF1-23,24	Familiare	37	c.6792_3insC		Frameshift
NF1-18	Sporadico	37	c.6792 C>A	Y2264X	Nonsense
NF1-35,80	Familiare	39	c.7017delT		Frameshift
NF1-57	Sporadico	39	c.7084_9delAACTCT		Frameshift
NF1-63,64	Familiare	41	c.7285 C>T	R2429X	Missense
NF1-33	Sporadico	41	c.7365delT		Frameshift
NF1-58	Sporadico	45	c.7846 C>T	R2616X	Nonsense

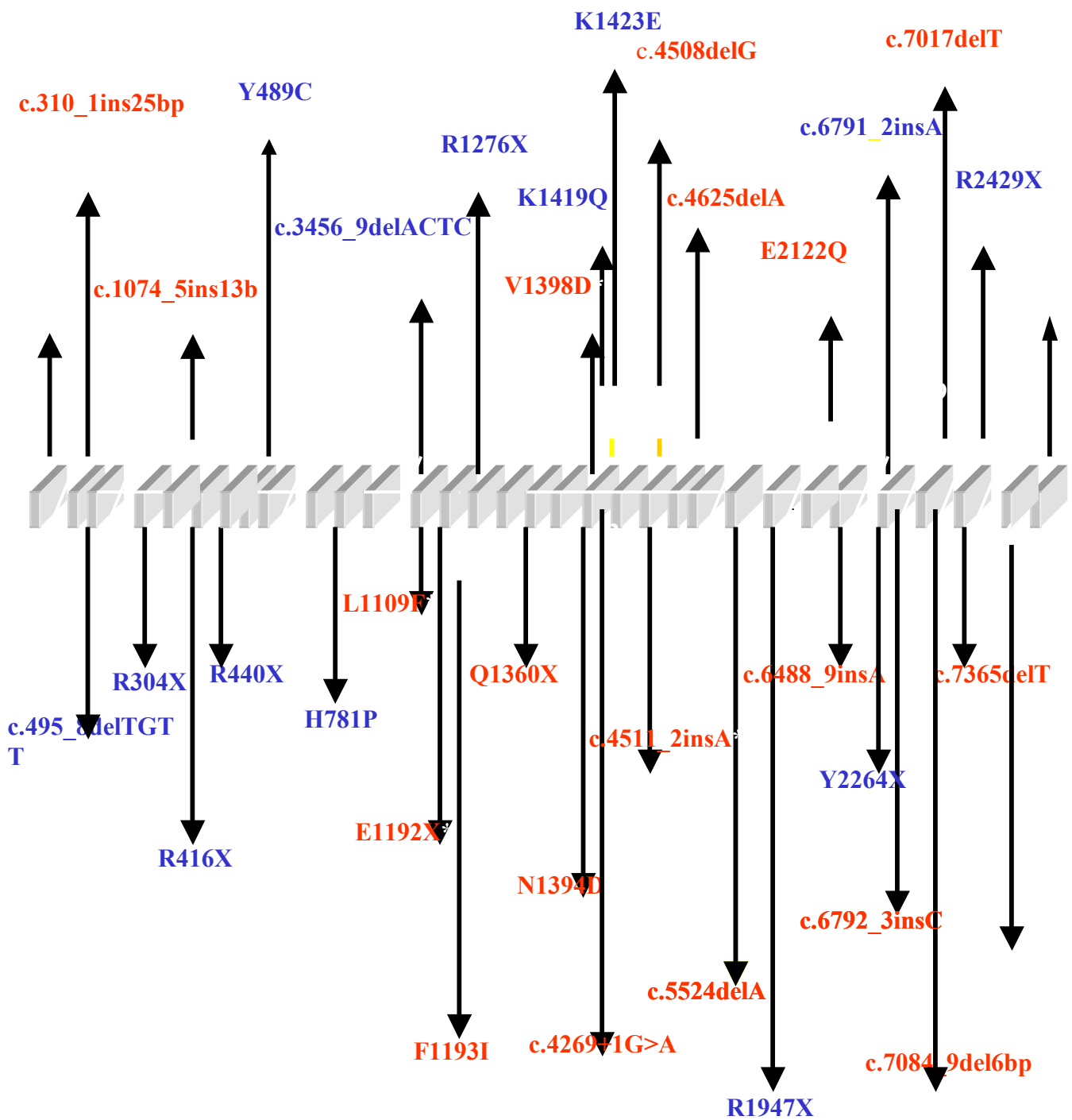
Le mutazioni in tabella riguardano: sostituzioni nucleotidiche, delezioni ed inserzioni. La numerazione del nucleotide è stata fatta tramite accesso a Genebank N° M82814. La prima base è presa come partenza del c.DNA; le nuove mutazioni sono riportate in neretto.

