

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Medicina dello Sviluppo e Scienze della  
Programmazione  
INDIRIZZO: Ematocologia, Immunologia e Genetica  
CICLO XXV

**Utilizzo di minigeni ibridi per la validazione di mutazioni di splicing.**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Supervisore :** Dott. Leonardo Salviati

**Dottorando :** Gianpietro Giorgi



<b>ABSTRACT</b>	7
<b>1.INTRODUZIONE</b>	9
1.1 Analisi mutazionale e interpretazione varianti da genomico	9
1.2 Classificazione delle varianti genomiche	9
1.3 Splicing: significato biologico	10
1.3.1 Geni degli organismi eucarioti	10
1.3.2 Fasi dello splicing	11
1.3.3 Elementi di regolazione dello splicing	13
1.3.4 Mutazioni di splicing	14
1.4 L'RNA come metodo di elezione per determinare l'effetto di mutazioni di splicing	17
1.5 Affidabilità dei software di predizione di splicing	17
1.6 Minigeni ibridi	18
1.7 Metodica Gateway	18
1.8 Geni oggetto di analisi mutazionale	20
1.8.1 La fibrosi cistica	20
1.8.1.1 Basi genetiche della fibrosi cistica	20
1.8.1.2 Mutazioni del gene <i>CFTR</i>	21
1.8.2 ASL (arginosuccinato liasi)	22
1.8.3 STK11	22
1.8.3.1 Sindrome Peutz-Jeghers	23
1.8.4 Gene COQ6	23
1.8.4.1 Deficit di Coenzima Q 10	24
1.8.5 NF1	25
1.8.5.1 Mutazioni di NF1	26
1.8.6 Gene AIP	28
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	29
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	31
3.1 Clonaggio frammento AIP c.144 G>A in minigene pEGFP-N1-COQ2-ASL5-6-7	31
3.2 Trasfezione cellule HeLa	31

3.3 Estrazione RNA da colture cellulari	32
3.4 Retrotrascrizione a cDNA	33
3.5 PCR da retro trascrizione	33
3.6 Amplificazione gene $\alpha$ -globina	33
3.7 Clonaggio del gene $\alpha$ -globina nel vettore di espressione cellulare	34
3.8 Screening colonie batteri per l' inserto $\alpha$ -globina	34
3.9 Sequenziamento colonie con $\alpha$ -globina orientata in modo corretto	35
3.10 Analisi degli elettroferogrammi di sequenziamento	35
3.11 Clonaggio cassetta Gateway in Minigene $\alpha$ -globina	35
3.12 Trasformazione minigene $\alpha$ -globina con cassetta Gateway e sequenziamento	36
3.13 Formazione del minigene $\beta$ -globina	37
3.14 Clonaggio cassetta di ricombinazione Gateway in Minigene $\beta$ -globina	37
3.15 Screening colonie per individuare il corretto orientamento della cassetta Gateway	38
3.16 Amplificazione mediante PCR da genomico dei pazienti interessati allo studio di mutazione	39
3.17 Clonaggio del frammento di DNA di interesse nel vettore pcr8TOPO TA	40
3.18 Screening batteri per osservare la presenza dell' inserto da pcr8TOPO TA	40
3.19 Screening colonie con inserto orientato nel modo corretto e sequenziamento	41
3.20 Reazione di LR clonasi tra minigene $\beta$ -globina Gateway e pcr8TOPO TA con inserto	41
3.21 Amplificazione mediante PCR da retro trascrizione	41
3.22 Clonaggio mutazione COQ6 IVS1+11 C>T in minigene COQ2ex 1+ASL ex5-6-7	42
<b>4. RISULTATI</b>	<b>45</b>
4.1 Studio della mutazione c.144 G>A sul gene <i>AIP</i>	45
4.2 Formazione del minigene $\alpha$ -globina Gateway	47
4.3 Formazione del minigene $\beta$ -globina Gateway	48
4.4 Analisi della mutazione ASL c.1062 G>A	49
4.5 Analisi della mutazione STK11 c.291-1 G>A	50
4.6 Analisi sistematica di una serie di mutazioni in geni specifici	52
4.6.1 Studio di mutazioni in NF1	52
4.6.1.1 Analisi della mutazione NF1 IVS 20+1 G>A	52
4.6.1.2 Analisi della mutazione NF1 IVS 10b+1 delGTAA	53

4.6.1.3 Analisi della mutazione NF1 IVS 8+2 T>G	54
4.6.1.4 Analisi della mutazione NF1 IVS 20+3 G>T	55
4.6.1.5 Analisi della mutazione NF1 IVS 9a-19 G>A	56
4.6.1.6 Analisi della mutazione NF1 IVS 14+2 insT	57
4.6.1.7 Analisi della mutazione NF1 IVS 21-1 G>A	58
4.6.2 Studio di mutazioni in <i>CFTR</i>	61
4.6.2.1 Analisi della mutazione CFTR c.274-6 T>C	61
4.6.2.2 Analisi della mutazione CFTR c.2752 - 26 A>G	62
4.6.2.3 Analisi della mutazione CFTR c.876 - 6 T>G	63
4.6.2.4 Analisi della mutazione CFTR c.3468 + 51 C>A	64
4.6.2.5 Analisi della mutazione CFTR c.1249-64 G>A	65
4.7 Studio di mutazione in esone 1	66
4.7.1 Analisi della mutazione COQ 6 IVS 1 +11 C>T	66
4.8 Formazione del minigene $\beta$ -globina Gateway Esone 1	67
4.8.1 Studio della mutazione COQ6 IVS 1 +11 C>T con minigene $\beta$ -globina Gateway Esone 1	67
<b>5. DISCUSSIONE</b>	69
<b>6. CONCLUSIONI</b>	73
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	75
<b>8. PUBBLICAZIONI</b>	83



## ABSTRACT

L'interpretazione di numerose varianti di sequenza di significato biologico e clinico sconosciuto (UV) trovate in screening di popolazione o pazienti rappresenta una sfida nella diagnosi molecolare delle malattie genetiche, inclusa la predisposizione al cancro. Una parte di UV potrebbe avere effetto deleterio perchè possono interessare lo splicing dell'mRNA. L'approccio diretto per determinare se la malattia è associata alle mutazioni di splicing è attuare un'analisi dell'mRNA dei tessuti dei pazienti affetti dalla patologia tramite retrotrascrizione (RT-PCR). Tuttavia, i campioni di tessuto non sono sempre disponibili perchè l'espressione di questi geni possono essere tessuto-specifica (per esempio in cervello o cuore) o i pazienti sono troppo lontani dal laboratorio di analisi. Un approccio alternativo è testare la mutazione di splicing con l'uso dei minigeni. Qui, descriviamo un metodo funzionale di studio di splicing basato sull'utilizzo di minigeni che valutano l'impatto sullo splicing di varianti di sequenza. Un segmento genomico che comprende la variante di splicing di interesse comprese le zone introniche fiancheggianti, amplificata dal paziente mediante PCR è clonata nel minigene. Dopo una trasfezione transiente in culture cellulari umane, il pattern dei trascritti generati dal wild-type e dal mutato sono confrontati mediante PCR da retrotrascrizione e successivo sequenziamento. Con l'utilizzo di minigeni classici è possibile incontrare delle difficoltà in quanto si possono trovare ostacoli nel clonaggio del frammento che contiene la mutazione nel minigene. Molte volte il frammento di DNA contiene dei siti di restrizione incompatibili con quelli del minigene, o la reazione di ligazione può essere complicata data la grandezza dell'inserito. Per superare questi problemi abbiamo clonato una cassetta Gateway per permettere un veloce e facile clonaggio. Con questo metodo abbiamo testato 16 mutazioni in differenti geni (*NF1*, *CFTR*, *AIP*, *COQ6*, *STK11*) con risultati conclusivi.

---

The interpretation of the numerous sequence variants of unknown biological and clinical significance (UV for “unclassified variant”) found in genetic screenings or patients represents a major challenge in the molecular diagnosis of genetic disease, including cancer susceptibility. A fraction of UVs may be deleterious because they affect mRNA splicing. The most direct approach to determine whether disease-causing mutations are associated with splicing is to perform a reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis on RNA from the relevant tissues of affected individuals. However, tissue samples are often not available because the expression of these genes are tissue specific (for example only in brain or heart)

or patients are too far from laboratory. An alternative approach is to test the effects of the splicing mutations using minigenes. Here, we describe a functional splicing assay based on a minigene construct that assesses the impact of sequence variants on splicing. A genomic segment encompassing the variant sequence of interest along with flanking intronic sequences is PCR-amplified from patients genomic DNA and is cloned into a minigene vector. After transient transfection into cultured cells, the splicing patterns of the transcripts generated from the wild-type and from the mutated constructs are compared by reverse transcription-PCR analysis and sequencing. With classical minigenes is possible have difficulties to test mutations because is difficult clone the fragment that contains this mutation in the minigene. Many times the DNA fragment containing restriction sites incompatible with restriction sites of minigene, or the ligation reaction between the fragment and minigene is hardly for the size of the fragment. For bypass this problem we cloned a Gateway cassette that allow fast and easy cloning. Whit this assay we tested 16 various splicing mutation in different genes (*NFI*, *CFTR*, *AIP*, *COQ6*, *STK11*) with conclusive results.



## 1.INTRODUZIONE

### 1.1 Analisi mutazionale e interpretazione varianti da genomico

La ricerca di mutazioni nel DNA genomico di pazienti affetti da malattie genetiche ha acquisito sempre maggior importanza negli ultimi anni. Esistono molte tecniche utilizzate in diagnostica per analizzare la sequenza genomica di pazienti al fine di identificare l'alterazione specifica alla base delle diverse patologie genetiche. Con l' enorme avanzamento tecnologico in ambito diagnostico ci si trova di fronte a molte varianti non riportate in letteratura. L'importanza di una corretta interpretazione è essenziale sia per la corretta diagnosi del paziente e sia per calcolare l' eventuale rischio di ricorrenza per i pazienti o i loro familiari. Il problema si presenta ancora più amplificato quando si passa dallo studio di pazienti affetti da specifiche patologie agli screening di popolazione per identificare i portatori sani. In questo caso infatti ci troviamo molto spesso di fronte ad un gran numero di varianti non patologiche che necessitano di una corretta interpretazione.

### 1.2 Classificazione delle varianti genomiche

Le varianti genomiche possono classificarsi in base a dove sono situate nella struttura del gene:

- Mutazione nel promotore: questo tipo di mutazioni possono avere effetto sulla quantità del prodotto proteico, con maggiore o minore efficienza di trascrizione.
- Mutazioni sugli introni: queste mutazioni possono avere effetto sullo splicing con ritenzione di introni o rimozione di esoni.
- Mutazioni in 5' o 3' UTR: le mutazioni a questo livello possono avere effetto sulla velocità di traduzione proteica e possibile alterazione delle sequenze di poliadenilazione con possibili conseguenze sulla stabilità del mRNA o sulla sua localizzazione.
- Mutazioni di splicing: sono un insieme di mutazioni che coinvolgono sequenze importanti per lo splicing del pre-mRNA. Causano una non corretta maturazione dell' RNA.

### 1.3 Splicing: significato biologico

Il termine SPLICING (in italiano “saldatura”) indica uno dei processi che insieme alla poliadenilazione e al capping sono alla base della maturazione dei trascritti primari. Il macchinario adibito alla sintesi proteica cellulare è in grado di tradurre solo gli RNA messaggeri che contengono elementi continui di codoni (triplette di nucleotidi che codificano per un amminoacido) e non ha modo di identificare e evitare un blocco di sequenze non codificanti. Per questo motivo i trascritti primari dei geni non devono contenere sequenze introniche al fine di evitare un’ errata traduzione proteica. Lo splicing ha appunto la funzione di eliminare le sequenze introniche dal pre-mRNA. Questo processo converte il pre-mRNA in un RNA messaggero maturo che deve essere molto preciso in quanto l’ aggiunta o perdita anche di un solo nucleotide nei punti dove vengono uniti gli esoni avrebbe conseguenze catastrofiche.

#### 1.3.1 Geni degli organismi eucarioti

La maggior parte degli geni eucarioti sono formati da regioni codificanti (esoni) alternate da regioni non codificanti (introni) che devono essere eliminate dal trascritto per consentire la corretta traduzione e sintesi della proteina.

Con il termine **spliceosoma** si identifica quell'insieme di proteine ed RNA che catalizzano il processo di splicing. Chimicamente lo splicing avviene tramite due successive reazioni di trans-esterificazione, grazie alle quali legami fosfodiesterici sul pre-mRNA vengono rotti e ne vengono formati di nuovi. Le dimensioni dello spliceosoma sono simili a quelle di un ribosoma ed è composto da circa 150 proteine e 5 RNA. Sono proprio questi ultimi a riconoscere, con molta probabilità, le sequenze ai confini introne-esone e a partecipare alla catalisi della reazione. Per la reazione vengono idrolizzate diverse molecole di ATP. I cinque RNA che formano lo spliceosoma sono identificati con U1, U2, U4, U5, U6 e sono chiamati “piccoli RNA nucleari” (snRNA o small nuclear RNA). Ognuno di essi si complessa con diverse proteine dello spliceosoma formando dei complessi chiamati snRNP (small nuclear ribonuclear protein). La composizione dello spliceosoma varia a seconda dei passaggi della reazione: snRNP diverse entrano ed escono dalla reazione in momenti diversi, ed ognuna ha una sua funzione particolare. Le snRNP rivestono tre ruoli nello splicing:

1. Riconoscono il sito di splicing 5' e il punto di ramificazione (branch site),

2. Riportano questi siti vicini quando occorre,
3. Catalizzano il taglio e la giunzione dell'RNA.

Per tali funzioni sono essenziali le interazioni RNA-RNA, proteina-RNA e proteina-proteina.

### 1.3.2 Fasi dello splicing

Il confine tra esone e introne o meglio il limite all'estremità 5' dell'introne è detto **sito di splicing al 5'**. Il confine introne-esone all'estremità 3' è detto **sito di splicing al 3'**. Questi ultimi vengono chiamati rispettivamente **sito donatore** e **sito accettore**. Per il meccanismo di splicing è necessaria un'altra sequenza che è chiamata punto di ramificazione (**branch point site**); quest'ultima si trova all'interno dell'introne, di solito vicino alla sua estremità 3', ed è seguita da un segmento di polipirimidine (Py tract). Le sequenze più conservate sono GU al sito di splicing 5' e AG al sito di splicing 3'; infine vi è la A, che rappresenta branch site.

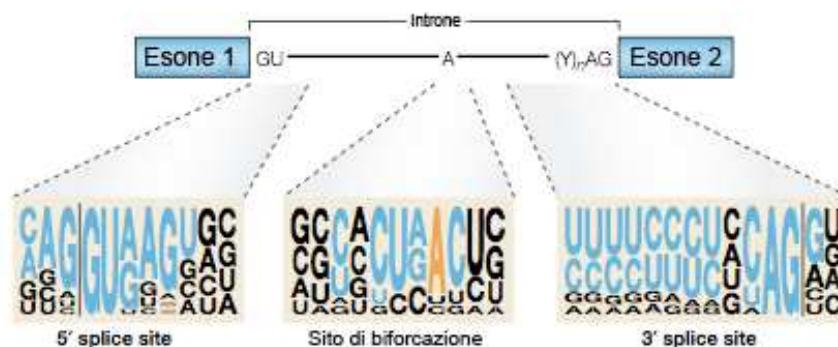


Fig.1. Schema dei siti di splicing

Inizialmente, il sito di splicing 5' viene riconosciuto dalla snRNP U1. Una delle subunità di U2AF si lega al segmento polipirimidinico, mentre l'altra si lega al sito di splicing 3'. La prima subunità interagisce con BBP (Branch Binding Protein) e aiuta questa proteina a legarsi al branch site. Questo arrangiamento di proteine e RNA è chiamato **complesso precoce E**. A questo punto, la snRNP U2 si lega al branch site, con l'aiuto di U2AF, e spiazza BBP. Questo arrangiamento è chiamato **complesso A**. L'appaiamento di basi tra l'snRNA U2 e il branch site è strutturato in modo tale che il residuo A del branch site venga spinto fuori dal segmento risultante a doppia elica di RNA e formi una protuberanza a singolo nucleotide. Questa A diventa così non accoppiata e disponibile per la reazione con il sito di splicing 5'. La fase successiva è il riarrangiamento del complesso A per l'avvicinamento di tutti e tre i siti di splicing. Questo avviene in una serie di fasi: le snRNP U4 e U6, assieme alla snRNP U5, si

uniscono al complesso. Queste tre snRNP assieme sono dette tripla snRNP U4\U6\*U5, in cui le snRNP U4 e U6 sono tenute assieme dall'accoppiamento complementare delle basi dei loro corrispettivi snRNA, mentre la snRNP U5 è legata in maniera più lassa attraverso interazioni proteina-proteina. Con l'ingresso della tripla snRNP U4\U6\*U5 il complesso A diventa **complesso B**. Nel passaggio successivo, U1 lascia il complesso e U6 lo rimpiazza al sito di splicing 5'. Questo richiede che l'appaiamento tra l'snRNP U1 e il pre-mRNA venga rotto per permettere all'RNA U6 di riappaiarsi nella stessa regione. Questi passaggi completano l'assemblaggio. Il riarrangiamento successivo innesca la catalisi ed avviene nel modo che segue: U4 viene rilasciato dal complesso permettendo ad U6 di interagire con U2. Questo arrangiamento, chiamato **complesso C**, produce il sito attivo. In altre parole il riarrangiamento avvicina all'interno dello spliceosoma quei componenti che assieme formano il sito attivo. Questo stesso riarrangiamento assicura che l'RNA substrato sia posizionato correttamente. Il fatto che la formazione del sito attivo sia successiva al completamento dell'assemblaggio dello spliceosoma rende il sito attivo disponibile solo nei siti di splicing corretto. La formazione del sito attivo mette in prossimità il sito di splicing 5' del pre-mRNA e il punto di ramificazione, facilitando la prima reazione di transesterificazione. La seconda reazione, tra i siti di splicing 5' e 3', è supportata dalla snRNP U5, che aiuta ad avvicinare i due esoni. Il passaggio finale implica il rilascio dell'mRNA e delle snRNP. Queste sono prima legate al cappio formatosi, ma vengono rilasciate in seguito alla rapida degradazione di questo frammento di RNA (Black et al, 2003).

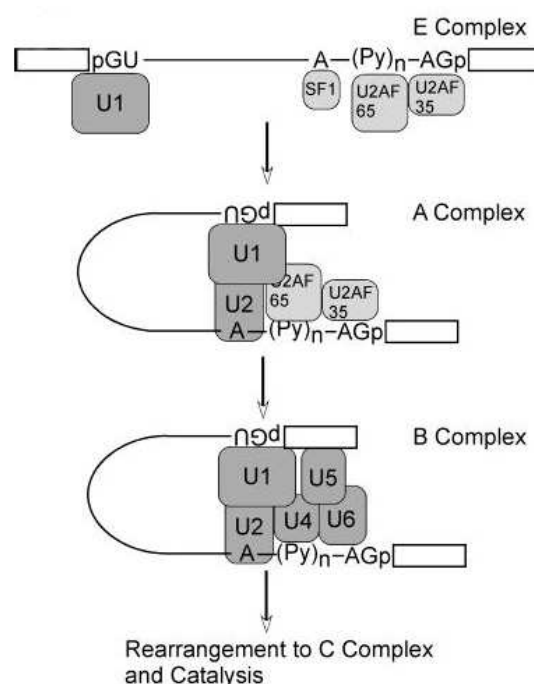
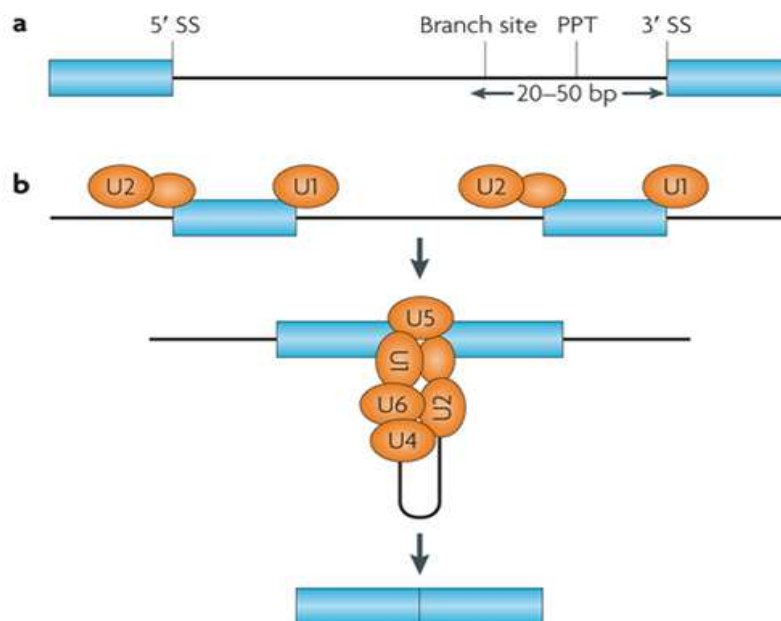


Fig.2. Schematizzazione delle fasi dello splicing (Black et al, 2003).



**Fig.3. Elementi attivi nello splicing.** **a)** I quattro segnali conservati che permettono il riconoscimento di RNA dal spliceosoma sono: giunzione esone-introne al 5' e 3' (SS 5' sito di splice (5' SS) e 3'), la sequenza branch site situata a monte del 3' SS e il tratto polypyrimidine (PPT) è situato tra il 3' SS e il branch site. **b)** la regolazione dello splicing può avvenire a livello del riconoscimento del splice-site da parte dello spliceosoma attraverso la facilitazione o interferenza del legame di U1 e U2 snRNPs allo splice-site. Gli esoni costitutivi sono mostrati in blu, e gli introni sono rappresentati da linee continue.

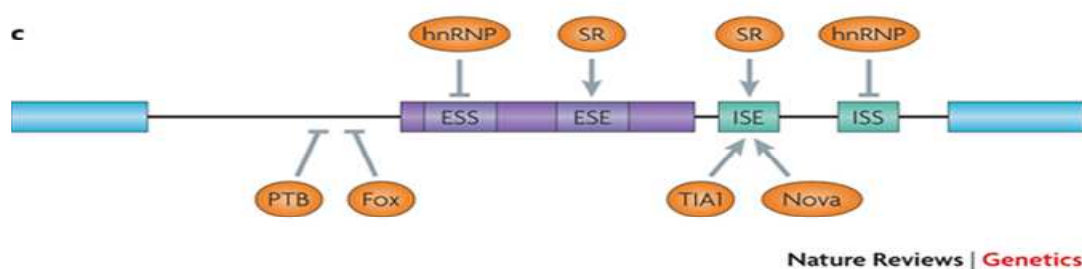
### 1.3.3 Elementi di regolazione dello splicing

Lo splicing è regolato da proteine che riconoscono sequenze specifiche e possono trovarsi sia negli introni che negli esoni. Le sequenze che permettono il riconoscimento dei siti di splicing sono chiamate exonic o intronic splicing enhancers (**ESE** o **ISE**) a seconda della loro localizzazione su esoni o introni, mentre le sequenze che mascherano tali siti sono chiamate exonic o intronic splicing silencers (**ESS** o **ISS**). Nella maggior parte dei casi le sequenze enhancer sono riconosciute da proteine della famiglia SR, mentre le sequenze silencer vengono riconosciute da proteine hnRNP. Gli eventi di splicing alternativo sono dovuti alla differente capacità delle proteine di legare queste sequenze. Questa capacità definisce anche la "forza" di riconoscimento di un sito di splicing. La selezione di un determinato sito di splicing (e quindi la possibilità di splicing alternativo) dipende non solo dalla presenza di ESE, ISE, ESS e ISS nella sequenza ma anche dalla disponibilità delle proteine che le legano. Una classe di proteine molto importanti è quella delle **proteine SR**; queste sono ricche in arginina e lisina e sono implicate nei processi di selezione dei siti di splicing sugli mRNA eucariotici. Queste proteine hanno due domini: un dominio RS ricco in arginina e serina; l'altro (RRM ossia RNA-recognition motif) è implicato nel riconoscimento dell'RNA. Il dominio RS è soggetto alla fosforilazione della serina che sembra essere responsabile del reclutamento di altre

proteine che controllano lo splicing. Il dominio RRM invece, sembra essere implicato nel riconoscimento di specifiche sequenze sull'mRNA che sono localizzate nell'esone.

Si calcola che ogni gene umano produca, in media, 4 proteine diverse. Questo meccanismo di splicing alternativo spiega in parte perché negli organismi superiori non ci sia un rapporto lineare tra numero di geni e complessità dell'organismo.

Eventi di splicing alternativo sembrano essere coinvolti nella variabilità genetica (anche tra individui della stessa specie) e nell'evoluzione (Keren et al, 2010).



**Fig.4. Elementi regolatori dello splicing.** c) esoni e introni contengono brevi sequenze per il riconoscimento dei siti di legame per le proteine ausiliarie. Questi siti sono chiamati exonic splicing enhancers (ESE), intronic splicing enhancers (ISE), exonic splicing silencers (ESS) e intronic silencing silencers (ISS). Il riconoscimento del sito di splicing è mediato da proteine che legano specifiche sequenze regolatrici, come le serina / arginina (SR), heterogenous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), polypyrimidine tract-binding (PTB), l'RNA-binding TIA1 , proteine Fox , proteine, e Nova e altre. Gli esoni costitutivi sono mostrati in blu, le regioni splicing alternativo in viola, e gli introni sono rappresentati da linee continue.

### 1.3.4 Mutazioni di splicing

Questa classe di mutazioni può essere suddivisa in varie tipologie. Una prima tipologia coinvolge il sito donatore di splicing (GT) o il sito accettore (di norma AG). Questi siti sono i siti canonici di splicing e mutazioni a questo livello causano con grande probabilità un errato splicing. Una seconda tipologia coinvolge brevi sequenze consenso a monte e a valle del sito donatore e del sito accettore, oppure una sequenza consenso del sito di biforcazione (branch-site). Una terza tipologia coinvolge mutazioni in una sequenza ESE o ESS e può essere ascritta anche alle mutazioni silenti. Infine un'ultima tipologia coinvolge mutazioni che creano nuove sequenze consenso all'interno di un introne.

Queste tipologie possono avere varie conseguenze:

- **ritenzione dell'introne:** dovuta alla completa assenza di splicing. Questo può avvenire se l'introne in questione è piccolo e la sequenza vicina è priva di siti di splicing criptici o nascosti (sequenze simili alle sequenze consenso per i siti di splicing, ma che normalmente non vengono riconosciute dall'apparato di splicing). Lo splicing è indispensabile affinché si

producano molecole di mRNA esportabili dal nucleo. Pertanto la ritenzione di sequenze introniche nell'mRNA di solito implica che l'mRNA venga trattenuto e non venga tradotto, evitando così la possibile introduzione di amminoacidi aggiuntivi o uno slittamento del modulo di lettura.

- Esclusione di esoni: la mutazione di una sequenza donatrice di splicing ha come risultato l'omissione dell'esone a monte, mentre la mutazione della sequenza accettrice di splicing ha come risultato l'omissione dell'esone a valle (Strachan T, III ed.). Vi sono anche altre possibilità, tra cui l'attivazione di siti criptici di splicing, esonici o intronici, i cui effetti non sono facilmente prevedibili (e che possono coesistere). Quando viene omesso un esone, sono possibili diverse conseguenze: se il numero di nucleotidi nell'esone non è divisibile per tre, uno slittamento del modulo di lettura potrà introdurre un codone di terminazione prematura, che ha come conseguenza la formazione di un trascritto di RNA instabile e quindi l'assenza del polipeptide corrispondente. Se l'esclusione dell'esone non determina uno slittamento del modulo di lettura, ma la perdita in frame di triplette nucleotidiche, l'assenza di uno o più amminoacidi normalmente codificanti può dare origine a un polipeptide non funzionale o comunque anomalo, a seconda dell'importanza di tali amminoacidi per la struttura e/o funzione della proteina. (Cartegni et al., 2002)

Le mutazioni che colpiscono sequenze che normalmente non sono importanti per lo splicing comprendono l'attivazione di siti criptici (o latenti) di splicing, chiamati così perchè somigliano alle sequenze dei veri siti di splicing, ma di solito non vengono utilizzati, si parla in questo caso di **attivazione diretta**; oppure nel caso avvenga una mutazione in un sito di splicing canonico, danneggiando così un sito donatore o accettore di splicing, l'apparato dello splicing va a cercare eventuali altri siti e seleziona un sito criptico di splicing, si parla quindi di **attivazione indiretta**.

Se l'mRNA alterato viene tradotto, l'uso di un sito di splicing nascosto dentro un introne potrà introdurre nuovi amminoacidi, mentre l'utilizzo di un sito di splicing nascosto in un esone potrà comportare la perdita di DNA codificante. E' quindi necessario fare particolare attenzione al fatto che anche mutazioni apparentemente silenti possono risultare patogene e, in alcuni casi, mutazioni che si verificano dentro gli esoni, ma non in siti criptici di splicing, possono indurre exon skipping.

Tipi differenti di mutazioni possono indurre un codone di terminazione prematuro. In particolare le mutazioni nonsense generano un codone di stop prematuro sostituendo un

codone codificante per un aminoacido con un codone di stop. Un codone di terminazione prematuro può, inoltre, essere introdotto a causa di mutazioni a livello dei siti di splicing, ad esempio, mediante perdita di un esone che contenga un numero di nucleotidi non divisibile per 3 alterando di conseguenza il reading frame. Queste mutazioni che provocano l'interruzione della catena polipeptidica hanno diverse possibili conseguenze sull'espressione genica:

- Instabilità dell'mRNA: questa di gran lunga è la conseguenza più frequente. In vivo, un mRNA con un codone di stop posizionato almeno 50 nucleotidi a monte dell'ultima giunzione di splicing di solito viene degradato rapidamente attraverso una forma di controllo dell'RNA nota come NMD (nonsense-mediated mRNA decay). Questo tipo di verifica permette di evitare conseguenze letali derivanti dalla produzione di un polipeptide tronco che potrebbe interferire con le funzioni vitali della cellula;
- Formazione di un polipeptide tronco: La NMD garantisce che in vivo i polipeptidi troncati siano molto rari, ma dipende dal processo di splicing. Mutazioni nonsense a carico dei geni umani privi di introni (circa 5%) possono produrre polipeptidi troncati. L'effetto di questi polipeptidi può essere difficile da prevedere e dipende, tra le varie cose, dall'estensione della parte perduta, dalla stabilità del prodotto polipeptidico e dalla sua capacità di interferire con l'espressione degli alleli normali;
- Esclusione di esoni: per un piccolo gruppo di mutazioni nonsense, gli effetti potenzialmente dannosi sull'espressione genica possono essere mitigati da un processo chiamato NAS (nonsense-associated altered splicing) in cui viene alterato il normale schema di splicing. L'esistenza del NAS è stata quindi interpretata come un meccanismo di traduzione nucleare che consente ai codoni di essere letti prima che l'mRNA venga esportato nel citoplasma. Ad ogni modo, una spiegazione alternativa per la quasi totalità dei casi di NAS è che la mutazione nonsense alteri un ESE (una regione enhancer dello splicing).



#### **1.4 L'RNA come metodo di elezione per determinare l'effetto di mutazioni di splicing**

Il metodo migliore per studiare le mutazioni di splicing è l'analisi genetica dell' RNA del paziente affetto da tale mutazione. Tuttavia l'analisi dell'RNA presenta alcune problematiche sia tecnico/logistiche che basilari.

Molti geni sono espressi solo in determinati tessuti e ciò ne rende complicata, ed in alcuni casi pressoché impossibile l' analisi (si pensi a tutti i geni espressi esclusivamente nel cervello). Inoltre, in caso di mutazioni in eterozigosi la presenza dell'allele wild-type può interferire con l'analisi soprattutto in caso di alleli ipomorfi (cioè che presentano una quota residua di splicing corretto (Forzan M et al, 2010).

I problemi tecnico/logistici si possono individuare sia nei tempi e sia nella conservazione del campione oggetto di esame. Il materiale biologico del paziente deve pervenire al laboratorio in tempi brevi (1-2 ore) e con le dovute condizioni di conservazione. Infatti la cattiva conservazione del campione di sangue può non solo causare la degradazione dell'RNA, ma anche favorire la comparsa di splicing illegittimi che complicano notevolmente l'analisi rendendola di fatto impossibile (Messiaen LM et al., 2000). Il processo di estrazione dell'RNA è in generale più delicato e complesso rispetto al DNA ed una volta estratto, l'RNA deve essere stoccato a -80°C. Durante l'estrazione e la manipolazione dell'RNA è necessario ridurre al minimo il rischio di contaminazione da RNAsi, bisogna quindi adibire attrezzature da laboratorio, come cappe aspiranti, materiale plastico RNAsi free e micropipette, ad uso esclusivo per l'analisi di RNA. Per alcune mutazioni troncanti il processo di NMD può rendere difficoltosa l'analisi perché il trascritto viene degradato. Per tali motivi molti laboratori preferiscono eseguire l'analisi su DNA genomico.

#### **1.5 Affidabilità dei software di predizione di splicing**

Il susseguirsi della scoperta di nuove mutazioni a livello dei siti di splicing ha prodotto la necessità di creare dei software con lo scopo di predire in silico la presenza di siti donatori/accettori di splicing.

Inizialmente la creazione di questi software è servita discriminare a livello del DNA genomico la presenza degli esoni ed introni dando quindi l' individuazione degli elementi trascritti o meno di un gene (Guigó R et al, 1992, Vignal L. et al,1996). Successivamente questi programmi sono stati utilizzati per osservare se mutazioni a livello dei siti di splicing potessero essere o meno influenti sulla suddivisione tra introni ed esoni.

Il funzionamento di questi programmi si basa su degli algoritmi con un livello di affidabilità non ottimale in quanto le conoscenze sul meccanismo di splicing non sono ancora complete.

Le mutazioni di splicing a carico di sequenze molto conservate come il sito donatore ed accettore di splicing ,GT e AG, e il branch site sono quelle più comuni e più facili da interpretare. Al contrario altre mutazioni che alterano nucleotidi meno conservati sono più difficili da definire. (Caceres JF et al, 2002, Pagani F et al, 2004).

Tali mutazioni possono interessare nucleotidi vicini alle estremità o essere localizzate in mezzo all'introne (deep intronic mutations). Tali sostituzioni nucleotidiche possono abolire un sito canonico, attivare un "sito criptico" di splicing, o andare ad interferire con elementi regolatori come il branch site, ISE ISS.

Anche mutazioni nelle regioni esoniche del gene possono causare alterazioni dello splicing in quanto possono alterare un ESE (come nel caso di SMN2, Cartegni L et al, 2002) o generare o attivare un sito criptico di splicing provocando profonde modificazioni del trascritto.

E' da segnalare che in questi casi l'effetto può non essere tutto o nulla ed una quota di trascritto normale può comunque formarsi (Sun H et al, 2000; Pagani F et al., 2003; Cartegni L et al., 2002).

Tuttavia, non è semplice attribuire a priori un significato funzionale a queste mutazioni, se non attraverso l'analisi diretta del trascritto, in quanto i modelli bioinformatica di previsione dei siti di splicing non sono del tutto affidabili.

## **1.6 Minigeni ibridi**

I minigeni ibridi sono vettori di espressione eucariotica con all' interno un gene o parti di esso. In questo backbone vengono inseriti frammenti di geni riportanti presunte mutazioni di splicing riscontrate in pazienti o trovate mediante screening di popolazione. Sono un valido modello in vitro per osservare se la mutazione che affligge quella parte di DNA genomico possa o meno risultare come causa di un errato splicing del gene ibrido. L' utilizzo di questa metodica permette di dare un significato biologico alle mutazioni riscontrate approfondendone l' effetto sull' RNA.

## **1.7 Metodica Gateway**

Questa metodica consiste in una reazione di ricombinazione in vitro tra 2 plasmidi con determinate caratteristiche e permette lo scambio di materiale genetico tra essi. Il primo

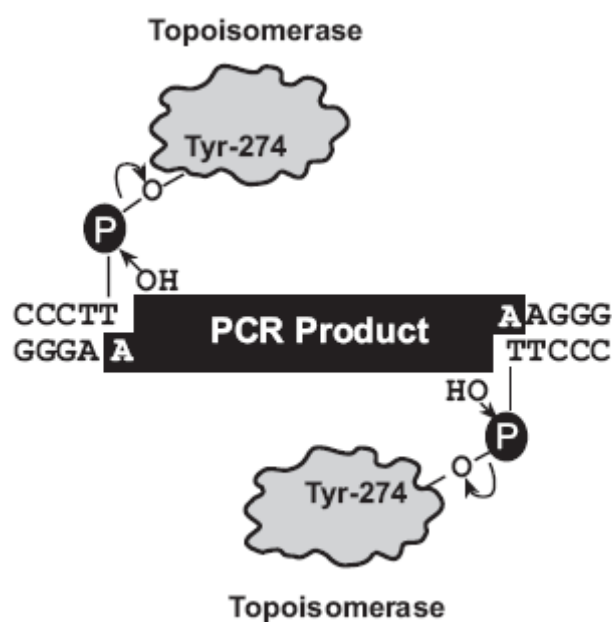
plasmide, detto entry vector, contiene delle sequenze denominate attL che vengono riconosciute dall' enzima LR clonase e scambia l' inserto compreso tra queste sequenze con quello compreso tra le sequenze attR del vettore chiamato destination vector. Andando nello specifico il nostro entry vector è il pcr8 TOPO TA con clonato il frammento di DNA genomico del paziente mentre il destination vector è il minigene  $\beta$ -globina Gateway. Attraverso una reazione direzionale e veloce avviene lo scambio di materiale genetico tra questi plasmidi permettendo un clonaggio veloce e sicuro (figura 4).



**Fig.4. Schema della reazione LR clonase tra il pcr8TOPO TA contenente l' inserto e il Minigene  $\beta$ -globina Gateway**

Tutti gli amplificati dal DNA dei pazienti affetti da queste mutazioni in eterozigosi vengono clonati attraverso la reazione TOPO TA. Questo tipo di clonaggio non necessita di siti di restrizione particolari e avviene attraverso l' utilizzo di un vettore commerciale.

Come si può osservare in figura 5 il clonaggio TOPO TA permette l' inserimento del frammento di PCR nel vettore grazie alla presenza della Topoisomerasi I del *Vaccinia* virus. Questa topoisomerasi lega il frammento di DNA a siti specifici del vettore e ne permette così un veloce clonaggio.



**Fig.5. Meccanismo di clonaggio TOPO TA**

## 1.8 Geni oggetto di analisi mutazionale

### 1.8.1 La fibrosi cistica

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica autosomica recessiva particolarmente frequente nella popolazione caucasica, con un'incidenza pari ad un caso ogni 2500-2700 nascite (Ratjen F, 2003).

Questa patologia si caratterizza per un' anomalia nel trasporto del cloro nella membrana delle cellule delle ghiandole a secrezione esocrina, colpendo prevalentemente l' epitelio delle vie respiratorie caratterizzato da secrezioni spesse e viscosi, con conseguente bassa clearance mucocigliare, aumento della risposta infiammatoria e con infezioni batteriche croniche con *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacia* tra i principali patogeni.

Il processo infiammatorio cronico porta alla distruzione della matrice extracellulare a livello bronchiolare con formazione di bronchiectasie con conseguente aumento di ristagno di muco. Infine con il progredire della malattia si verifica l' insorgenza dell' insufficienza polmonare che è la maggior causa di morbilità e mortalità dei pazienti affetti da questa malattia. Il pancreas è colpito nell' 85% dei casi con ristagno di succhi gastrici nei dotti. La carenza di succhi gastrici nel canale intestinale porta ad un malassorbimento dei grassi e conseguentemente delle vitamine liposolubili, delle proteine e in piccola parte degli zuccheri. Con il passare del tempo, il pancreas, sempre più colpito secerne sempre minor quantità di insulina portando ad una forma di diabete di solito insulino-dipendente. Il 98% dei soggetti di sesso maschile è sterile mentre le donne possono avere figli ma la fertilità è comunque ridotta.

#### 1.8.1.1 Basi genetiche della fibrosi cistica

Il gene *CFTR*, identificato e clonato nel 1989, è situato sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q31) e si estende per circa 250 kb. E' costituito da 27 esoni per un totale di circa 6.1 Kb. Studi di RT-PCR mediante ibridazione *in situ* hanno dimostrato che il gene *CFTR* è espresso in tessuti epiteliali di vari organi come polmone, pancreas, ghiandole sudoripare, fegato, ghiandole parotidi, nonché a livello della placenta. Lo stesso tipo di studi condotti su feti umani, ha mostrato che il gene è espresso anche durante lo sviluppo fetale, specialmente nelle vie aeree dei polmoni (Pilewsky J et al, 1999).

Nessuna espressione è stata rilevata nel cervello, ghiandole surrenali, linee cellulari linfoblastiche e fibroblasti cutanei.

### 1.8.1.2 Mutazioni del gene *CFTR*

A tutt'oggi sono note più di un migliaio di mutazioni riguardanti il gene *CFTR*, alcune rare, suddivise in differenti gruppi in base al loro effetto diretto sul processamento e la funzionalità della proteina CFTR (Vankeerberghen A et al., 2002).

La classe I comprende mutazioni non senso, di splicing e di frameshift, con conseguente produzione di trascritti instabili e proteine aberranti che vengono rapidamente degradate o non sono funzionanti.

Le mutazioni di classe II, che risultano essere le più numerose e comprendono anche la mutazione più comune, la  $\Delta F508$ , sono associate ad una maturazione impropria della proteina. Queste proteine non assumono il corretto ripiegamento ("folding") e vengono ubiquinate e degradate prima di raggiungere la membrana plasmatica. Un difetto nella maturazione si osserva principalmente quando sono alterati amminoacidi nel dominio NBD1.