Tab. 3 MUTAZIONI NEL SITO DI SPLICING RIPORTATE IN QUESTO STUDIO.

Pazienti ID	Storia	Frammento Intronico	Mutazione	Tipo di mutazione
NF1-84.85	Familiare	2	c.204+1G>T	Splicing
NF1-15	Sporadico	24	c.4269+1G>A	Splicing
NF1-5,6,28	Familiare	44	c.7806+1G>A	Splicing

Mutazioni nuove in neretto.

Fig. 4: DISLOCAZIONE LUNGO IL GENE NF1 DELLE MUTAZIONI IDENTIFICATE IN QUESTO STUDIO.



Mutazioni nuove in rosso

5- DISCUSSIONE

La frequenza di mutazioni nel gene NF_1 è tra le più alte finora conosciute nel genoma umano $3.1 - 6,5 \times 10^6$ (Vogel and Motulsky, 1997) con un livello di eterogeneità mutazionale evidenziata dall'elevata proporzione di mutazioni "de novo" presenti nel 50% di pazienti che non hanno una storia familiare (Upadhyaya M. 1998).

L'elevata frequenza di mutazioni probabilmente è causata dall'ampia lunghezza del gene, dalla complessità del suo processamento (eventi di ricombinazione frequenti che portano a crossing-over ineguali) e dalla presenza di pseudo-geni NF_1 .

Non sono stati individuati hot-spot mutazionali nel gene NF_1 , tranne negli esoni 4b, 10, 37 dove, in un recente studio condotto da Fahsold e colleghi, è stato riscontrato uno sproporzionato numero di mutazioni (circa 30%).

La maggior parte delle mutazioni finora identificate in letteratura son riferite a grosse delezioni che portano alla perdita di un lungo tratto del gene o piccole mutazioni (microdelezioni) che riguardano: cambiamenti nel sito di splicing, piccole delezioni predette a portare alla prematura

terminazione della sintesi proteica generando una “truncating protein” (Upadhyaya and Cooper, 1998), e sostituzioni aminoacidiche, alcune delle quali coinvolte nei domini putativi che riguardano residui di aminoacidi critici per il mantenimento dell'attività GAP della proteina.

L'analisi mutazionale del gene NF_1 è stata finora considerata una notevole sfida a causa della: grandezza del gene, assenza di hot-spot mutazionali significativi e diversità di lesioni patologiche osservate.

I sistemi di rilevazione del numero di mutazioni NF_1 sviluppati negli anni recenti (Upadhyaya and Cooper 1998; Osborn and Upadhyaya 199; Fahsold et al. 200) riguardavano metodi basati sul cDNA (test del PTT) che presentavano grossi limiti evidenziati dalla notevole discrepanza sulla frequenza di mutazioni rilevate, se confrontate con gli attuali studi.

Solo in questi ultimi anni, l'uso della DHPLC per l'identificazione di mutazioni, ha rappresentato un significativo avanzamento nella diagnosi molecolare di NF_1 , poiché in grado di identificare almeno 2/3 delle mutazioni nella popolazione screenata. Tuttavia un 10-15% di tutte le mutazioni relative a grossi riarrangiamenti o delezioni multiesoniche, rientrano in quella piccola proporzione di lesioni non rilevabili dallo strumento DHPLC (poiché rileva solo microdelezioni) che richiedono un ulteriore screening con metodi citogenetici (Fish) (Osborn MJ et al 1999).