Le mutazioni di classe III riguardano difetti di binding con l'ATP a livello dei domini NBD, nonché difetti di fosforilazione a livello del dominio R, risultando in un'attività ridotta del canale.

Le mutazioni di classe IV riguardano amminoacidi localizzati nel poro del canale, e dunque proteine CFTR con ridotta attività di corrente. Queste mutazioni sono spesso associate con un quadro clinico più moderato.

Le mutazioni di classe V riguardano i siti di splicing; in questo caso una ridotta porzione dei trascritti può andare incontro a splicing corretto, producendo così una minore quantità di CFTR, sufficiente però a rendere il quadro clinico più lieve.

Le mutazioni di classe VI alterano invece l'attività regolatoria del CFTR nei confronti di altri canali ionici quali ENaC e ORCC.

In generale le mutazioni delle classi I, II e III sono le più comuni e, a differenza delle altre classi, sono associate a insufficienza pancreatica. Il 70% dei pazienti con fibrosi cistica presenta una mutazione appartenente alla seconda classe che porta alla delezione di tre nucleotidi codificanti per la fenilalanina in posizione 508 ( $\Delta F508$ ) della catena aminoacidica.

Per le mutazioni appartenenti alle prime tre classi, il livello di CFTR funzionale è generalmente inferiore al 1%.

Poiché livelli bassi di espressione del CFTR sono sufficienti affinché si abbia un fenotipo normale le mutazioni delle classi IV, V e VI determinano un fenotipo di severità ridotta (Pilewski et al, 1999).

### 1.8.2 ASL (arginosuccinato liasi)

L' aciduria arginosuccinica (ASAciduria) (Barbosa P et al,1991) è un disordine autosomico recessivo nel ciclo dell' urea causato da mutazioni del gene ASL (*hASL*) che codifica per l' arginosuccinasi liasi. Questo enzima è espresso in modo ubiquitario e catalizza la reazione reversibile da arginosuccinato a arginina e fumarato. L' ASL appartiene ad una superfamiglia di idrossilasi che include l' adenilosuccinato liasi e fumarasi che condividono la struttura omotetramerica e meccanismo catalitico simile.

L' ASL partecipa al ciclo dell' urea, e negli esseri umani è essenziale per la detossificazione dall' ammonio, dove in organismi inferiori è richiesto per la biosintesi di arginina.

L' ASAciduria è caratterizzata dall' accumulo di acido arginosuccinico (ASA) nel fluido corporeo e da una grave iperammoniemia.

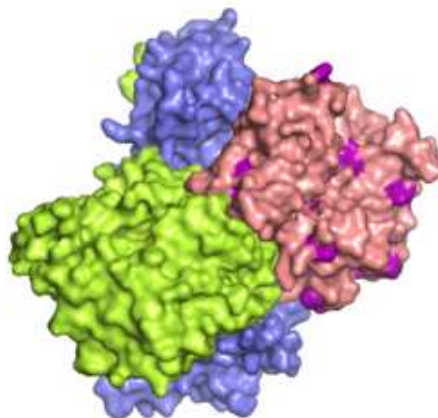
Questa patologia mostra un' eterogenicità clinica con due maggiori fenotipi clinici: l' insorgenza acuta/neonatale che presenta sintomi che rapidamente portano a coma, apnea e morte (Brusilov S et al,2001) e l'insorgenza subacuta/insorgenza tardiva che è diagnosticata in età infantile (Kleijer W et al,2002). Alcuni pazienti possono presentare semplicemente ritardo mentale e disordini epilettici. Entrambi i tipi di diagnosi sono stabiliti in modo certo mediante la misurazione dei livelli di ammonio nel plasma ( non sempre elevati nella forma ad insorgenza tardiva), ASA e le loro anidridi mediante un test per la misurazione della concentrazione di amminoacidi (Brusilov S et al, 2001). Sono state riportate ad oggi più di 40 mutazioni in questo gene con sostituzione aminoacidica e mutazioni troncanti che sono presenti in tutto il gene (Linnebank M et al, 2000) (Linnebank M et al, 2002).

### 1.8.3 STK11

Serina/treonina chinasi 11 (STK11) conosciuto anche come liver kinase B1 (LKB1) o renal carcinoma antigen NY-REN-19 è una protein chinasi che nell' uomo è codificata dal gene *STK11* (Jenne DE et al, 1998).

Il gene *STK11* trascrive per la formazione di un enzima chiamato serina / treonina chinasi 11. Questo enzima è un soppressore tumorale, il che significa che aiuta a mantenere la crescita cellulare impedendo una divisione troppo veloce o in modo incontrollato. Oltre al suo ruolo nella regolazione della divisione cellulare, questo enzima aiuta alcuni tipi di cellule al corretto orientamento all'interno tessuti (polarizzazione) e consente di determinare la quantità di energia utilizzata (Forcet C et al, 2005). Questa chinasi promuove anche un tipo di morte

cellulare programmata nota come apoptosi. Attraverso una combinazione di questi meccanismi, STK11 aiuta nella prevenzione dei tumori, in particolare nel tratto gastrointestinale, pancreas, cervice, ovaie, e mammella. La funzione della serina / treonina chinasi 11 è necessaria anche per il normale sviluppo prima della nascita (Lim W et al, 2003). Mutazioni su questo gene sono associati a diverse patologie come ad esempio la sindrome di Peutz-Jeghers, cancro al seno e altri tipi di tumore.



**Fig.6. Struttura tridimensionale della proteina STK11**

### **1.8.3.1 Sindrome Peutz-Jeghers**

I ricercatori hanno identificato più di 140 mutazioni nel gene *STK11* che sono responsabili della sindrome di Peutz-Jeghers. Molte di queste mutazioni risultano la produzione di un trascritto breve, che porta alla formazione di una versione della proteina non funzionale. Altre mutazioni cambiano un singolo amminoacido portando alla formazione di una proteina instabile e con poca funzionalità. Varie ricerche hanno dimostrato che la perdita della funzione di questo enzima permette alle cellule di dividersi troppo spesso, portando alla formazione di polipi nel tratto gastrointestinale. A volte questi polipi possono diventare maligni (cancerosi). La perdita della funzione di soppressore tumorale probabilmente aumenta il rischio di tumori gastrointestinali, cancro al seno, e altre forme di cancro in sindrome di Peutz-Jeghers (Hemminki A et al, 1998).

### **1.8.4 Gene COQ6**

Il gene *COQ6* estende su 13,2 kb e contiene 12 esoni. Ci sono 18 isoforme derivanti da splicing alternativo. L' isoforma full length è espressa in molti tessuti compreso il rene. Questa proteina è implicata nella biosintesi del coenzima Q10. Il gene *COQ6* è stato

identificato inizialmente in *S.cerevisiae*, dove è richiesto per un corretto funzionamento della catena respiratoria mitocondriale. I ceppi mutanti in questo gene infatti non sono in grado di crescere in un terreno contenente glicerolo e etanolo, due forme non fermentabili di carbonio, poiché non sintetizzano il CoQ; inoltre accumulano acido 4-idrossi-3-poliprenil benzoico, un intermedio della sintesi dell'ubiquinone. La trasformazione di tali mutanti con un plasmide contenente il COQ6 wild-type è in grado di ripristinare la biosintesi di CoQ, consentendo la crescita in terreno contenente glicerolo ed etanolo (Gin P et al, 2003). La proteina Coq6 viene importata nei mitocondri in modo dipendente dal potenziale di membrana e si localizza a livello della membrana interna, dove è associata in modo periferico dal lato della matrice. La proteina Coq6 di *S.cerevisiae* ed i suoi omologhi in *H.sapiens*, *M.musculus* e *C.elegans* presentano tre regioni conservate, comuni ad una grande famiglia di idrolasi aromatiche leganti il FAD: un motivo ADP-binding fingerprint, un motivo che riconosce il NADP(H), ed una sequenza consenso che lega il FAD. E' pertanto verosimile che Coq6p agisca come una monossigenasi flavino-dipendente, catalizzando una o più reazioni di idrossilazione necessarie per la biosintesi del CoQ.

#### **1.8.4.1 Deficit di Coenzima Q 10**

Il deficit di CoQ (MIM #607426), descritto per la prima volta nel 1989 (Ogasahara S et al, 1989), è un raro disordine autosomico recessivo associato a diversi fenotipi clinici. Si distinguono una forma primaria, dovuta a difetti nei geni della biosintesi del CoQ, ed una secondaria caratterizzata da difetti di geni non correlati alla biosintesi del CoQ (ad esempio, mutazioni nel gene APTX, Quinzii CM et al, 2005). La forma primaria è stata associata al fenotipo più precoce e severo, la variante multisistemica infantile, caratterizzata da sindrome nefrosica e grave encefalopatia (Röting A et al, 2000; Salviati L et al, 2005; Quinzii C et al, 2006; Lopez LC et al, 2006; Mollet Jet al, 2007).

Il difetto primitivo di CoQ è l'unico disordine mitocondriale potenzialmente trattabile, in quanto i pazienti rispondono molto bene alla supplementazione di CoQ esogeno (Montini G et al, 2008). Per questo la diagnosi precoce ha un'importanza critica per il trattamento dei pazienti.



## 1.8.5 NF1

La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1, NIM#162200) è una malattia autosomica dominante con un'incidenza da 1 su 2500 a 1 su 3000 soggetti nati vivi (Treglia G et al, 2012), è caratterizzata da penetranza completa ed ha un'espressione altamente variabile anche in seguito a medesime variazioni genetiche nella stessa famiglia (Valero MC et al, 2011).

La patologia è clinicamente caratterizzata da:

- Macchie caffè-latte: CLS (Cafè au lait spots) le quali interessano circa il 95% degli effetti e presenti alla nascita o entro il 1°-2° anno di vita. Esse aumentano in numero e dimensioni fino ai 5-6 anni di età, poi tendono a depigmentarsi e possono quindi essere difficilmente riscontrabili negli individui adulti (Ruggieri M et al, 2001).
- Lentiginosi: lesioni simili alle CLS ma di dimensioni minori (pochi mm) che compaiono verso i 6-7 anni d'età site alle ascelle, all'inguine e alla base del collo.
- Noduli di Lish: presenti nell'85-90% degli adulti affetti. Essi sono dei noduli asintomatici che compaiono, poco prima della pubertà, nell'iride.
- Neurofibromi: dei tumori benigni del sistema nervoso i quali aumentano di dimensioni e numero con l'età. Essi si distinguono in cutanei e nodulari.

Sono inoltre presenti eventuali "segni clinici secondari" in una discreta percentuale di individui affetti, ma non abbastanza da poterli considerare segni tipici della patologia:

- Macrocefalia
- Bassa statura
- Malformazioni toraciche
- Ipertelorismo

Sono le complicanze della malattia a determinarne la gravità, quali disturbi cognitivi e dell'apprendimento, neurofibroma plessiforme, neurofibroma diffuso, complicanze ortopediche, complicanze neurologiche.

La Neurofibromatosi di tipo 1 è causata da mutazioni nel gene della neurofibromina (NF1; NM\_000267.2) localizzato in posizione 17q11.2 (Cawthon RM et al, 1990).

Il gene *NF1* ricopre una regione di 350 kb, è costituito da 60 esoni che codificano per un trascritto di 11-13 kb. Quest'ultimo comprende un'Open Reading Frame (ORF) di 8457 bp tradotta in una proteina, la neurofibromina, costituita da 2818 aminoacidi e avente massa molecolare di 327 kDa.

All'interno dell'esone 1 del gene, oltre alla regione codificante, è contenuta anche la regione non tradotta in 5' (5' UTR); analogamente la regione non tradotta in 3' (3' UTR) si presenta in contiguità con il codone di stop della proteina nell'esone 49 e si estende per circa 3,5 kb.

L'esame dei siti di splicing degli esoni rispecchia una generale aderenza alla regola GT-AG delle sequenze consensus di splicing (Li Y et al, 1995).

Il gene *NF1* è espresso ubiquitariamente, nei mammiferi, nelle primissime fasi dello sviluppo. La neurofibromina è presente nella maggior parte dei tessuti; tuttavia, negli stadi più avanzati dello sviluppo e negli adulti, la sua espressione diventa rilevabile per lo più in neuroni, cellule di Schwann e oligodendrociti (Daston MM et al., 1992).

Il gene *NF1* è considerato un oncosoppressore in quanto la neurofibromina è un regolatore negativo di ras, pertanto una sua mutazione con conseguente variazione nella proteina ben spiega l'insorgenza di tumori in pazienti NF1. La riduzione dell'attività GAP propria della neurofibromina, dovuta a proteina difettosa o assente, porta ad aumentati livelli di p21ras nel suo stato attivo. La diretta conseguenza di questa attivazione è la perturbazione del signaling di ras e oncogenesi. Mutazioni che inattivano ras o la rendono resistente alle GAP sono implicate in più del 30% dei tumori umani (Fernandez-Medarde A et al, 2011). Un gran numero di mutazioni di *NF1* nella regione GRD, le quali inattivano o modificano l'attività GAP della neurofibromina sono riportate in diversi tumori correlati a NF1. Questa evidenza denota come il danno, o variazione, all'attività GAP della neurofibromina sia critico nella patogenesi della Neurofibromatosi di tipo 1 (Upadhyaya M et al, 1997). Sono stati inoltre riscontrati in tumori dei nervi periferici in pazienti NF1, elevati livelli di ras-GTP attiva associati all'alterata espressione della neurofibromina.

### **1.8.5.1 Mutazioni di *NF1***

I difetti di splicing costituiscono il 30-50% del totale di mutazioni del gene *NF1*. Circa il 30% di queste mappa lontano dalle giunzioni esone-introne e possono causare la creazione di nuovi siti di splicing (5'ss e 3'ss), attivare siti criptici, o portare alla perdita o formazione di sequenze segnale esoniche e/o introniche, importanti per il riconoscimento del messaggero da parte dei fattori di splicing (ESE e ISE) (Bottillo I et al., 2005). Le mutazioni a carico del gene *NF1* risultano essere molteplici e di diversa tipologia, tra le quali estese delezioni genomiche che rimuovono l'intero gene e le sue regioni fiancheggianti (più di 1,5 Mb, responsabili di meno del 5% dei casi di NF1) oppure sostituzioni di singole basi (circa il 67% delle variazioni riscontrate) (Mattocks C et al., 2004). Più dell'80% delle mutazioni de novo sono di origine

paterna (Snajderova M et al., 2011), ad eccezione delle delezioni dell'intero gene, che costituiscono circa il 5% delle mutazioni che colpiscono il gene *NF1*. In generale, lo spettro di mutazioni del gene *NF1* sembra molto simile a quello di altri oncosoppressori, caratterizzati da una proporzione rilevante di mutazioni troncanti. Buona parte delle mutazioni riscontrate sono puntiformi, oppure altri tipi di piccole lesioni accumulate dalla caratteristica di introdurre prematuri codoni di terminazione (PTCs - Premature Termination Codons) della sintesi proteica (Fashold et al., 2000). La quota di mutazioni frameshift e nonsense che ci si aspetta interrompano il codice di lettura, si aggira attorno al 49% delle mutazioni totali e sembrano essere omogeneamente distribuite lungo tutta la sequenza di *NF1*, fatta eccezione per i tre esoni originati dallo splicing alternativo, 9a, 23a, e 48a, finora apparentemente privi di mutazioni (Fashold R et al., 2000; Messiaen LM et al., 2000; Han S et al., 2001; Ars E et al., 2003). Rilevante è l'effetto che le mutazioni comportano a livello dell'mRNA: circa la metà delle mutazioni causano alterazioni nello splicing; i difetti di processamento del messaggero si propongono come il difetto molecolare più comune nella NF1 (Mattocks et al., 2004). Le alterazioni possono interessare sia i canonici siti donatori (GT) e accettori (AG), sia posizioni meno conservate, oppure possono creare nuovi siti di splicing. Mutazioni al 5'ss e al 3'ss non sembrano avere la stessa frequenza: il 65% delle mutazioni delle sequenze consensus dei siti di splicing coinvolge il sito donatore, in particolare in posizione +1, +2 e +5 (Pros E et al., 2008). Inoltre, circa la metà delle mutazioni a carico dello splicing dell'mRNA indurrebbero la formazione di trascritti in frame che risulterebbero in una proteina presunta leggermente più corta o più lunga dell'autentica neurofibromina, ma non troncata (Ars E et al., 2003). Nonostante le mutazioni siano distribuite lungo tutta la sequenza genica, si possono comunque evidenziare dei cluster di mutazioni: il 68% delle mutazioni osservate infatti sono risultate localizzate in 12 esoni e/o introni fiancheggiati: 4b, 7, 10a, 11, 15, 16, 23-1, 29, 31, 36, 37, e 45 (Fashold R et al., 2000).

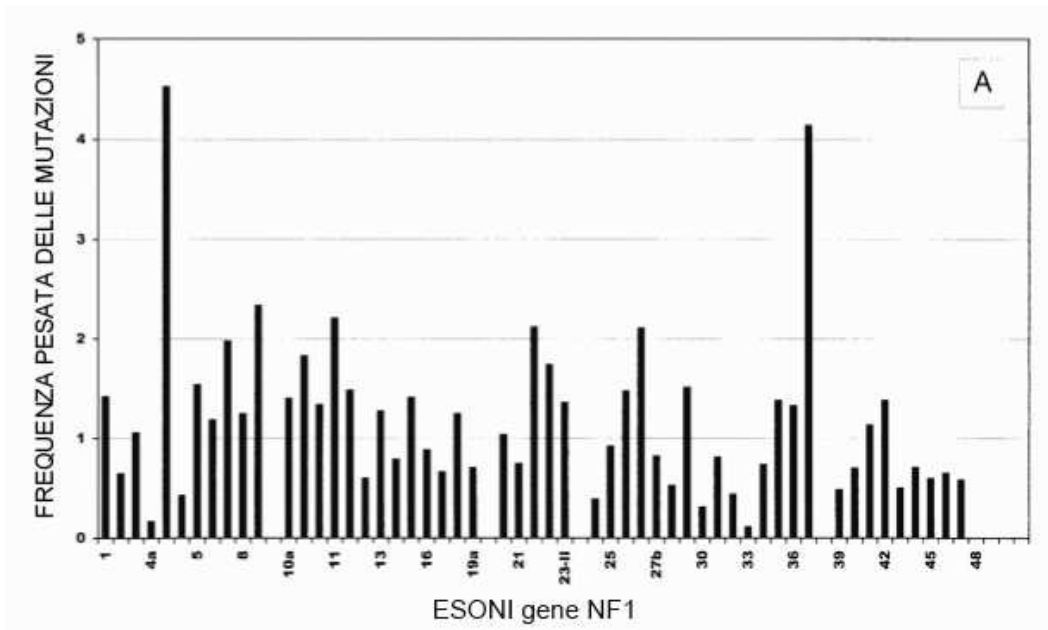


Fig.7. Distribuzione pesata delle mutazioni nel gene *NF1*. Immagine modificata da Fashold *et al.*, 2000.

### 1.8.6 Gene *AIP*

AH receptor-interacting protein (*AIP*) noto anche come aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein, immunophilin homolog ARA9, o HBV X-associated protein 2 (*XAP-2*) è una proteina che è codificata dal gene *AIP*.

Il gene *AIP* è un oncosoppressore e previene l'insorgenza di tumori a livello dell' ipofisi. Le sue mutazioni possono essere causa di una forma familiare di acromegalia o familial isolated pituitary adenoma (*FIPA*). Si è osservato in letteratura che i pazienti con mutazioni in questo gene presentavano una diagnosi in età molto giovane e con una maggior presenza di tumori di dimensioni maggiori. Nonostante ciò alcune mutazioni sono state trovate in casi sporadici (Occhi G. et al 2010).

## 2. SCOPO DELLA TESI

L'importanza di determinare se varianti genomiche trovate attraverso screening di popolazione o su pazienti possano essere causa di una errata maturazione dell'RNA è di importanza cruciale per una eventuale diagnosi sia della malattia e sia su un'eventuale trasmissione alla prole.

Per determinarne la patogenicità si possono utilizzare alcuni strumenti informatici ma l'analisi computazionale con software specifici, come ad esempio NetGene 2, Human Splicing Finder, ESE finder, BDGP Splice Site Prediction, spesso si rivela inaffidabile.

Ci si è posti quindi l'obiettivo di sviluppare un sistema d'indagine da poter utilizzare quando non si ha la possibilità di un'analisi diretta dell'RNA del paziente.

Lo scopo di questo lavoro di dottorato è stato quello di sintetizzare un minigene plasmidico per valutare in un sistema cellulare gli effetti delle mutazioni sul meccanismo di splicing. Tale minigene contiene una cassetta di ricombinazione Gateway che semplifica notevolmente i processi di clonaggio.

Con questa metodica sono state analizzate 16 mutazioni diverse in geni diversi identificate in pazienti dei quali non era disponibile RNA.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Clonaggio frammento AIP c.144 G>A in minigene pEGFP-N1-COQ2-ASL5-6-7

Il DNA del paziente affetto da questa mutazione in eterozigosi è stato amplificato con i seguenti primer:

AIP 144 F	5'- cctcctgcagcgtcccttatgccgtctg -3'
AIP 144 R	5'- ggagctgcaggcagcttagcagaggggtgga -3'

Secondo il seguente protocollo di amplificazione con Taq HF (Roche):

T (°C)	Tempo	N° cicli
94	3'	1
94	1'	28
58	1'	
72	35''	
72	7'	1
4	∞	1

Sia il frammento che il minigene sono stati digeriti con PstI e ligati secondo protocollo commerciale della Ligase (Promega). Dopo trasformazione batterica e individuate le colonie batteriche wild type e mutata si è proceduto alla trasfezione in cellule HeLa con i plasmidi ottenuti tramite Miniprep.

#### 3.2 Trasfezione cellule HeLa

Il giorno antecedente la trasfezione sono state seminate su piastre da 6 pozzetti (Falcon) 130000 cellule per pozzetto. La cultura cellulare è stata mantenuta in D-MEM (Gibco) con l'aggiunta di siero fetale bovino alla concentrazione finale del 10% (Gibco). Al terreno di coltura sono state aggiunte PenStrep (Gibco) e Glutamina (Gibco).

Il giorno della trasfezione le cellule sono state lavate con PBS 1X sterile (Gibco) e aggiunte di terreno fresco.

Il Kit di trasfezione scelto è stato Effectene Trasfection Reagent (Quiagen) secondo il seguente protocollo:

- DNA plasmidico (400 ng) per pozzetto.
- Aggiungere Buffer EC fino a 100  $\mu$ l.
- Mettere 3,2  $\mu$ l di Enhancer.
- Attendere 5 minuti.
- Aggiungere 10  $\mu$ l di Effectene.
- Attendere 10 minuti.
- Aggiungere 600  $\mu$ l di terreno per colture.
- Trasferire nel pozzetto goccia a goccia in modo uniforme su tutta la superficie.

Incubare le cellule a 37°C e estrarre il DNA tra le 24 e 48 ore per avere la massima espressione del plasmide trasfettato.

### **3.3 Estrazione RNA da colture cellulari**

Per l' estrazione dell' RNA da HeLa trasfettate con il minigene si è utilizzato il Trizol (Invitrogen).

Le cellule sono state lavate con PBS 1X e successivamente staccate dai pozzetti attraverso l' uso di Tripsina allo 0,05% (Gibco). Dopo averle centrifugate a 1250 rpm per 5 minuti sono state risospese in 800  $\mu$ l di Trizol.

I campioni sono stati aggiunti di 160  $\mu$ l di Cloroformio (Sigma Aldrich) e agitati al vortex per 2 minuti.

Successivamente sono stati lasciati 5 minuti in ghiaccio prima di essere centrifugati a 4 °C per 15 minuti a 12600 rpm.

Si è prelevata la fase superiore e risospesa in rapporto 1:1 con Isopropanolo (Sigma Aldrich).

Dopo aver raffreddato a -80°C i campioni per almeno 60 minuti per permettere la precipitazione dell' RNA si sono centrifugati a 12600 rpm per 15 minuti in centrifuga refrigerata a 4°C.

Si è lavato il pellet per due volte con una soluzione di Etanolo (Sigma Aldrich) al 70% in acqua DEPC (Invitrogen). I campioni sono stati seccati in essicatore a vuoto prima di essere risospesi in acqua DEPC (Invitrogen).



### 3.4 Retrotrascrizione a cDNA

Dopo quantifica dell' RNA estratto si è passati a retrotrascriverlo in cDNA con l' uso della Superscript II (Invitrogen). Il protocollo per la retro trascrizione è il seguente:

RNA	1000 ng	65 °C per 5 minuti
Acqua DEPC	Fino a 11.,5 µl	
Random Esameri	0.5 µl	
First Buffer	4 µl	25 °C per 2 minuti
DTT0,1 M	2 µl	
RNAsi OUT	1 µl	
SSC II	1 µl	25°C per 10 minuti 42 °C per 50 minuti 70 °C per 15 minuti 4°C per ∞

### 3.5 PCR da retro trascrizione

Per osservare il prodotto di splicing del minigene sono stati utilizzati i seguenti primer :

Coq2 ex1 F	5'- gctcatgacgtggtggtgt -3'
Asl MiniGene Es6-7 R	5'- gtaccccggaagagaacat -3'

Si è proceduto a fare una PCR per osservare se il prodotto di splicing fosse corretto o presentasse anomalie.

Si sono prelevati 2 µl di ogni retro trascrizione e amplificati mediante reazione di PCR.

### 3.6 Amplificazione gene $\alpha$ -globina

Il gene  $\alpha$ -globina è stato amplificato da DNA genomico di un soggetto sano. I primer di amplificazione sono:

	Primer di amplificazione da DNA genomico
alfa globinaF	5'- ttctggtccccacagactca -3'
alfa globina R	5'- gccgcccactcagactttat -3'

L'amplificato ha dimensioni 838 bp. I primer sono stati disegnati a monte e a valle del gene per ottenere un amplificato contenente tutto il gene  $\alpha$ -globina.

### 3.7 Clonaggio del gene $\alpha$ -globina nel vettore di espressione cellulare

Il vettore di espressione proteica per cellule umane scelto è il pcDNA3.1 V5/His TOPO TA. La scelta di questo vettore di espressione è stata fatta in quanto il clonaggio del frammento di PCR avviene tramite reazione TOPO TA e ha un promotore forte (pCMV).

Reagenti	Batteri chemocompetenti
Amplificato di PCR fresco	4 $\mu$ l
Salt solution	1 $\mu$ l
Vettore TOPO	1 $\mu$ l

La reazione di TOPO TA è stata lasciata a temperatura ambiente per 60 minuti e successivamente utilizzata per la trasformazione batterica con batteri DH5 alpha chemocompetenti (Invitrogen).

I batteri chemocompetenti sono stati trasformati secondo protocollo commerciale.

### 3.8 Screening colonie batteri per l'inserto $\alpha$ -globina

Per osservare la presenza dell'inserto nel vettore sono state isolate delle colonie e analizzate attraverso reazione di PCR con primer a monte e valle dell'inserto.

	Primer di amplificazione del vettore
T 7 prom F	5'-taatacgactcactataggg-3'
BGH R	5'-tagaaggcacagtcgagg-3'

Terminata la reazione di PCR è stata corsa per elettroforesi su gel di agarosio al 1% per osservare il corretto peso molecolare degli amplificati.

Individuate le colonie che presentavano l'inserto si è passati all'analisi della giusta orientazione all'interno del vettore. Per fare ciò si sono utilizzati oltre ai primer T7 PROM F e BGH R anche primer interni all'amplificato.

### 3.9 Sequenziamento colonie con $\alpha$ -globina orientata in modo corretto

Le colonie presentanti l' inserto orientato in modo corretto sono state sequenziate con lo strumento ABI PRISM 3110 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

La reazione di sequenziamento è stata così impostata

MIX di reazione	Volume per reazione ( $\mu$ l)
Plasmide estratto (100 ng $\mu$ l)	4
Acqua sterile	9.4
Buffer 5X	3
Primer forward/reverse (10 $\mu$ M)	0.6
Big Dye 3.1	3
Volume finale	20

T ( $^{\circ}$ C)	Tempo	Cicli
95	10''	25
50	5''	
60	2''	

Gli amplificati ottenuti dopo reazione di Big Dye sono stati purificati con colonnine Centrisept Spin Column (Applied Biosystem). Sono stati prelevati 10  $\mu$ l di ogni purificato e dopo aggiunta di 10 $\mu$ l di Formammide (Invitrogen) sono stati inviati per il sequenziamento.

### 3.10 Analisi degli elettroferogrammi di sequenziamento

Il software utilizzato per l' analisi degli elettroferogrammi è stato il Chromas (WinImp self-Extractor Copyright 2000 Technelysium Pty Ltd).

Dall' analisi comparativa tra sequenza di riferimento e sequenza delle singole colonie è stato possibile individuare le colonie che non presentavano anomalie di sequenza.

### 3.11 Clonaggio cassetta Gateway in Minigene $\alpha$ -globina

Per clonare la cassetta Gateway abbiamo digerito il minigene  $\alpha$ -globina con l'enzima di restrizione SfoI (questo sito di restrizione è unico e si trova all' interno del secondo introne della  $\alpha$ - globina). La reazione di digestione è stata la seguente:

Reagente	Quantità
Minigene $\alpha$ -globina	1 $\mu$ gr
Buffer 10X	5 $\mu$ l
SfoI(20000 unità/ml)	1 $\mu$ l
Acqua sterile	fino a 50 $\mu$ l

Siccome la ligazione della cassetta al minigene è una ligazione blunt-blunt si è trattato il minigene con l' enzima SAP (Promega).

Alla provetta dopo la digestione è stato aggiunto 1  $\mu$ l dell' enzima SAP (Shrimp alkaline phosphatase) (Promega) e incubata 30 minuti a 37 °C per permettere la desfosforilazione del vettore così da impedirne la richiusura dopo ligazione. L' enzima è stato inattivato tramite calore (65°C 15 minuti).

Il vettore al termine dei trattamenti enzimatici è stato purificato con colonnine Microcon (Millipore) e poi ligato con la T4 DNA Ligase (Promega) secondo il seguente protocollo:

Reagente	Quantità
Minigene trattato SfoI,SAP	1 $\mu$ gr
Cassetta Gateway 20 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Buffer 10X	1 $\mu$ l
ATP	1 $\mu$ l
Ligase (3 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Acqua sterile	fino a 10 $\mu$ l

La reazione di ligazione è stata incubata over night alla temperatura di 16 °C.

### 3.12 Trasformazione minigene $\alpha$ -globina con cassetta Gateway e sequenziamento

La cassetta Gateway contiene il gene ccdB che codifica per una proteina tossica per batteri che non contengono la resistenza a questa proteina.

L'inoculo della ligazione ( 2  $\mu$ l) viene fatto in una aliquota di 80  $\mu$ l di batteri ccdB (Invitrogen). Il protocollo di trasformazione è uguale a quello degli altri batteri DH5 alpha .

Le piastre LB agar contengono un doppio antibiotico in quanto uno per la resistenza al minigene (ampicillina) e l' altro per la cassetta Gateway ( cloranfenicolo).

Il giorno seguente sono state inoculate delle colonie e dopo estrazione dei plasmidi sono state sequenziate al fine di osservare l' orientamento della cassetta Gateway.

### 3.13 Formazione del minigene $\beta$ -globina

Il gene  $\beta$ -globina è stato amplificato da DNA genomico di un soggetto sano. I primer di amplificazione sono:

	Primer di amplificazione da DNA genomico
B-globina F	5'-cagtctgcctagtagcattactatttgg-3'
B-globina R	5'-ttgccctgaaagaaagagatt-3'

L'amplificato ha dimensioni 1782 bp. I primer sono stati disegnati a monte e a valle del gene per ottenere un amplificato contenente tutto il gene  $\beta$ -globina.

Per il protocollo di amplificazione si è utilizzati l'enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche) secondo la seguente reazione :

T (°C)	Tempo	N° cicli
94	3'	1
94	1'	35
58	1'	
72	1'45''	
72	7'	1
4	$\infty$	1

### 3.14 Clonaggio cassetta di ricombinazione Gateway in Minigene $\beta$ -globina

Per clonare la cassetta Gateway abbiamo digerito il minigene  $\beta$ -globina con l'enzima di restrizione BsrGI (questo sito di restrizione è unico e si trova all'interno del secondo introne della  $\beta$ -globina). La reazione di digestione è stata la seguente:

Reagente	Quantità
Minigene $\beta$ -globina	1 $\mu$ gr
Buffer 10X	5 $\mu$ l
BSA 10X	5 $\mu$ l
BsrGI(10 units/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Acqua sterile	fino a 50 $\mu$ l

La cassetta Gateway presenta delle estremità blunt e, siccome l'enzima di restrizione lascia dopo digestione delle estremità sticky, si è dovuto rendere le estremità blunt attraverso reazione con Klenow (Promega).

La reazione è stata la seguente:

Reagente	Quantità
Minigene digerito BsrGI	1 µgr
Buffer 10X	5 µl
Klenow (5 units/µl)	1 µl
Acqua	fino a 50 µl

La reazione viene incubata a 37°C per 15 minuti e poi inattivata a 65°C per 10 minuti.

Al termine della reazione viene aggiunto 1 µl di SAP (Shrimp alkaline phosphatase) e incubata 30 minuti a 37 °C per permettere la desfosforilazione del vettore così da impedirne la richiusura dopo ligazione. L' enzima è stato inattivato tramite calore (65°C 15 minuti).

Il vettore al termine dei trattamenti enzimatici è stato purificato con colonnine Microcon (Millipore) e poi ligato con la Ligase (Promega).

La reazione di ligazione tra il minigene e la cassetta reading frame è stata:

Reagente	Quantità
Minigene trattato BsrGI, Klenow,SAP	1µgr
Cassetta Gateway 20 ng/ul	1 µl
Buffer 10X	1 µl
ATP	1 µl
Ligase (3 units/µl)	1 µl
Acqua sterile	fino a 10 µl

La reazione di ligazione è stata incubata over night alla temperatura di 16 °C.

### 3.15 Screening colonie per individuare il corretto orientamento della cassetta Gateway

Si sono isolate le colonie e inizialmente si è determinato l' orientamento della cassetta tramite l' uso della reazione di PCR con un primer a monte della cassetta ed uno interno ad essa. I primer utilizzati sono stati:

	Primer di amplificazione del vettore
ccdB F	5'-ggtaagcacaacatgcaga-3'
betaglob INT2 REV	5'- ttgcctgaaagaaagatt-3'

Successivamente si è confermato tale dato attraverso digestione del plasmide estratto mediante il kit Illustra Plasmid Miniprep ( GE Healthcare) con l' enzima Eco RI (Neb Biolabs). Il protocollo di digestione è stato il seguente:

Reagente	Quantità
Minigene $\beta$ -globina Rf	500 ngr
Buffer 10X	3 $\mu$ l
Eco RI(10 units/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Acqua sterile	fino a 30 $\mu$ l

### 3.16 Amplificazione mediante PCR da genomico dei pazienti interessati allo studio di mutazione

I genomici dei pazienti sono stati amplificati utilizzando la Expand High Fidelity PCR System (Roche) con i seguenti primers:

	NOME PRIMER	SEQUENZA	Lunghezza amplificato
<b>ASL</b>	ASL 1062 G>A F	5'-tctgccccctgtatggtca-3'	1050 bp
	ASL 1062 G>A R	5'-cttgggaggaggtgaggtgg-3'	
<b>NF1</b>	MGivs20+1FOR	5'-gctgattatcgcgagagagg-3'	981 bp
	MGivs20+1REV	5'-gtggattccaattccagcat-3'	
	MGivs10b+1FOR	5'-tgcaaaaacgatttcattg-3'	672 bp
	MGivs10b+1REV	5'-ttctatccccataccagga-3'	
	MGivs8+2FOR	5'-aacagctgtttgggaagga-3'	1186 bp
	MGivs8+2REV	5'-tgaagcmetaaaagaacagca-3'	
	MGivs20+3FOR	5'-gctgattatcgcgagagagg-3'	981 bp
	MGivs20+3REV	5'-gtggattccaattccagcat-3'	
	MGivs9a-19FOR	5'-tatgcacgtgtccagaaat-3'	903 bp
	MGivs9a-19REV	5'-taaaatgtgcattggcagca-3'	
	MGivs14+2FOR	5'-cacatggcatcgattttgag-3'	1292 bp
	MGivs14+2REV	5'-cacctgatgaaggagaaaa-3'	
	MGivs21-1FOR	5'-tttaccggtaatccttgaa-3'	851 bp
	MGivs21-1REV	5'-gtcctgatctaaggcaaat-3'	
<b>STK11</b>	MGSTK11291-1F	5'-tgtgaactcacagcttctct-3'	1242 bp
	MGSTK11291-1R	5'-ggcctcatgtcaatgaata-3'	
<b>CFTR</b>	CFTR274-6F	5'-ccaagatattgaaaatagtgc-3'	696 bp
	CFTR274-6R	5'-aaaaactacaacagaggcagt-3'	
	CFTR2752-26F	5'-acaaagcaaaggaagatgaa-3'	1229 bp
	CFTR2752-26R	5'-agtcaaatggaggttcaaca-3'	
	CFTR876-6F	5'-gctcataggctgtcataagg-3'	642 bp
	CFTR876-6R	5'-gtattgagcagcagtgaaca-3'	
	CFTR 3468+51 F	5'-cccattgcccattctaata-3'	884 bp
	CFTR 3468+51 R	5'-tcacatctaccagacaccaa-3'	
	CFTR 1249-64 F	5'-gatgaatcctagtcttgcaaat-3'	412 bp
	CFTR 1249-64 R	5'-tgagtgatcctcctccagtct-3'	

Il protocollo di amplificazione è stato il seguente:

T (°C)	Tempo	N° cicli
94	3'	1
94	1'	35
55	1'	
72	30'' ogni 500bp	
72	7'	1
4	∞	1

### 3.17 Clonaggio del frammento di DNA di interesse nel vettore pcr8TOPO TA

Dopo amplificazione mediante PCR dal genomico di pazienti presentanti le mutazioni di interesse, sono state osservate i pesi molecolari mediante elettroforesi su gel di agarosio. Successivamente alla purificazione con colonnine Microcon 30K (Millipore) l'amplicato è stato clonato nel vettore pcr8TOPO (Invitrogen) con il metodo del clonaggio TOPO TA.

### 3.18 Screening batteri per osservare la presenza dell' inserto da pcr8TOPO TA

Le colonie isolate sono state analizzate mediante PCR con i primer del vettore pcr8TOPO per individuare quali contenessero il frammento di DNA di interesse e quali si fossero richiuse.

	Primer di amplificazione del vettore
M13 F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

L'amplicato di ogni singola colonia è stato corso mediante elettroforesi su gel di agarosio per osservarne i giusti pesi molecolari.



### 3.19 Screening colonie con inserto orientato nel modo corretto e sequenziamento

La reazione di TOPO TA non è un clonaggio direzionale e quindi si è proceduto allo screening mediante PCR con un primer del vettore e uno dell' inserto. Gli amplificati sono stati corsi su gel di agarosio mediante elettroforesi.

Le colonie sono state sequenziate per determinare la colonia wild type e mutata da inserire nel minigene.

### 3.20 Reazione di LR clonasi tra minigene $\beta$ -globina Gateway e pcr8TOPO TA con inserto

Il protocollo di reazione LR è stato il seguente:

- Aggiungere i seguenti componenti in una provetta da 0,2  $\mu$ l a temperatura ambiente e risospendere:

Reagente	Quantità
Pcr8TOPO con inserto	50-150 ng
Minigene $\beta$ -globina	50-150 ng
TE Buffer PH 8	Fino a 8 $\mu$ l

- Mettere in ghiaccio la LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen) in ghiaccio per 2 minuti.
- Agitare con il vortex brevemente per 2 volte ( 2 secondi a volta).
- Per ogni campione aggiungere 2  $\mu$ l di LR Clonase enzyme mix e agitare con il vortex brevemente.
- Centrifugare brevemente.
- Incubare la reazione a 25°C per 60 minuti.
- Aggiungere 1  $\mu$ l della soluzione di Proteinase K su ogni campione per terminare la reazione.

### 3.21 Amplificazione mediante PCR da retro trascrizione

Per osservare il prodotto di splicing del minigene sono stati utilizzati i seguenti primer :

$\beta$ - globina esone 2 F	5'-ttgagtcctttgggatctg-3'
-----------------------------	---------------------------

$\beta$ - globina esone 3 R	5'-accagccaccactttctgat-3'
-----------------------------	----------------------------

Si è proceduto a fare una PCR per osservare se il prodotto di splicing fosse corretto o presentasse anomalie.

Si sono prelevati 2  $\mu$ l di ogni retro trascrizione e amplificati mediante reazione di PCR.

Il protocollo di reazione è stato il seguente:

Mix di reazione	Volume per una reazione
Primer F (1 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
Primer R (1 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
Buffer 10X	5 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq Roche	0,5 $\mu$ l
Retrotrascrizione	2 $\mu$ l
Acqua sterile	Fino a 50 $\mu$ l

Il protocollo di amplificazione è stato il seguente:

T (°C)	Tempo	N° cicli
94	3'	1
94	1'	35
58	1'	
72	30'' ogni 500 bp	
72	7'	1
4	$\infty$	1

Al termine la PCR è stata corsa su gel di agarosio (Sigma Aldrich) all' 1% e dopo purificazione dell' amplificato sequenziato previa reazione di Big Dye Terminator 3.1 kit (LifeTechnologies)

### 3.22 Clonaggio mutazione COQ6 IVS1+11 C>T in minigene COQ2ex 1+ASL ex5-6-7

Il genomico di un controllo sano è stato amplificato con i seguenti primer:

	Primer di amplificazione da DNA genomico
hCOQ6A WT SacI	5'-cttctgagctcatgacgtggtggtgctcgggtgga -3'
hCOQ6 gen IVS1 R	5'-aatcagccgagtggggcgcattcc-3'

Con il seguente protocollo di amplificazione utilizzando Expand High Fidelity PCR System (Roche):

T (°C)	Tempo	N° cicli
94	3'	1
94	1'	35
58	1'	
72	45''	
72	7'	1
4	∞	1

L' amplificato ha una lunghezza di 736 bp.