Oltre alla variabilità genetica, la neurofibromatosi tipo 1 manifesta anche una marcata variabilità clinica persino nell'ambito dello stesso nucleo familiare, per cui è stato spesso difficoltoso correlare uno specifico genotipo con un definito fenotipo (Upadhyaya 2001). La maggior parte degli studi finora condotti, non ha riscontrato una ovvia correlazione tra particolari mutazioni del gene NF_1 e risultanti manifestazioni cliniche nei pazienti affetti, tranne che per alcuni soggetti con fenotipo particolarmente grave (presenza di anomalie pigmentarie molto marcate ed estese, segni dismorfici, ritardo mentale, comparsa precoce di molti neurofibromi ed altre complicanze) in cui sono state identificate delezioni estese del gene (J. Szudek et al. 2002).

Tentativi di correlazione genotipo-fenotipo in NF_1 sono stati spesso confusi con l'effetto età che aumenta la frequenza di manifestazioni del disordine e la probabilità di serie complicazioni in tutti i pazienti. Tuttavia in letteratura sono stati riportati rari casi di co-ricorrenza tra neurofibromatosi tipo 1 ed altre rappresentazioni cliniche associate, come l'esempio del carcinoma mammario/ovarico e l' NF_1 presenti contemporaneamente in tre individui di una stessa famiglia. Studi di analisi di linkage hanno evidenziato che si trattava dell'effetto sinergico di due distinte mutazioni nei geni NF_1 e $BRCA_1$ entrambi sul cromosoma 17

(Rasmussen et al. 2000). Associazione è stata trovata anche tra NF₁ e fenotipo Sindrome di Noonan in alcune famiglie dove i due fenotipi segregavano insieme risultando da mutazioni del gene NF₁; mentre diversa era la frequenza di co-ricorrenza in altre famiglie in cui i disordini segregavano come tratti autosomici dominanti indipendenti, non essendo la S. di Noonan legata al locus NF₁. Necessiteranno ulteriori studi per chiarire questo aspetto che sembra avere diverse e numerose cause. (Rasmussen SA et al. 2000).

Nel nostro studio sono stati prospettivamente e accuratamente analizzati, da un punto di vista molecolare, un largo gruppo di pazienti NF₁ provenienti dal Sud-Italia, geneticamente non caratterizzati.

L'analisi è stata effettuata mediante l'applicazione di due metodologie combinate "DHPLC e Sequenziamento del DNA", con l'ottimizzazione di protocolli molecolari che ci hanno consentito di screenare rapidamente i 60 esoni del gene, compresi i siti di splicing, e rilevare circa il 97% di mutazioni germ-line nei campioni in esame. Sono state individuate 36 mutazioni in totale di cui 20 nuove che hanno incluso: 5 sostituzioni nucleotidiche, 5 piccole inserzioni, 2 mutazioni nel sito di splicing, 6 piccole delezioni e due codoni di stop.

Il nostro studio, così come già riportato in letteratura (Upadhyaya 2001), ha confermato la mancanza di correlazione tra la presenza e gravità delle manifestazioni cliniche ed il sito di mutazione documentato, poiché le mutazioni identificate non hanno causato il disordine (variabilità genotipica e fenotipica senza alcuna correlazione tra le due, in soggetti affetti appartenenti alla stessa famiglia). A supporto di quanto detto, sono stati esaminati 4 pazienti affetti da glioma ottico dello stesso tipo istologico e grado (I°-WHO) che presentavano 4 diverse mutazioni. Questi rappresentavano i soli soggetti con gliomi ottici cerebrali in riferimento alla popolazione NF₁ da noi screenata ed a quella della città di Catania.

Ciò ha rappresentato un valido esempio di variabilità genotipica per una ben riconosciuta complicazione di NF₁ (gliomi delle vie ottiche cerebrali) in una data popolazione (Rosser T. and Packer 2002).