Sia il minigene COQ2ex 1+ASL ex5-6-7 che l' amplificato sono stati digeriti con SacI e PstI secondo il seguente protocollo:

Reagente	Quantità
Minigene COQ2ex 1+ASL ex6-7	500 ng
Buffer 1 NEB	3 µl
BSA 10X	3 µl
SacI (20000 unità/ml)	1 µl
PstI (20000 unità/ml)	1 µl
Acqua sterile	fino a 30 µl

Dopo corsa elettroforetica della digestione sono state estratte le bande da gel con il kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) secondo protocollo commerciale. Successivamente è stato ligato al minigene il frammento di interesse con la T4 DNA Ligase (Promega).

Sono stati trasformati i batteri chemocompetenti DH5α (Invitrogen) con la ligazione secondo protocollo commerciale.

Dopo aver individuato la colonia WT si è proceduto ad una mutagenesi sito specifica con il kit QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) con i seguenti primer:

	Primer di amplificazione
C826T_For	5'-gtgccttgggtaagccctttccaggctact -3'
C826T_Rev	5'-agtagcctggaaaagggttacccaaggcac-3'

La mutagenesi è stata eseguita secondo protocollo commerciale.

E' stata individuata la colonia presentante la mutazione in esame e dopo estrazione dei plasmidi dai batteri mediante il kit Illustra Plasmid Miniprep ( GE Healthcare) si è proceduto alla trasfezione delle cellule HeLa.

Il protocollo di reazione è stato il seguente:

Mix di reazione	Volume per una reazione
Primer F (1 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
Primer R (1 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
Buffer 10X	5 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq Roche	0,5 $\mu$ l
Retrotrascrizione	2 $\mu$ l
Acqua sterile	Fino a 50 $\mu$ l

Il protocollo di amplificazione è stato il seguente:

T ( $^{\circ}$ C)	Tempo	N $^{\circ}$ cicli
94	3'	1
94	1'	35
58	1'	
72	30'' ogni 500 bp	
72	7'	1
4	$\infty$	1

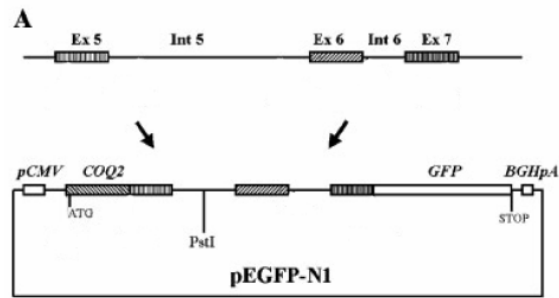
## 4. RISULTATI

In questo lavoro di dottorato si è affrontato il problema di caratterizzare le presunte mutazioni di splicing con un sistema il più affidabile possibile e con tempi di esecuzione relativamente brevi per un futuro affiancamento alla diagnostica di routine, in modo da fornire un ausilio all'interpretazione delle varianti individuate sul DNA genomico dei pazienti.

Inizialmente si sono utilizzati dei minigeni classici dove si sono clonati i frammenti di DNA attraverso la digestione con enzimi di restrizione e ligati nel modo classico. Successivamente si è pensato di inserire una cassetta di ricombinazione per ovviare alle problematiche legate alla compatibilità dei siti di restrizione tra l'inserto e il minigene all'interno del secondo introne dell' $\alpha$ -globina. Questa cassetta permette di ridurre notevolmente i tempi di clonaggio (e quindi la durata dell'analisi). L'utilizzo del minigene  $\alpha$ -globina è stato tuttavia abbandonato in quanto l'efficienza dello splicing del frammento in analisi era bassa. Si è quindi sintetizzato il minigene  $\beta$ -globina con la medesima cassetta di ricombinazione. La necessità di studiare mutazioni anche a livello del primo esone di un gene ha reso necessario lo sviluppo di vettori ad hoc. Anche in questo caso si è pensato di ottenere un minigene da utilizzare che permettesse di ridurre di molto i tempi di analisi. Si è inserita una cassetta di ricombinazione al posto degli esoni 1 e 2 della  $\beta$ -globina. Questo ultimo minigene ha presentato però un problema in quanto, nonostante formasse uno splicing corretto per l'esone 1 del gene oggetto di analisi, presentava una ritenzione intronica. Attualmente si sta valutando l'utilizzo di un minigene alternativo per le mutazioni dell'esone 1.

### 4.1 Studio della mutazione c.144 G>A sul gene *AIP*

La divisione di endocrinologia ha individuato su un paziente la mutazione c.144 G>A nel gene *AIP*. Questa mutazione era una mutazione esonica silente in quanto non cambiava l'amminoacido (T48T). I vari software in rete non davano una risposta coerente del possibile effetto sullo splicing del gene e allora per avere indicazioni su questo si è pensato di testare questa mutazione con un minigene in quanto l'RNA del paziente non era disponibile. Per questa mutazione è stato utilizzato un vettore precedentemente utilizzato nel nostro laboratorio, pEGFP-N1-COQ2-ASL5-6-7 (Trevisson E et al, 2007) e il frammento di DNA genomico amplificato dal paziente è stato clonato in esso a livello del sito PstI.

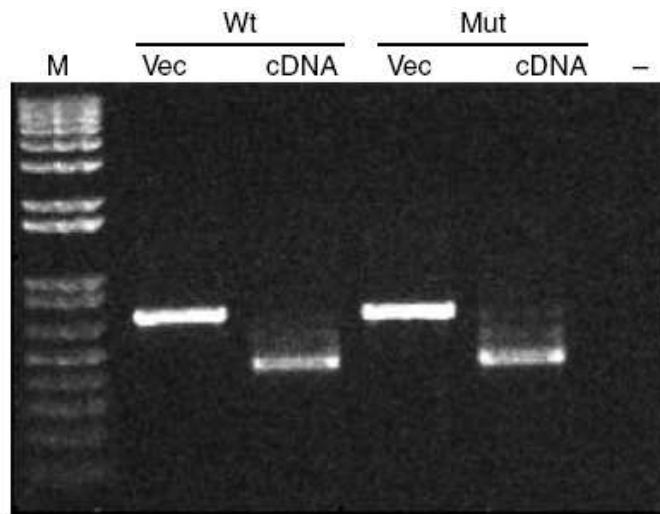


**Fig.8. Schema di formazione minigene pEGFP-N1-COQ2-ASL5-6-7**



**Fig.9. Schema del Minigene pEGFP-N1-COQ2-ASL5-6-7 con AIP**

Ottenute le colonie Wild-type e Mutata sono state trasfettate in cellule HeLa e dopo estrazione dell' RNA è stato valutato lo splicing del gene ibrido.



**Fig.10. Gel di corsa elettroforetica della mutazione c.144 G>A sul gene AIP**

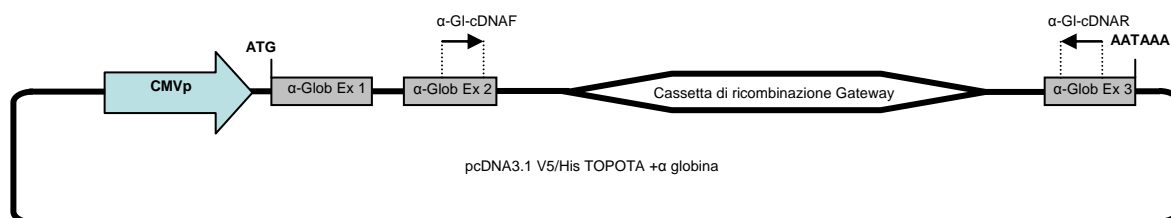
Come si può osservare dal gel di agarosio (fig.10) non c'è differenza tra il pattern di splicing del minigene wild-type e mutato. La non patogenicità della mutazione sullo splicing è stata confermata mediante sequenziamento.

## 4.2 Formazione del minigene $\alpha$ -globina Gateway

La necessità di analizzare mutazioni a livello dei siti di splicing in modo veloce e semplice ha reso necessario la formazione di un nuovo minigene dove la velocità di clonaggio è resa possibile grazie alla metodica Gateway.

Si è scelto il gene  $\alpha$  globina in quanto è un gene piccolo e che presenta un sito SfoI a livello dell'introne 2 ove inserire la cassetta Gateway.

L'intero gene (con l'eccezione del promotore) è stato amplificato da DNA genomico di un individuo sano e clonato in pcDNA3.1 V5/His TOPO TA. Successivamente si è proceduto all'inserimento della cassetta Gateway all'interno dell'introne 2 dell' $\alpha$  globina (fig.11).



**Fig.11. Schema del minigene  $\alpha$ -globina Gateway**

Questo costrutto è stato utilizzato per l'analisi di una mutazione esonica c.1062 G>A a livello del gene *ASL*. A questo scopo sono stati clonati nel vettore  $\alpha$  globina frammenti di DNA genomico contenenti esoni 11-12-13-14 e gli introni adiacenti, del paziente e di un controllo sano. Il costrutto con il frammento di DNA wild-type è stato trasfettato in cellule HeLa e osservato se presentava il corretto splicing.



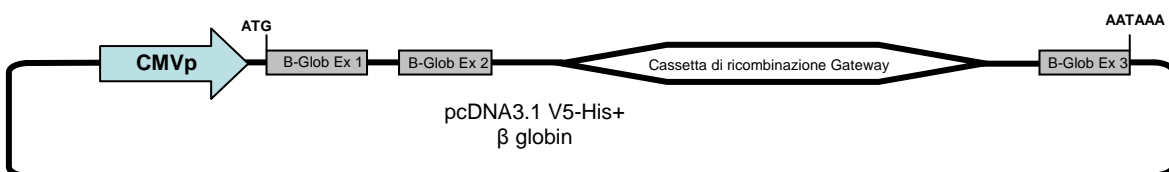
**Fig.12. Gel di agarosio del minigene  $\alpha$ -globina WT per la mutazione ASL c.1062 G>A**

Come si può osservare dalla corsa elettroforetica (fig.12) gli esoni del gene *ASL* vengono inclusi nel trascritto maturo con efficienza molto bassa, mentre la maggior parte dei trascritti contiene solo gli esoni 2 e 3 dell'alfa globina. Per questo motivo non è stato possibile utilizzare questo costrutto per le nostre analisi.

#### 4.3 Formazione del minigene $\beta$ -globina Gateway

Pertanto si è deciso di utilizzare il gene per la beta  $\beta$ -globina, anch'esso di dimensioni contenute e con un sito di restrizione *BsrGI* a livello dell'introne 2. Tale backbone era già stato utilizzato con successo nel nostro laboratorio (Forzan et al, 2010) ed in tali casi i frammenti da analizzare venivano inclusi nel trascritto maturo con efficienza pressochè del 100%.

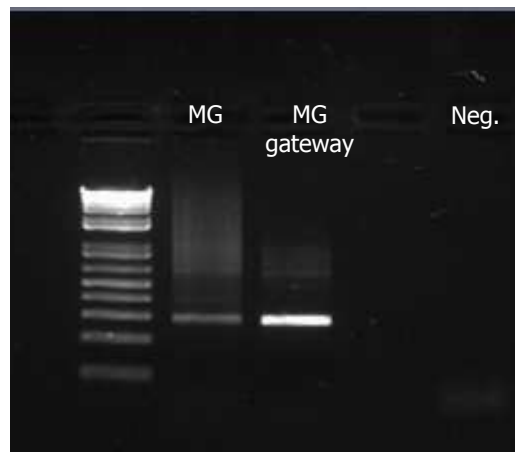
Il gene (anche in questo caso con l'eccezione del promotore) è stato amplificato da DNA genomico di individuo sano ed stato clonato nel vettore pcDNA3.1 V5/His TOPO TA. La cassetta di ricombinazione Gateway è stata clonata nell' introne 2 della  $\beta$ -globina mediante digestione con *BsrGI* (fig.13)



**Fig.13. Schema del minigene  $\beta$ -globina**



E' stato analizzato mediante trasfezione su cellule HeLa ed estrazione dell'RNA se la cassetta Gateway potesse influire sul corretto splicing.



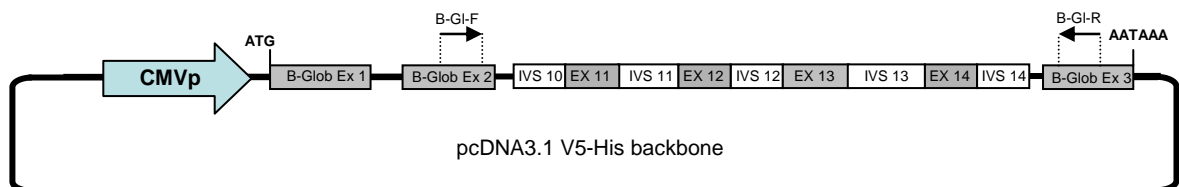
**Fig.14. Gel di agarosio in cui si analizza se la cassetta Gateway disturba lo splicing della  $\beta$ -globina**

Come si può osservare dalla corsa elettroforetica (fig.14) e confermato mediante sequenziamento, la cassetta di ricombinazione Gateway non incide con il corretto splicing del gene.

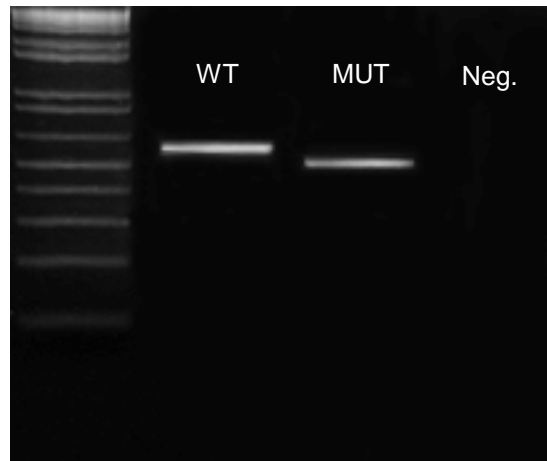
#### **4.4 Analisi della mutazione ASL c.1062 G>A**

La mutazione nel gene *ASL* è in eterozigosi e si trova alla fine dell' esone 14 ed è una mutazione silente in quanto non cambia l' amminoacido che viene tradotto.

Questa mutazione è stata testata con il minigene  $\beta$ -globina (fig.15) e osservato il pattern di splicing dopo corsa elettroforetica.



**Fig.15. Schema di clonaggio mutazione ASL c.1062 G>A**



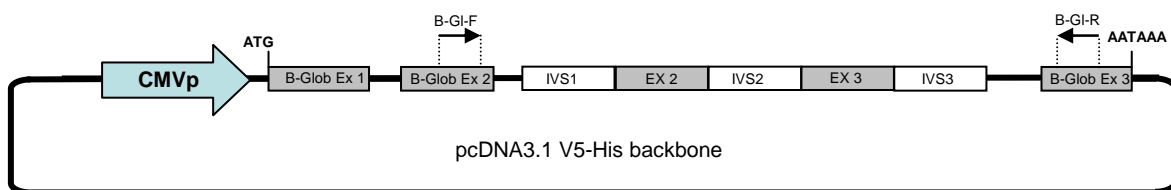
**Fig.16. Gel di corsa elettroforetica della mutazione ASL 1062 G>A**

Già dalla corsa elettroforetica (fig.16) si può notare come i due pattern di splicing siano differenti. Dopo sequenziamento si è osservato il completo skipping dell' esone 14 del gene *ASL*.

#### 4.5 Analisi della mutazione *STK11* c.291-1 G>A

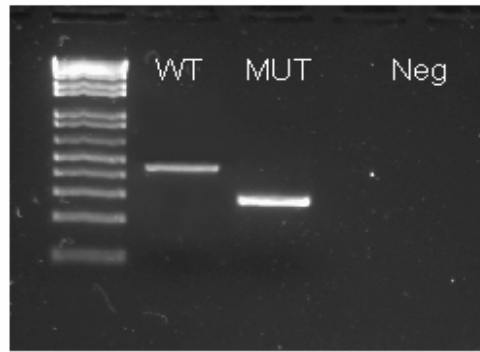
Visto il successo della metodica, abbiamo impiegato tale approccio per studiare una mutazione nel gene *STK11*. Questa mutazione si trova su un sito canonico di splicing e precisamente una base prima dell' inizio dell' esone 2 del gene *STK11*.

E' stata amplificata e clonata nel minigene la parte del gene *STK11* che comprende parte dell' introne 1, l' esone 2, l' introne 2, l' esone 3 e parte dell' introne 3.



**Fig.17. Schema di clonaggio mutazione *STK11* c.291-1 G>A**

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa dalle quali, dopo 48 ore, è stato estratto l'RNA. L'RNA totale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 del gene della  $\beta$ -globina e all'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1%.



**Fig.18. Gel di corsa elettroforetica della mutazione STK11 c.291-1 G>A**

Dalla corsa elettroforetica (fig.18) si può già osservare un diverso profilo di splicing tra il minigene wild-type e quello con la mutazione in esame. Dal sequenziamento si è osservato un skipping dell' esone 2 e 3 del gene STK11.

## 4.6 Analisi sistematica di una serie di mutazioni in geni specifici

### 4.6.1 Studio di mutazioni in NF1

#### 4.6.1.1 Analisi della mutazione NF1 IVS 20+1 G>A

La mutazione in esame si trova una base dopo la fine dell' esone 20. Il genomico del paziente è stato amplificato con primer che comprendevano la regione compresa tra parte dell' introne 19b e parte dell' introne 21 e successivamente clonato nel minigene  $\beta$ - globina.

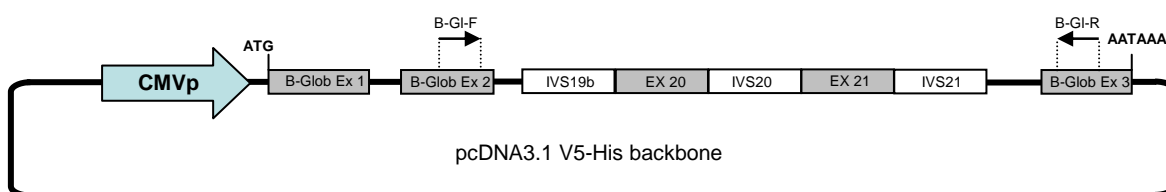


Fig.19. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 20+1 G>A

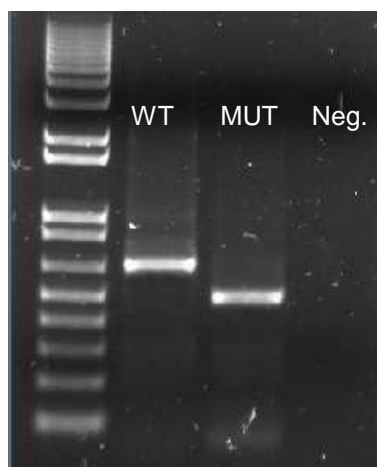


Fig.20. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 20+1 G>A

Come si vede dalla corsa elettroforetica (fig.20) il pattern osservabile con il MG (minigene) wild type è completamente diverso rispetto al MG recante la mutazione. Sequenziando gli amplificati è stato dimostrato che il MG wild type presenta un corretto splicing che include l'esone 2 della  $\beta$ -globina, gli esoni 20 e 21 di NF1 e l'esone 3 della  $\beta$ -globina. La sequenza del trascritto derivante dal vettore mutato invece evidenzia la perdita dell'esone 20 di NF1. Si può pertanto assumere che la mutazione IVS20+1 A>G nel gene NF1 comporti exon skipping dell'esone 20.

E' da notare che con il MG mutato non si osservano trascritti con splicing normale.

#### 4.6.1.2 Analisi della mutazione NF1 IVS 10b+1 delGTAA

Questa mutazione si trova una base dopo la fine dell' esone 10b ed è una delezione delle basi GTAA. E' stata amplificata la regione del gene *NF1* comprendente parte dell'introne 10a, l'esone 10b e parte dell'introne 10b del campione in esame. E' stata successivamente clonata nel minigene  $\beta$ -globina.

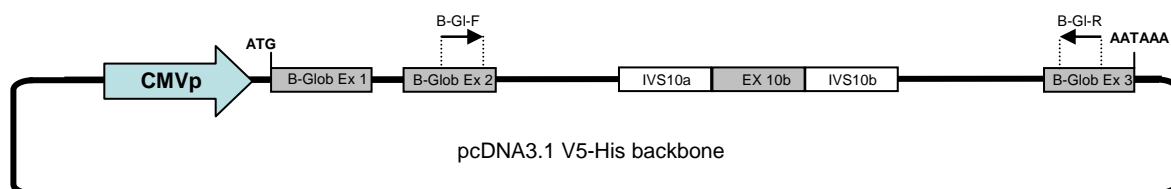


Fig.21. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 10b+1 delGTAA

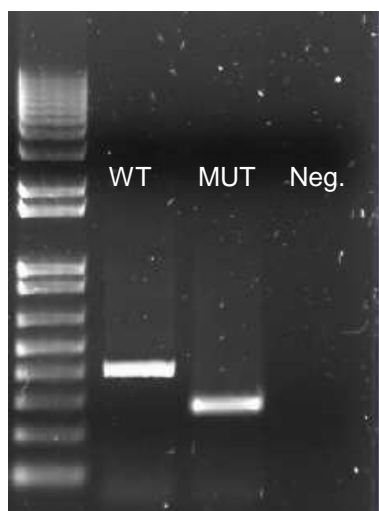


Fig.22. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 10b+1 delGTAA

Dopo trasfezione in cellule HeLa e amplificazione da retrotrascrizione con i primer dell' esone 2 e 3 della beta globina si nota un diverso pattern di corsa.

Anche in questo caso si nota già dall'analisi del gel (fig.22) come la mutazione provochi lo skipping dell'esone 10b di *NF1*. L'analisi di sequenza ha confermato il dato.

#### 4.6.1.3 Analisi della mutazione NF1 IVS 8+2 T>G

La mutazione in esame si trova due basi dopo la fine dell' esone 8. E' stata amplificata e clonata in MG  $\beta$ -globina la regione del gene NF1 comprendente parte dell'introne 6, l'esone 7, l'introne 7, l'esone 8 e parte dell'introne 8 del campione in esame.

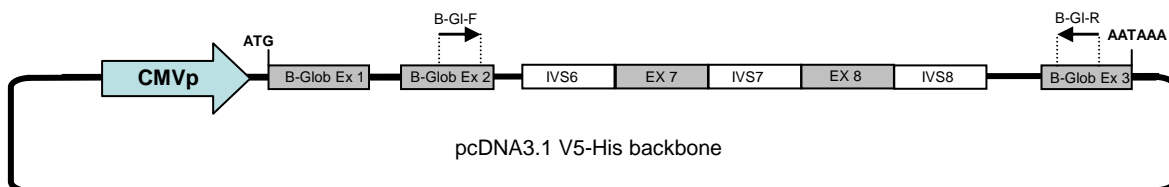


Fig.23. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 8+2 T>G

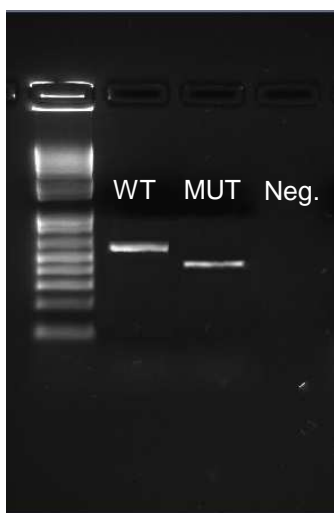


Fig.24. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 8+2 T>G

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa. Da quest'ultime è stato estratto l'RNA totale che è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici per l'esone 2 e l'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1%.

La corsa elettroforetica (fig.24) evidenzia come il pattern osservabile con il MG wild type sia nettamente diverso rispetto quello recante la mutazione.

Mediante il sequenziamento degli amplificati è stato dimostrato che minigene wild type presenta un corretto splicing che prevede la presenza dell'esone 2 della  $\beta$ -globina, degli esoni 7 e 8 di NF1 e dell'esone 3 di  $\beta$ -globina. La sequenza nucleotidica del trascritto ottenuto dal vettore mutato invece evidenzia la perdita dell'esone 8 di NF1. Si può pertanto assumere che la mutazione IVS8+2 T>G nel gene *NF1* comporti exon skipping dell'esone 8.

Anche in questo caso con il MG mutato non c'è la presenza di trascritti con splicing normale.

#### 4.6.1.4 Analisi della mutazione NF1 IVS 20+3 G>T

La mutazione testata si trova 3 basi dopo la fine dell' esone 20. Nel MG  $\beta$ -globina è stata amplificata e clonata la regione del gene NF1 comprendente parte dell'introne 19b, l'esone 20, l'introne 20, l'esone 21 e parte dell'introne 21 del campione in esame.

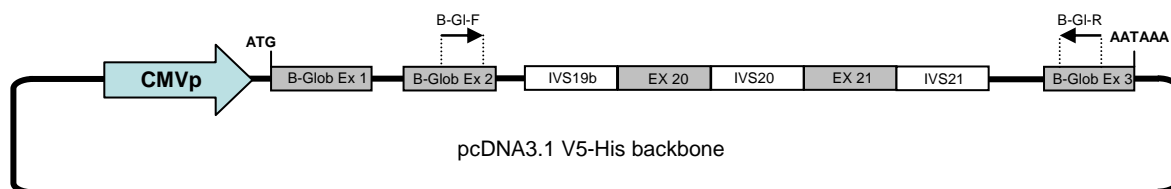


Fig.25. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 20+3 G>T

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild type, uno con l'allele mutato) sono stati quindi utilizzati per trasfettare cellule HeLa e dopo 48 ore è stato possibile estrarre l'RNA totale. L'RNA estratto è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 e all'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1%.

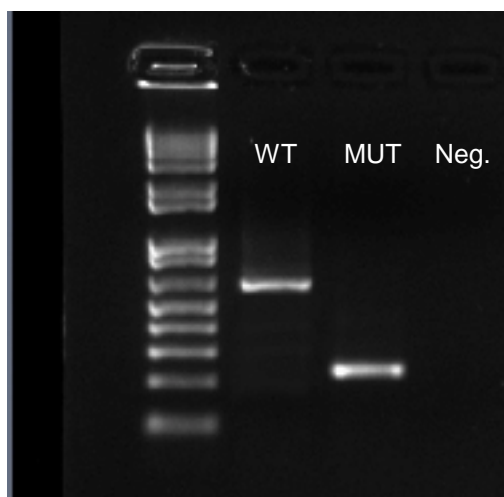


Fig.26. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 20+3 G>T

Si evidenzia facilmente che il MG wild-type presenta un corretto splicing che prevede la presenza dell' esone 2 della  $\beta$ -globina, degli esoni 20 e 21 di NF1 e dell'esone 3 della  $\beta$ -globina. Il vettore mutato invece rileva la perdita sia dell'esone 20 che dell'esone 21 di NF1. Si può pertanto assumere che la mutazione IVS20+3 G>T nel gene NF1 comporti exon skipping dell'esone 20 e dell'esone 21.

#### 4.6.1.5 Analisi della mutazione NF1 IVS 9a-19 G>A

La seguente mutazione si trova 19 basi prima dell' inizio dell' esone 10a del gene. E' stata amplificata la regione del gene NF1 comprendente parte dell'introne 9a, l'esone 10a e parte dell'introne 10a del campione ed in seguito clonata nel minigene  $\beta$ -globina.

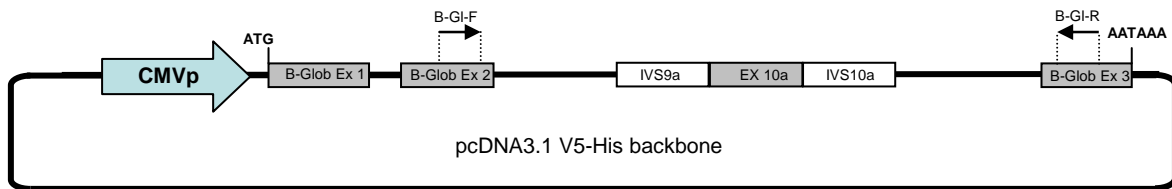


Fig.2. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 9a-19 G>A

Le cellule HeLa sono state transfettate con i minigeni ottenuti e analizzate come nei casi precedenti. In questo caso la corsa su gel di agarosio al 1% (fig.28) non ha evidenziato significative alterazioni.

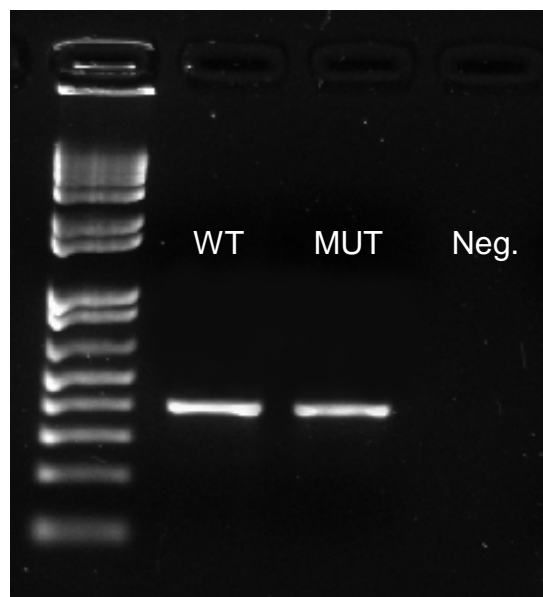
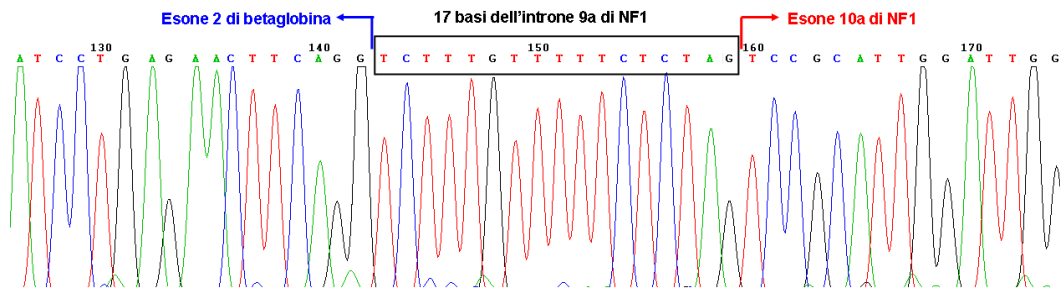


Fig.28. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 9a-19 G>A

Tuttavia il sequenziamento dei prodotti di RT-PCR ha dimostrato che il cDNA ottenuto dal vettore mutato presenta una ritenzione intronica di 17 basi a monte dell'esone 10a.

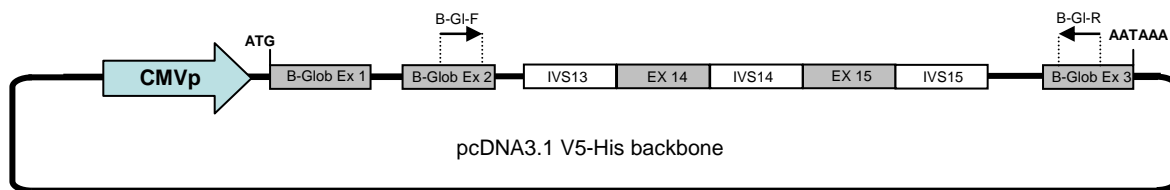




**Fig.29. Elettroferogramma della mutazione NF1 IVS 9a-19 G>A**

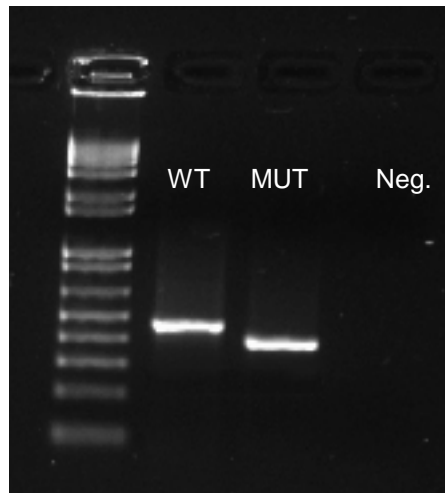
#### 4.6.1.6 Analisi della mutazione NF1 IVS 14+2 insT

La mutazione testata si trova 2 basi dopo l' esone 14 ed è un' inserzione di una T. E' stata clonata nel minigene  $\beta$ -globina la regione del gene *NF1* comprendente parte dell'introne 13, l'esone 14, l'introne 14, l'esone 15 e parte dell'introne 15 del campione in esame.



**Fig.30. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 14+2 insT**

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild-type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa dalle quali, dopo 48 ore, è stato estratto l'RNA. L'RNA totale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 del gene della  $\beta$ -globina e all'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1% (fig.31).

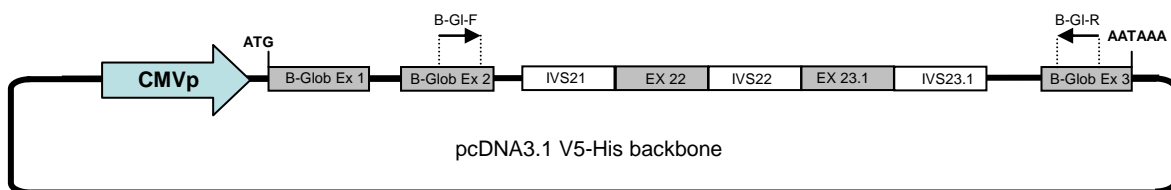


**Fig.31. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 14+2 insT**

Dalla corsa elettroforetica si evince che il minigene wild-type presenta un corretto splicing che prevede la presenza dell'esone 2 della  $\beta$ -globina, degli esoni 14 e 15 di *NF1* e dell'esone 3 di  $\beta$ -globina, mentre il trascritto ottenuto dal vettore mutato evidenzia invece la perdita dell'esone 14 di *NF1*. Tale dato è stato confermato con il sequenziamento. Si può pertanto assumere che la mutazione IVS 14+2 insT nel gene *NF1* comporti exon skipping dell'esone 14 di *NF1*.

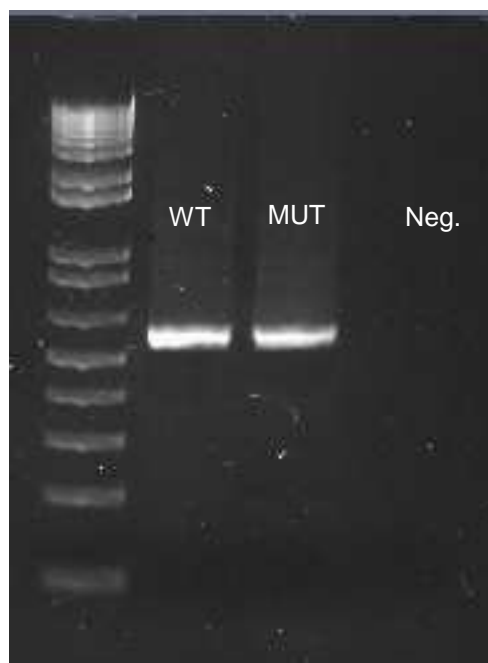
#### 4.6.1.7 Analisi della mutazione NF1 IVS 21-1 G>A

La mutazione in esame si trova 1 base prima dell'esone 22. E' stata amplificata e clonata nel minigene la parte del gene *NF1* che comprende parte dell'introne 21, l'esone 22, l'introne 22, l'esone 23.1 e parte dell'introne 23.1



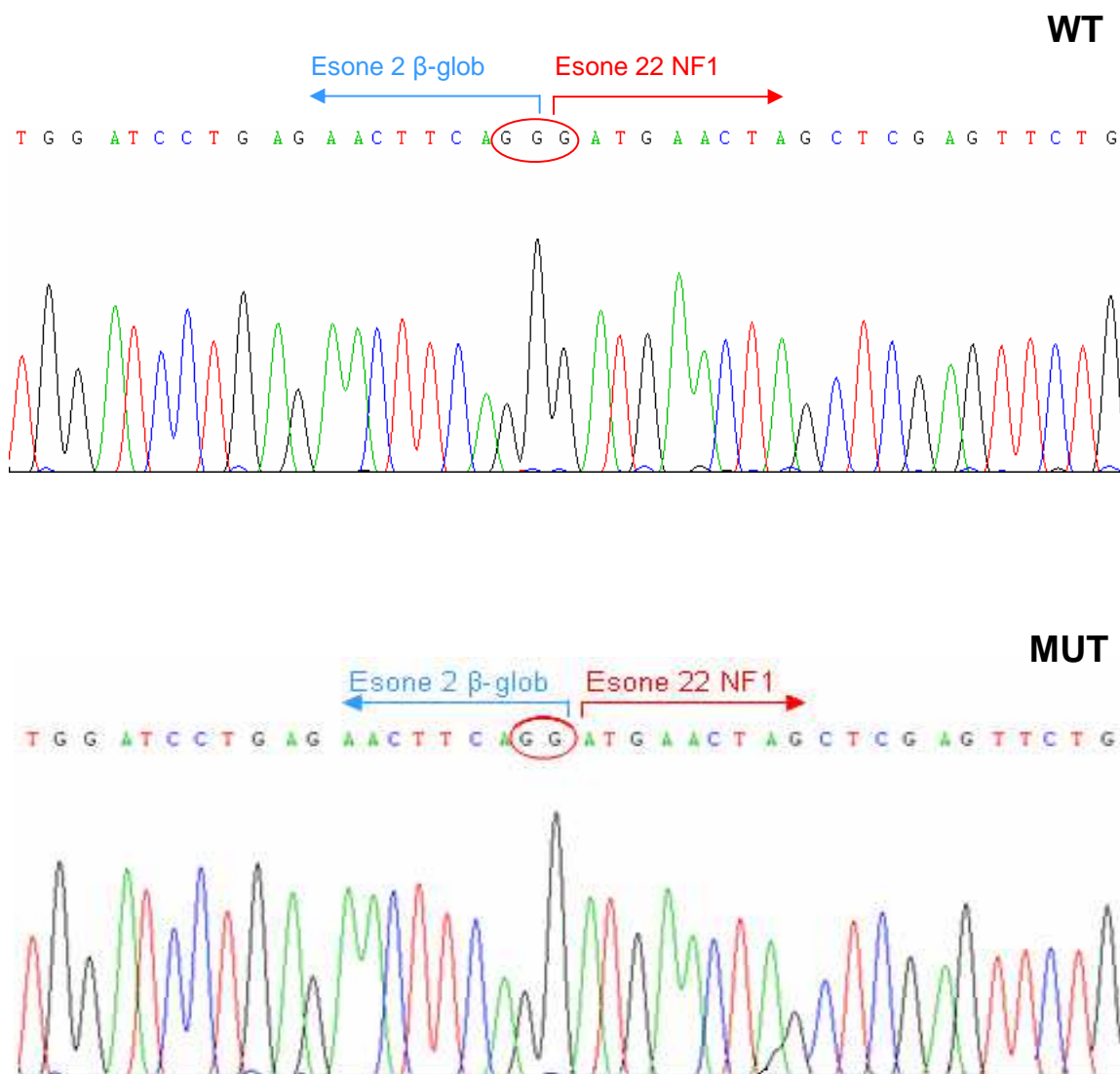
**Fig.32. Schema di clonaggio mutazione NF1 IVS 21-1 G>A**

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild-type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa dalle quali, dopo 48 ore, è stato estratto l'RNA. L'RNA totale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 del gene della  $\beta$ -globina e all'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1%.



**Fig.33. Gel di corsa elettroforetica della mutazione NF1 IVS 21-1 G>A**

In questo caso la corsa su gel di agarosio al 1% non ha evidenziato significative alterazioni. Tuttavia il sequenziamento dei prodotti di RT-PCR ha dimostrato che il cDNA ottenuto dal vettore mutato presenta una perdita della prima base dell' esone 22 del gene NF1 con il conseguente frameshift della lettura delle triplette per la traduzione in proteina.



**Fig.34. Elettroferogramma WT e MUT della mutazione NF1 IVS 21-1 G>A**

Gene	Mutazione	Risultato finale
NF1	IVS 20+1 G>A	Skipping esone 20
	IVS10b+1delGTAA	Skipping esone 10b
	IVS 8+2 T>G	Skipping esone 8
	IVS 20+3 G>T	Skipping esone 20 e 21
	IVS 9a-19 G>A	Ritenzione intronica di 17 basi
	IVS 14+2 ins T	Skipping esone 14
	IVS 21-1 G>A	Perdita prima base esone 22 e conseguente frameshift

**Tab.1. Tabella riassuntiva delle mutazioni studiate su NF1 con il Minigene β-globina Gateway**

## 4.6.2 Studio di mutazioni in *CFTR*

### 4.6.2.1 Analisi della mutazione *CFTR* c.274-6 T>C

La mutazione oggetto di studio si trova 6 basi prima dell' inizio dell' esone 4 del gene *CFTR*.E' stata amplificata e clonata nel minigene la parte del gene *CFTR* che comprende parte dell' introne 3, l' esone 4 e parte dell' introne 4.

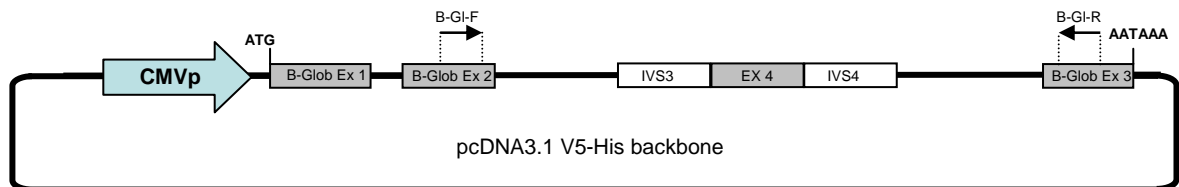


Fig.35 . Schema di clonaggio mutazione *CFTR* c.274-6 T>C

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild-type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa dalle quali, dopo 48 ore, è stato estratto l'RNA. L'RNA totale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 del gene della  $\beta$ -globina e all'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1%.