Infine i nostri risultati hanno confermato la possibilità di una diagnosi molecolare di routine per NF₁ mediante l'individuazione diretta delle mutazioni con l'uso combinato della DHPLC e sequenziamento di DNA.

Tale applicazione potrebbe in futuro essere usata per caratterizzare mutazioni in disordini in cui il gene responsabile è estremamente grande.

Inoltre, l'identificazione delle 20 nuove mutazioni tra cui un 50% "de novo" in casi non familiari, ha contribuito a definire lo spettro mutazionale della linea germinale del gene NF_1 , al fine di poter identificare nuovi domini funzionali nel prodotto del gene "neurofibromina", soprattutto quando le mutazioni riguardano residui aminoacidici abbastanza significativi e altamente conservati della proteina le cui conseguenze funzionali ci aiuterebbero a capire i meccanismi che portano alla trasformazione di tumori benigni NF_1 -correlati in maligni.

In seguito potrebbe essere di ulteriore interesse approfondire la natura dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell' NF_1 iniziando dalla regione promoter, con studi di struttura/funzione mediante ricerche per mutazioni in questa regione, seguite dall'indagine sul potenziale ruolo di metilazione dello stesso nell'attivazione del gene NF_1 e quindi nella tumorigenesi.

6- BIBLIOGRAFIA

- 1- De Luca A, Buccino A, Gianni D, Mangino M, Giustini S, Richetta A, Divona L, Calvieri S, Mingarelli R, Dallapicola B. 2003. *NF₁ gene analysis based on DHPLC*. Hum Mutat 21:171-172
- 2- Friedman J, Gutman DA, McCollin M, Riccardi V. 1999. *Neurofibromatosis: natural history, genotype and phenotype*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- 3- Han S, Cooper DN, Upadhyaya M. 2001. *Evaluation of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of neurofibromatosis type1 (NF₁) gene*. Hum Genet 109:487-497.
- 4- Gutman DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D. 1997. *The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2*. JAMA 278:71-94.
- 5- Huber CG, Oefner PJ, Preuss E, Bonn GK. 1993. *High resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles*. Acids Res 21:1060-1066.
- 6- Huson SM, Hughes RAC. 1994. *The Neurofibromatoses: a clinical and genetic overview*. London: Chapman & Hall, 1994.
- 7- Carey JC, Viskochil DH. 1999 *Neurofibromatosis type 1: a model condition for the study of the molecular basis of variable expressivity in human disorders*. Am J Med Genet 89:7-13.
- 8- Cnossen MH, Moons KG, Garssen MP, Pasmans NM, de Goede-Bolder A, Niermeijer MF, Grobbee DE. 1998. *Minor disease features in neurofibromatosis type 1 (NF₁) and their possible value in diagnosis of NF₁ in children < or = 6 years and clinically suspected of having NF₁*. Neurofibromatosis team of Sophia Children's Hospital. J Med Genet 35:624-627.

- 9- Karen Cichowski and Tyler Jacks 2001. *NF₁ Tumor Suppressor Gene Function: Narrowing the GAP*. Cell. Feb 23 104(4):593-604
Review.
- 10- Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. 1989. *A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of prenatal transmission on severity*. J Med Genet 26:704-711.
- 11- Ruggieri M, Huson SM 2001. *The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses*. Neurology 56:1433-43.
- 12- M Ruggieri, A Polizzi 2003. *From Aldrovandi's Homuncio (1592) to Buffon's girl (1749) and the Wart Man of Tilesius (1793): antique illustrations of mosaicism in neurofibromatosis ?*. J. Med. Genet. 40:227-232.
- 13- Osborn MJ, Upadhyaya M, 1999. *Evaluation of the protein truncation test and mutation detection in the NF₁ gene: mutational analysis of 15 known and 40 unknown mutations*. Human Genet. 105:327-332.
- 14- Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C and Nurnberg P 2000. *Minor lesion mutational spectrum of the entire NF₁ gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain*. Am. J. Hum. Gen. 66:790-818.
- 15- A. De Luca, A. Schirinzi, A. Buccino, L. Sinibaldi, I. Torrente, S. Calvieri, B. Dallapicola 2004. *Novel and Recurrent Mutations in the NF₁ gene in Italian Patients with Neurofibromatosis Type 1*. Human Mutation - Brief Communication # 716:1-13
- 16- Kelly Hiatt, David A. Ingram, Don F. Spandau and D. Wade Clapp 2004. *Loss of the NF₁ Tumor Suppressor Gene Decreases Fas Antigen Expression in Myeloid Cells*. American Journal of Pathology 164:1471-1479.
- 17- J Szudek, H Joe, and JM Friedman. 2002. *Analysis of Intrafamilial Phenotypic Variation in Neurofibromatosis 1 (NF₁)*. Genetic Epidemiology 23:150-164.