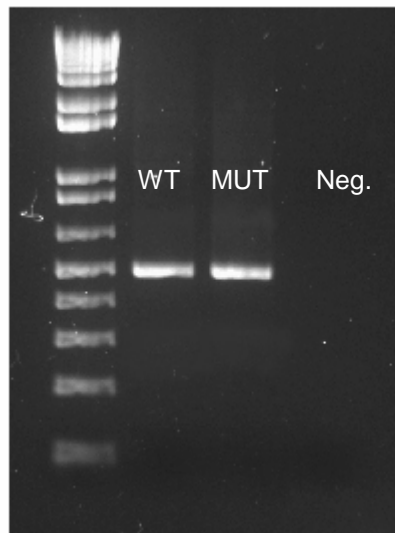
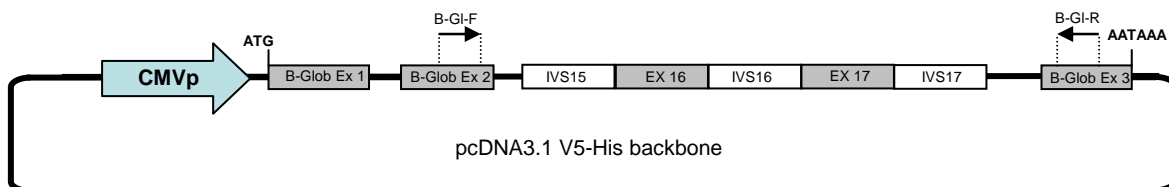


Fig.36. Gel di corsa elettroforetica della mutazione *CFTR* c.274-6 T>C

La foto del gel (fig.36) non sembra mostrare differenze di splicing tra il minigene WT e quello recante la mutazione in esame. Dopo sequenziamento si è osservato che la mutazione non influisce sul corretto splicing.

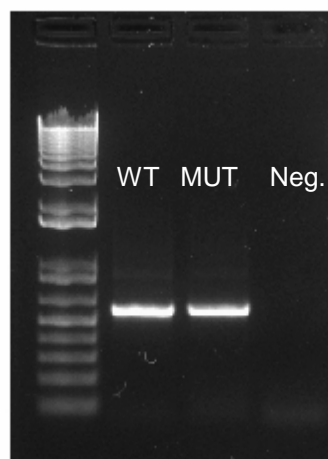
#### 4.6.2.2 Analisi della mutazione CFTR c.2752 - 26 A>G

La mutazione testata si trova 26 basi prima dell' esone 16 del gene *CFTR*. E' stata amplificata e clonata nel minigene la parte del gene *CFTR* che comprende parte dell' introne 15, l' esone 16, l' introne 16, l' esone 17 e parte dell' introne 17.



**Fig.37. Schema di clonaggio della mutazione CFTR c.2752-26 A>G**

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa dalle quali, dopo 48 ore, è stato estratto l'RNA. L'RNA totale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 del gene della  $\beta$ -globina e all'esone 3 della  $\beta$ -globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1% (fig.38).

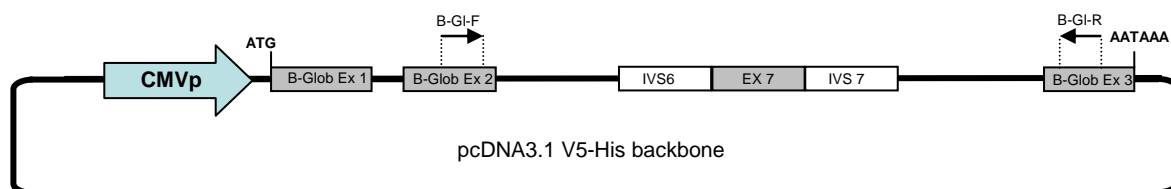


**Fig.38. Gel di corsa elettroforetica della mutazione CFTR c.2752-26 A>G**

Anche in questa variazione sembra non esserci differenza tra WT e MUT dopo la corsa elettroforetica. Dopo sequenziamento si è confermato che la mutazione non cambia lo splicing.

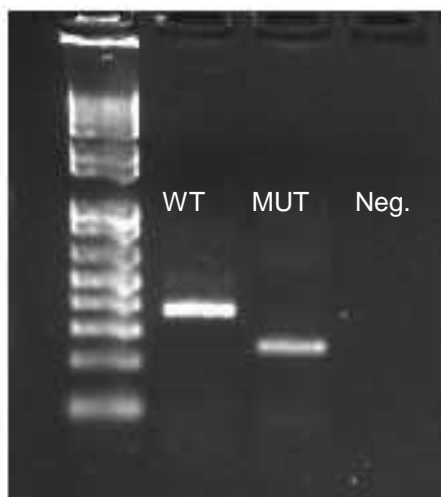
#### 4.6.2.3 Analisi della mutazione CFTR c.876 - 6 T>G

La mutazione studiata si trova 6 basi prima dell' esone 7 del gene CFTR. E' stata amplificata e clonata nel minigene la parte del gene CFTR che comprende parte dell' introne 6, l' esone 7 e parte dell' introne 7.



**Fig.39. Schema di clonaggio della mutazione CFTR c.876-6 T>G**

I costrutti selezionati (uno con l'allele wild type, uno con l'allele mutato) sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa dalle quali, dopo 48 ore, è stato estratto l'RNA. L'RNA totale è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando primer specifici complementari all'esone 2 del gene della β-globina e all'esone 3 della β-globina. I prodotti di trascrizione sono poi stati visualizzati su gel di agarosio al 1%.

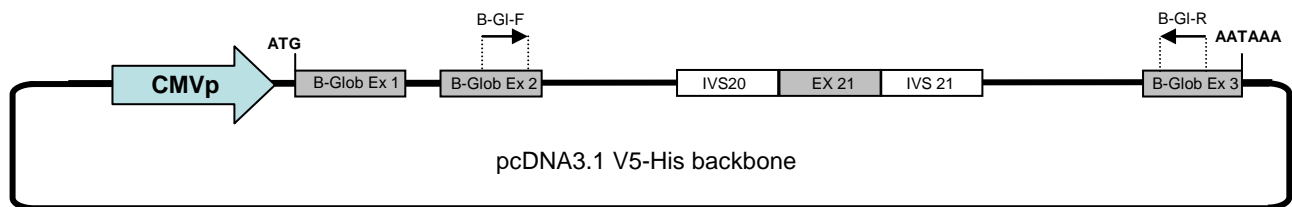


**Fig.40. Gel di corsa elettroforetica della mutazione CFTR c.876-6 T>G**

Dopo la corsa elettroforetica (fig.40) si possono notare i 2 differenti profili di splicing tra il minigene WT e MUT. Dopo sequenziamento si è osservato il completo skipping dell' esone 7 del gene CFTR.

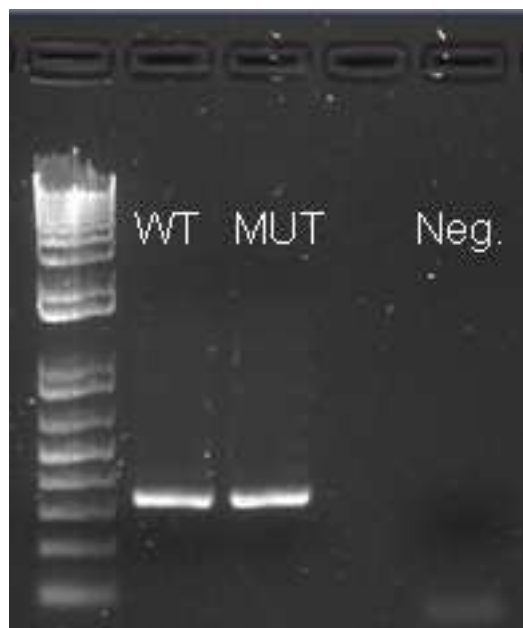
#### 4.6.2.4 Analisi della mutazione CFTR c.3468 + 51 C>A

La mutazione oggetto di analisi si trova 51 basi dalla fine dell' esone 21. E' stata clonata nel Minigene l' area del gene CFTR comprendente parte dell' introne 20, l' esone 21 e parte dell' introne 21.



**Fig.41. Schema di clonaggio della mutazione CFTR c.3468+51 C>A**

E' stato analizzato, previa trasfezione in cellule HeLa e successiva estrazione dell' RNA e amplificazione mediante PCR da retrotrascrizione con i primer dell' esone 2 e 3 della  $\beta$ -globina, il prodotto tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1%.



**Fig.42. Gel di corsa elettroforetica della mutazione CFTR c.3468+51 C>A**

Da come si può notare nell' immagine non c'è differenza come pattern di corsa tra il prodotto wild-type e mutato. Dal sequenziamento si è confermato questo dato.



#### 4.6.2.5 Analisi della mutazione CFTR c.1249-64 G>A

La mutazione oggetto di analisi si trova 64 basi prima dell' esone 8 del gene. E' stata amplificata la parte comprendente un frammento dell' introne 7, tutto l' esone 8 e parte dell' introne 8.

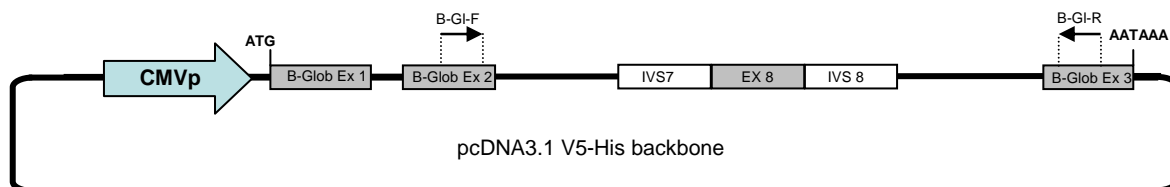


Fig.43. Schema di clonaggio della mutazione CFTR c.1249-64 G>A

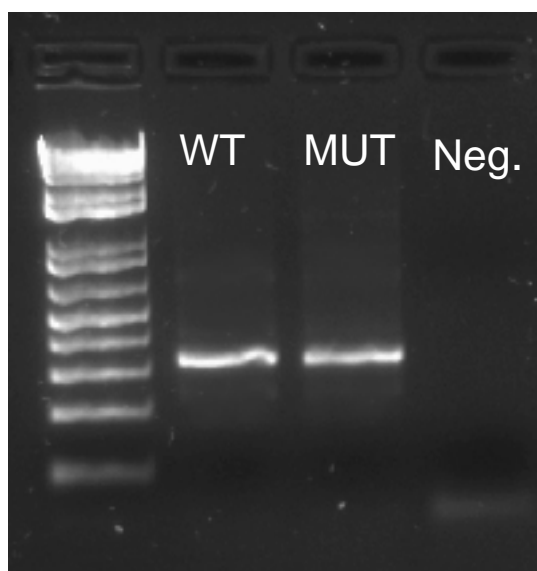


Fig.44. Gel di corsa elettroforetica della mutazione CFTR 3468+51 C>A

Come si può osservare dal gel di corsa (fig.44) non si nota differenza di pattern tra lo splicing del minigene ibrido wild-type e quello mutato. Dopo sequenziamento si è confermata la non patogenicità della mutazione.

Gene	Mutazione	Risultato finale
CFTR	CFTR 274-6 T>C	Nessuna differenza tra WT e MUT
	CFTR 2752 - 26 A>G	Nessuna differenza tra WT e MUT
	CFTR 876 - 6 T>G	Skipping esone 7
	CFTR 3468 + 51 C>A	Nessuna differenza tra WT e MUT
	CFTR 1249-64 G>A	Nessuna differenza tra WT e MUT

Tab.2. Tabella riassuntiva delle mutazioni studiate su CFTR con il Minigene  $\beta$ -globina Gateway

## 4.7 Studio di mutazione in esone 1

### 4.7.1 Analisi della mutazione COQ 6 IVS 1 +11 C>T

Le mutazioni nel gene *COQ6* sono state identificate mediante uno studio sistematico in un'ampia coorte di pazienti con sindrome nefrosica steroido resistente con esordio in età neonatale/pediatria (Heeringa SF et al, 2011). Nel corso dello studio è stato identificato un paziente con un'unica mutazione nonsense in eterozigosi, con in trans una variante intronica IVS 1 +11 C>T. Questa mutazione si trova 11 basi dopo la fine dell' esone 1 del gene *COQ6*. Nonostante la rarità della malattia, le dimensioni della coorte di pazienti in analisi rendevano possibile l'identificazione (casuale) di portatori sani di mutazioni in *COQ6*. Pertanto era fondamentale chiarire il ruolo della variante in trans IVS 1 +11 C>T.

La mutazione colpisce il primo introne del gene e pertanto è stato realizzato un costrutto in cui abbiamo fuso la porzione 5' dell' esone 1 del gene *COQ2* con la porzione 3' (i nucleotidi a valle dell'ATG di inizio traduzione) dell'esone 1 gene *COQ6*. Nei primers per l'amplificazione da DNA genomico sono stati inseriti i siti di restrizione *SacI* e *PstI* per il clonaggio nel vettore *COQ2-ASL* precedentemente utilizzato.

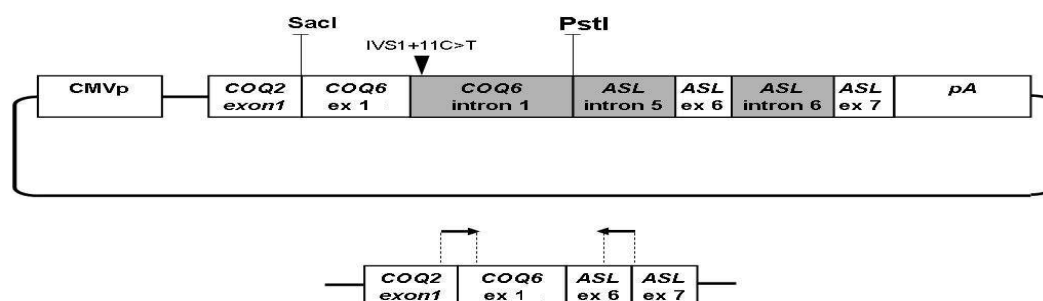
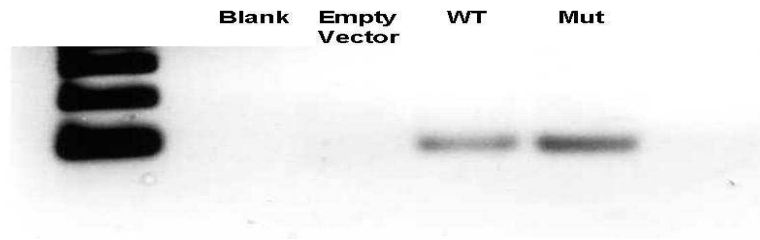


Fig.45. Schema di clonaggio mutazione *COQ6* IVS1+11C>T

La mutazione IVS1-11C>T è stata inserita mediante mutagenesi sito specifica.

Dopo trasfezione in cellule HeLa è stato analizzato, mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio, il pattern di splicing previa estrazione di RNA e successiva amplificazione da retro trascrizione.

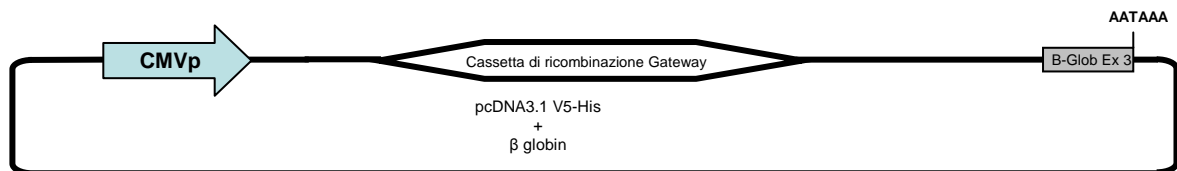


**Fig.46. Gel di corsa elettroforetica della mutazione COQ6 IVS1+11C>T**

Come si può notare non c'è differenza tra le altezze delle bande (fig.46) e la non patogenicità della mutazione è stata confermata mediante sequenziamento.

#### 4.8 Formazione del minigene $\beta$ -globina Gateway Esone 1

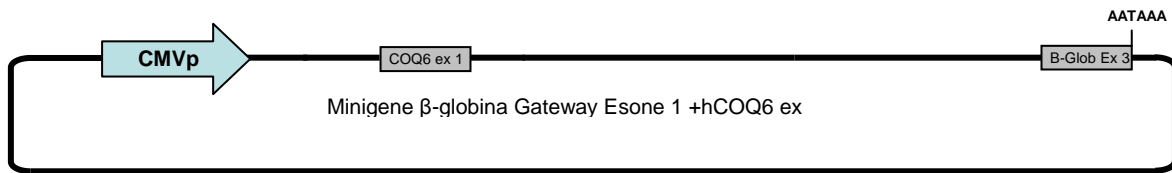
La necessità di studiare le mutazioni di splicing che affliggono il primo esone di un gene ha richiesto la formazione di un minigene che rendesse queste analisi veloci come le analisi delle mutazioni situate in altre parti del genoma. L'ottenimento di questo minigene è stata possibile grazie alla presenza dei siti di restrizione Hind III e BsrGI nel minigene classico con la  $\beta$ -globina che hanno permesso di togliere la parte di DNA che comprendeva sia il primo che il secondo esone della  $\beta$ -globina. Al loro posto è stata inserita una cassetta di ricombinazione.



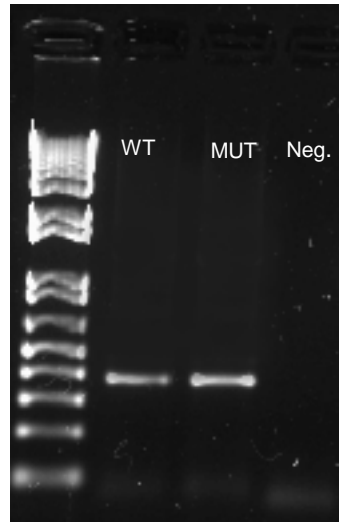
**Fig.47. Schema della formazione del Minigene  $\beta$ -globina Gateway Esone 1**

##### 4.8.1 Studio della mutazione COQ6 IVS 1 +11 C>T con minigene $\beta$ -globina Gateway Esone 1

La mutazione precedentemente studiata con il minigene precedente è stata analizzata anche con questo nuovo minigene sia per avere un metodo di test per il minigene e sia per avere un eventuale dato che avvalorasse la non patogenicità di questa mutazione.



**Fig.48. Schema di clonaggio mutazione COQ6 IVS1+11C>T**



**Fig.49. Gel di corsa elettroforetica della mutazione COQ6 IVS1+11C>T**

Le bande dello splicing presentano un'altezza anomala (fig.49) e dopo sequenziamento si è potuto notare che l'esone 1 di COQ 6 ha un corretto splicing ma viene ritenuto sia nel wild-type che nel mutato una parte dell'introne 1 del COQ6 e una parte dell'introne 2 della β-globina.

Da questo risultato si può evincere l'importanza dei siti ISI che regolano un corretto splicing fisiologico.

Attualmente stiamo valutando come creare un minigene alternativo per lo studio delle mutazioni di splicing che affliggono il primo esone del gene.

## 5. DISCUSSIONE

La necessità di ottenere un metodo semplice e rapido per studiare gli effetti di varianti genomiche che potrebbero potenzialmente interferire sul processo di splicing trova una valida soluzione nell' utilizzo di minigeni ibridi. Questa metodica si basa su vettori di espressione eucarioti al cui interno è clonato un gene che costituisce il "backbone" del sistema (nel nostro caso la beta globina) in cui a sua volta vengono clonati i frammenti genomici (wild-type o mutati) da analizzare. I costrutti vengono espressi in cellule ed i relativi trascritti vengono analizzati per valutare se e come le varianti in questione possono perturbare lo splicing del costrutto artificiale.

Questa metodica permette di evitare il ricorso all'utilizzo di RNA del paziente qualora esso non sia disponibile (o nei casi in cui la logistica del prelievo è complessa) o, soprattutto, nei casi in cui il gene in analisi non è espresso (o lo è molto poco) nei leucociti. In effetti, queste metodiche sono state infatti inizialmente sviluppate per lo studio di malattie quali la fibrosi cistica, in quanto il gene *CFTR* non è pressoché espresso nelle cellule del sangue (Baralle D et al., 2005).

L' utilizzo di minigeni classici è essenziale anche per studiare gli effetti di mutazioni in eterozigosi in quanto si può studiare separatamente lo splicing di ciascun allele, mentre l'analisi diretta del RNA del paziente in genere non permette di distinguere i trascritti derivanti da ciascuno dei due alleli. Infatti, in caso di alleli ipomorfi, è possibile evidenziare la presenza di una residua quota di trascritti correttamente processati, derivanti dall'allele mutato, informazione che non è ottenibile mediante lo studio diretto dei trascritti in quanto la presenza del prodotto dell' allele wild type interferisce con l'analisi (Forzan et al, 2010). Potere definire anche quantitativamente gli effetti di una mutazione è importante per prevedere i possibili effetti fenotipici. Per esempio, nel caso del gene *CFTR*, gli alleli che presentano un effetto incompleto sullo splicing si associano ad fenotipo meno grave di quelli in cui l' abolizione dell' espressione è completa (Pilewski J et al, 1999).