- 18- Jones AC, Sampson JR, Hoogendoorn B, Cohen D, Cheadle JP. 2000. *Application and evaluation of denaturing HPLC for molecular genetic analysis in tuberous sclerosis*. Hum Genet 106:663-668.
- 19- Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Shannon N, Robertson M, White R, Viskochil D. 1995. *Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1)*. Genomics 25:9-18.
- 20- National Institutes of Health Development Consensus Conference. 1988. *Neurofibromatosis conference statement*. Arch Neurol 45:575-578.
- 21- O' Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P. 1988. *Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection*. Genomics 52:44-49.
- 22- Rasmussen SA, Friedman JM. 2000. *NF1 gene and neurofibromatosis*. Am J Epidemiol 151:33-40.
- 23- Rosser T, Packer RJ. 2002. *Intracranial neoplasms in children with neurofibromatosis type 1*. J Child Neurol 17:630-637.
- 24- Ruggieri M. 1999. *The different forms of neurofibromatosis*. Child's Nerv Syst 15:295-308.
- 25- Thomson SAM, Fishbein L, Wallace MR. 2002. *NF1 mutations and molecular testing*. J Child Neurol 17:555-561.
- 26- Upadhyaya M, Osborn MJ, Maynard j, Kim MR, Tamanoi F, Cooper D.N. 1997. *Mutational and functional analysis of the neurofibromatosis type1 (NF1) gene*. Hum Genet 99:88-92.
- 27- Upadhyaya M, Cooper DN. *Neurofibromatosis 1 from genotype to phenotype*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1998.
- 28- Xiao W, Oefner P, 2001. *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review*. Hum Genet 17:439-474.

7- RINGRAZIAMENTI

Per la realizzazione di questo lavoro, che è il sunto di 4 anni di studio e di ricerche, desidero ringraziare alcune persone che, oltre ad avermi offerto il necessario aiuto per renderlo possibile, mi hanno sostenuto fattivamente anche nei momenti di difficoltà.

Il Prof. Roberto Testi, per la disponibilità e la professionalità mostrata in tutte le fasi del progetto; con la sua collaborazione, le sue indicazioni argomentate e le sue scelte mirate ha reso ancor più degno di attenzione il lavoro svolto.

Il Prof Aldo Quattrone, per aver reso possibile la realizzazione pratica di questo lavoro, grazie alla sua disponibilità e all'ospitalità resa nell'eccellente centro da Lui diretto.

Ringrazio il Prof. Aldo Brancati, mio mentore nel percorso di alta formazione post-laurea: uomo di innata saggezza e lungimiranza che, con i suoi inappuntabili consigli, ha dato quel valore aggiunto che ognuno di noi vorrebbe nel suo escursus lavorativo e costruttivo.

Un ringraziamento va altresì alla d.ssa Mariella Muglia e al gruppo delle mie colleghe da Lei diretto presso il CNR ISSN di Pianolago –

Mangone (CS) con particolare riguardo alla D.ssa Annalia Gabriele con la quale ho lavorato a più stretto contatto in questi anni di permanenza nella struttura.

Infine un ringraziamento particolare al Dr. Augusto Calabrò, per il suo insostituibile sostegno in tutti questi anni di lavoro.

In memoria di Emma Buccieri e di Rodolfo Calabrò.