L' utilizzo di minigeni classici presenta però delle limitazioni in quanto non sempre i vettori possiedono siti di restrizione compatibili con il frammento di DNA in analisi e in questi casi il clonaggio di frammenti con estremità blunt ha efficienza bassa, soprattutto nel caso di frammenti di ampie dimensioni, con conseguente allungamento dei tempi (e della complessità) dell'analisi. L'inserimento nel Minigene  $\beta$ -globina di una cassetta di ricombinazione Gateway permette di superare queste difficoltà e accorciare di molto i tempi di esecuzione dell'indagine.

In questo lavoro abbiamo studiato 16 mutazioni, 7 in *NF1*, 5 in *CFTR*, 1 ciascuno in *STK11*, *ASL*, *COQ6*, *AIP*. A questo scopo è stato sviluppato un vettore contenente il gene della beta globina in cui è stata inserita una cassetta Gateway all'interno dell'introne 2. Per tutte le mutazioni studiate l'analisi è risultata conclusiva in quanto le alterazioni abolivano in maniera completa il corretto splicing del trascritto, oppure non avevano effetti visibili sul processamento del pre-mRNA.

Le varianti in *NF1* sono risultate tutte patologiche. Esse si possono dividere in 2 classi. La prima classe comprende mutazioni a livello intronico che coinvolgono direttamente i siti donatori e accettori di splicing e quindi verosimilmente patogene (IVS 20+1G>A, IVS 10b+1delGTAA, IVS8+2T>G, IVS14+2 insT e IVS21-1G>A) mentre la seconda classe comprende mutazioni introniche che non coinvolgono i siti canonici di splicing e quindi di interpretazione incerta (IVS20+3 G>T, IVS9a-19 G>A). Nella prima classe, come prevedibile, si è confermata sperimentalmente l'alterazione dello splicing in tutti i casi. Tuttavia anche per le mutazioni della seconda classe, abbiamo dimostrato la produzione di trascritti anomali. È da notare per tutte le mutazioni di questa seconda classe l'analisi bioinformatica non era risultata conclusiva e senza l'ausilio del minigene non si sarebbe potuto interpretare con sicurezza l'effetto della mutazione (e quindi fornire adeguata consulenza ai pazienti).

Per quanto riguarda lo studio di varianti nel gene *CFTR* si è reso indispensabile l'uso dei minigeni in quanto il gene *CFTR* non è pressoché espresso nelle cellule del sangue (Baralle D et al., 2005). Inoltre tutte queste varianti erano state identificate in individui sani, nel corso dello screening di portatore, pertanto la presenza dell'allele WT complicava l'analisi dei trascritti endogeni. Le varianti *CFTR* c.274-6 T>C, *CFTR* c.2752 - 26 A>G, *CFTR* c.3468 + 51 C>A e *CFTR* c.1249-64 G>A non provocavano alterazioni dello splicing del gene ibrido mentre la mutazione *CFTR* c.876 - 6 T>G provoca lo skipping dell'esone 7. Un ulteriore commento meritano le mutazioni *NF1* IVS 20+3 G>T e *STK11* c.291-1 G>A in quanto c'è uno skipping non solo dell'esone adiacente la mutazione ma anche del successivo. Il verificarsi di un salto inusuale di due esoni può essere spiegato con il diverso ordine di rimozione degli introni in questa regione. L'introne che si trova tra i due esoni viene rimosso rapidamente, rispetto ai due introni adiacenti, in modo che una grande *exon-like structure* può essere saltata (Takahara K et al, 2002). Come nel lavoro di Hori T et al, (2012) la mutazione potrebbe cambiare l'ordine di rimozione degli introni e causare il doppio exon skipping.

Anche mutazioni esoniche benchè non cambino la traduzione dell'aminoacido se situate a livello dei siti di splicing possono dar luogo ad splicing non corretti. Ad esempio la mutazione

nel gene ASL c.1062G>A nonostante non cambi l'amminoacido in posizione 354 (Gln354Gln) provoca lo skipping completo dell'esone 14.

L' utilizzo della metodica dei minigeni permette anche lo studio di mutazioni a livello dell' esone 1 di un gene. L'analisi della mutazione COQ6 IVS1+11 C>T è stato eseguita fondendo in un costrutto precedentemente sintetizzato nel nostro laboratorio l' esone 1 del gene *COQ2* con l' esone 1 del gene *COQ6* formando un unico esone (la regione 5'UTR del gene *COQ6* non è stata ancora caratterizzata). Grazie alla presenza del minigene wild-type si è potuto osservare che il macchinario di splicing ha riconosciuto l'esone ibrido come un esone unico e dopo mutagenesi si è potuto testare la presunta mutazione che è risultata invece non patologica. Stiamo cercando di sviluppare un sistema basato sulla tecnologia Gateway. Abbiamo modificato il vettore beta globina, tuttavia i primi esperimenti non hanno dato risultati del tutto incoraggianti in quanto il costrutto wild-type non veniva processato correttamente. Stiamo valutando se ciò è un problema intrinseco del nostro costrutto o se dipenda dalla struttura particolare del gene analizzato.

La metodica dei minigeni nonostante presenti oggettivi vantaggi non è priva di limitazioni in quanto è pur sempre un test in vitro e si costruisce artificialmente un gene ibrido. Tuttavia il confronto con il trascritto del costrutto wild type permette in genere di valutare la validità del sistema. Se il trascritto wild-type è processato correttamente, il minigene che è stato prodotto rispetta tutte quelle zone di regolazione che permettono allo spliceosoma una corretta maturazione dell'mRNA ed eventuali alterazioni riscontrate con il costrutto mutato sono verosimilmente legate alla presenza della mutazione.

In alcuni casi è possibile che l'efficienza di splicing degli esoni in esame non sia il 100% nemmeno nel wild type. Ciò può complicare l'analisi anche se non sempre il risultato è inattendibile. Inoltre ciò non è necessariamente legato al costrutto ibrido utilizzato, ma può essere una caratteristica fisiologica del gene in questione. Si veda per esempio il caso dell' esone 9 del gene ASL riportato in Trevisson E et al. (2007). In questi casi mediante l'utilizzo di primers specifici per il trascritto correttamente processato è possibile dimostrare che la mutazione abolisce completamente il corretto processamento del trascritto. In ogni caso, le mutazioni da noi analizzate non hanno presentato, nel wild type, splicing diversi da quello atteso.

Un'altra limitazione del metodo è che le anomalie dello splicing possono essere tessuto specifiche. In vari lavori (van Berge L. et al , 2012 e Dissiet A. et al, 2005) sono state analizzate, mediante l' uso di minigeni ibridi, gli effetti di mutazioni differenti sulla maturazione del mRNA. Nel lavoro riguardante mutazioni sul gene *DARS2* si è osservato che

la mutazione c.228-20 -21del TTinsC identificata sull' introne 2 rendeva lo skipping dell'esone 3 più marcato in cellule di origine neuronale che in quelle di altra origine. Infatti i segni clinici si presentavano in misura nettamente elevata su organi formati da cellule neurali piuttosto che sugli altri formati da cellule di origine embrionale diversa. Nel lavoro di Disset A et al, 2005, ad esempio, analizzavano l' effetto di una mutazione nel gene *CFTR* trovata in pazienti affetti da CBAVD (congenital bilateral absence of vas deferens). Ulteriori precedenti studi basati sull'analisi di biopsie da vasi deferenti, epididimo, epitelio testicolare ed epitelio respiratorio hanno dimostrato che viene prodotto meno CFTR funzionale nel tratto riproduttivo che nell' epitelio respiratorio (Teng H et al, 1997 e Larriba S, 1998), indipendentemente dal genotipo del tratto polipirimidinico (Tn) all' interno dell' introne 8 del gene *CFTR*. Questo può risultare un ostacolo per lo studio di mutazioni su alcuni geni. Tale problema è in parte aggirabile utilizzando linee cellulari derivate dal tessuto ove la mutazione esercita maggiormente la sua azione patologica.



## 6.CONCLUSIONI

Gli studi di mutazione su pazienti affetti da malattie genetiche e gli studi di screening di popolazione presentano un' enorme quantità di varianti genomiche trovate. Molte di queste non sono riportate in letteratura e l' effetto non è per nulla chiaro. Alcune si trovano in zone del DNA genomico che possono influire lo splicing dell' mRNA. Determinare l' effetto di una variante è indispensabile per dare una completa consulenza genetica. L' utilizzo di questa metodica, con i limiti descritti, può essere pensato di affiancamento alla diagnostica in quanto può dare utili indicazioni sull'effetto della mutazione sullo splicing dell'mRNA.



## 7. BIBLIOGRAFIA

Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, Estivill X, Lázaro C. *Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients*. J Med Genet (2003); 40: e82.

Baralle D, Baralle M. *Splicing in action-assessing disease causing sequence variations*. J Med Genet (2005) 42:737-748.

Barbosa P, Cialkowski M, O'Brien WE. *Analysis of naturally occurring and site-directed mutations in the argininosuccinate lyase gene*. J Biol Chem. (1991) ;266(8):5286-90.

Black, Douglas L.. *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annual Reviews of Biochemistry (2003) 72 (1): 291–336.

Bottillo I, De Luca A, Colapietro P, Schirinzi A, Guida V, Pizzetti A, Larizza L, Dalla Piccola B. *Mutazioni di splicing nell'esone 7 del gene NF1 associate all'eliminazione o all'introduzione di siti ESE: evidenze per la presenza di un'isoforma alternativa NF1-ΔE7 della neurofibromina*. (2005) Poster, SIGU 2005.

Brusilov S. W., Horwich A. L. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*(Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., editors. eds) (2001) pp. 1909–1964, McGraw-Hill, New York.

Caceres JF and Kornblihtt AR. *Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease*. Trends Genet. (2002) 18, 186-193.

Cartegni L, Chew SL, and Krainer AR. *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. (2002) Nat Rev Genet 3, 285-298.

Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, et al. *Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts*. Genomics (1990); 7: 555-65.

Daston MM, Scrabble H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. *The protein product of neurofibromatosis type 1 gene is expressed at the highest abundance in neurons, Schwann cells and oligodendrocytes.* Neuron (1992) 8: 415-428.

Disset, A., Michot, C., Harris, A., Buratti, E., Claustres, M. and Tuffery-Giraud, S. *A T3 allele in the CFTR gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD).* Hum. Mutat. (2005) 25, 72–81

Fashold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Küçükceylan N, Abdel- Nour M, Gewies A, Peters H, Kauffman D, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P. *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 Genet. (2000); 66: 790-818.

Fernandez-Medarde A, Santos E, *Ras in cancer and developmental diseases.* Gene Cancer (2011); 2(3):344-58.

Forcet C, Etienne-Manneville S, Gaude H, Fournier L, Debilly S, Salmi M, Baas A, Olschwang S, Clevers H, Billaud M. *“Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity”.* Hum Mol Genet. (2005) 15;14(10):1283-92.

Forzan M, Salviati L, Pertegato V, Casarin A, Bruson A, Trevisson E, Di Gianantonio E, Clementi M. *Is CFTR 621+3 A>G a cystic fibrosis causing mutation?* J Hum Genet. (2010);55(1):23-6.

Gin P., Hsu A.Y., Rothman S.C., Jonassen T., Lee P.T., Tzagoloff A., Clarke C.F.. *The Saccharomyces cerevisiae COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis.* J. Biol. Chem. (2003) 278, 25308-25316.

Guigó R, Knudsen S, Drake N, Smith T. *Prediction of gene structure.* J Mol Biol. (1992); 226(1):141-57.

Han S, Cooper D, Upadhyaya M. *Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.* Hum. Genet. (2001) 109:487-497.

Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, Xie LX, Salviati L, Hurd TW, Vega-Warner V, Killen PD, Raphael Y, Ashraf S, Ovunc B, Schoeb DS, McLaughlin HM, Airik R, Vlangos CN, Gbadegesin R, Hinkes B, Saisawat P, Trevisson E, Doimo M, Casarin A, Pertegato V, Giorgi G, Prokisch H, Rötig A, Nürnberg G, Becker C, Wang S, Ozaltin F, Topaloglu R, Bakkaloglu A, Bakkaloglu SA, Müller D, Beisert A, Mir S, Berdeli A, Varpizen S, Zenker M, Matejas V, Santos-Ocaña C, Navas P, Kusakabe T, Kispert A, Akman S, Soliman NA, Krick S, Mundel P, Reiser J, Nürnberg P, Clarke CF, Wiggins RC, Faul C, Hildebrandt F. *COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness.* J Clin Invest. (2011) ;121(5):2013-24.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA (1998 Jan). *A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome.* Nature;391(6663):184-7  
Hum Mutat. (1998) (7):694-702.

Hori T, Fukao T, Murase K, Sakaguchi N, Harding CO, Kondo N. *Molecular basis of two exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in OXCT1 gene: Study on intermediates of OXCT1 transcripts in fibroblasts.*  
Hum Mutat. (2012)

Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Müller O, Back W, Zimmer M. *"Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase".* Nature Genetics (1998) 18 (1): 38–43.

Keren, H. *Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function.* Nature Reviews Genetics (2010) 11 (5): 345-355.

Kleijer WJ, Garritsen VH, Linnebank M, Mooyer P, Huijmans JG, Mustonen A, Simola KO, Arslan-Kirchner M, Battini R, Briones P, Cardo E, Mandel H, Tschiedel E, Wanders RJ,

Koch HG. *Clinical, enzymatic, and molecular genetic characterization of a biochemical variant type of argininosuccinic aciduria: prenatal and postnatal diagnosis in five unrelated families.*

J Inherit Metab Dis. 2002 (5):399-410.

Larriba S, Bassas L, Gimenez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V, Estivill X, Casals T.. *Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens.* Hum Mol Genet (1998) 7:1739–1743.

Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil S.,Robertson M, White R, Viskochil D. *Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1).* Genomics (1995);25(1):9-18.

Lim W, Hearle N, Shah B, Murday V, Hodgson SV, Lucassen A, Eccles D, Talbot I, Neale K, Lim AG, O'Donohue J, Donaldson A, Macdonald RC, Young ID, Robinson MH, Lee PW, Stoodley BJ, Tomlinson I, Alderson D, Holbrook AG, Vyas S, Swarbrick ET, Lewis AA, Phillips RK, Houlston RS. “*Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome.*” Br J Cancer. (2003) 21;89(2):308-13.

Linnebank M, Homberger A, Rapp B, Winter C, Marquardt T, Harms E, Koch HG. *Two novel mutations (E86A, R113W) in argininosuccinate lyase deficiency and evidence for highly variable splicing of the human argininosuccinate lyase gene.*

J Inherit Metab Dis. (2000);23(4):308-12.

Linnebank M, Tschiedel E, Häberle J, Linnebank A, Willenbring H, Kleijer WJ, Koch HG. *Argininosuccinate lyase (ASL) deficiency: mutation analysis in 27 patients and a completed structure of the human ASL gene.*

Hum Genet. (2002) ;111(4-5):350-9.

Lopez L.C., Schuelke M., Quinzii C.M., Kanki T., Rodenburg R.J., Naini A., Dimauro, S and Hirano M.. *Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to dcaprenyl diphosphate synthase subunit2 (PDSS2) mutations.* Am. J. Hum. Genet. (2006) 79, 1125-1129.

Mattocks C, Baralle D, Tarpey P, French-Constant C, Bobrow M, Whittaker J. *Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11-17 distinct from the GAP related domain.* J Med Genet (2004); 41: e48.

Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, De Paepe A. *Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects.* Human Mutation. (2000); 15: 541-555.

Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D, Delahodde A, Bacq D, de Lonlay P, Munnich A, Rötig A. *Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders.* J Clin Invest. (2007);117(3):765-72.

Montini G., Malaventura C., Salviati L. *Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency.* N. Engl J. Med (2008) 26, 2849-50.

Occhi G, Trivellin G, Ceccato F, De Lazzari P, Giorgi G, Demattè S, Grimaldi F, Castello R, Davì MV, Arnaldi G, Salviati L, Opocher G, Mantero F, Scaroni C. *Prevalence of AIP mutations in a large series of sporadic Italian acromegalic patients and evaluation of CDKN1B status in acromegalic patients with multiple endocrine neoplasia.* Eur J Endocrinol. (2010) ;163(3):369-76.

Ogasahara S., Engel A. G., Frens D, Mack D.1989. *Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy.* Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. **86**, 2379-2382.

Pagani F, Baralle FE. *Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers.* Nat Rev Genet. (2004) ;5(5):389-96. Review.

Pagani F, Stuani C, Zuccato E, Kornblihtt AR and Baralle FE. *Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping.* J Biol Chem (2003) 278, 1511–1517.

Pagani F, Baralle FE. *Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers*. Nat Rev Genet. (2004);5(5):389-96. Review.

Pilewski, J. M., and Frizzell, R. A.. *Role of CFTR in airway disease*. Physiol Rev (1999) 79, S215-255.

Pros E, Gòmez C, Martìn T, Fàbregas P, Serra E, Làzaro C. *Nature and mRNA effect of 282 different NF1 point mutation: focus on splicing alteration*. Human Mutation (2008); 26: E173-E193.

Quinzii C., Naini A., Salviati L., Trevisson E., Navas P., Dimauro S., and Hirano M. *A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) caprimary coenzyme Q10 deficiency*. Am. J. Hum. Genet. . (2006) 78, 345-349.

Quinzii CM, Kattah AG, Naini A, Akman HO, Mootha VK, DiMauro S, Hirano M. *Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation*. Neurology (2005) 64:539–541.

Ratjen, F., and Doring, G.. *Cystic fibrosis*. Lancet (2003) 361, 681-689.

Rötig A., Appelkvist E.L., Geromel V., Chretien D., Kadhon, N., Edery P. *Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency*. Lancet (2000) 356, 391-395.

Ruggieri M e Tenconi R. *Le Neurofibromatosi*. Associazione Linfa, *Lottiamo Insieme per la Neurofibromatosi- ONLUS-* (2001).

Salviati L., Sacconi S., Murer L., Zacchello G., Franceschini L., Laverda A.M., Basso G., Quinzii C., Angelini, C. and Hirano M. *Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition*. Neurology(2005) 65, 606-608.

Snajderova M, Riccardi VM, Petrak B, Zemkova D, Zapletalova J, Mardesic T, Petrakova A, Lanska V, Marikova T, Bendova S, Havlovicova M, Kaluzova M, *The Importance of*



*Advanced Parental Age in the Origin of Neurofibromatosis Type 1.* AJ Med. Genet. (2011); Am J Med Genet Part A 158A:519–523.

Strachan T, Andrew PR. *Genetica molecolare umana*. III ed. UTET

Sun H and Chasin LA. *Multiple splicing defect in an intronic false exon.* Mol. Cell. Biol. (2000) 20: 6414–6425.

Takahara K, Schwarze U, Imamura Y, Hoffman GG, Toriello H, Smith LT, Byers PH, Greenspan DS.. *Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-alpha1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I.* Am J Hum Genet (2002) 71:451-465.

Teng H, Jorissen M, Van Poppel H, Legius E, Cassiman JJ, Cuppens H.. *Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells.* Hum Mol Genet (1997) 6:85–90.

Treglia G, Taralli S, Bertagna F, Salsano M, Muoio B, Novellis P, Vita ML, Maggi F, Giordano A, *Usefulness of whole-body fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with neurofibromatosis type 1: a systematic review.* Radiol Res. Pract. (2012); 431029.

Trevisson E, Salviati L, Baldoin MC, Toldo I, Casarin A, Sacconi S, Cesaro L, Basso G, Burlina AB. *Argininosuccinate lyase deficiency: mutational spectrum in Italian patients and identification of a novel ASL pseudogene.* Hum Mutat. (2007) (7):694-702.

Upadhyaya M, Osborn MJ, Maynard J, Kim MR, Tamanoi F, Cooper DN. *Mutational and functional analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.* Hum Genet (1997); 99: 88-92.

Valero MC, Martin Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleàn G, Valero AM, Javier Rodriguez-Alvarez F, Tellerìa D, Hernández-Chico C, *A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations.* J. Mol. Diagn. (2011); 13(2):113-22.

van Berge L, Dooves S, van Berkel CG, Polder E, van der Knaap MS, Scheper GC. *Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation is associated with cell-type-dependent splicing of mtAspRS mRNA*. *Biochem J.* (2012) 1;441(3):955-62.

Vankeerberghen, A., Cuppens, H., and Cassiman, J. J.. *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions*. *J Cyst Fibros* (2002) 1, 13-29.

Vignal L, d'Aubenton-Carafa Y, Lisacek F, Mephu Ngüifo E, Rouzé P, Quinqueton J, Thermes C. *Exon prediction in eucaryotic genomes*. *Biochimie.* (1996);78(5):327-34.

## 8. PUBBLICAZIONI

Occhi G, Trivellin G, Ceccato F, De Lazzari P, Giorgi G, Demattè S, Grimaldi F, Castello R, Davì MV, Arnaldi G, Salviati L, Opocher G, Mantero F, Scaroni C. *Prevalence of AIP mutations in a large series of sporadic Italian acromegalic patients and evaluation of CDKN1B status in acromegalic patients with multiple endocrine neoplasia.*  
Eur J Endocrinol. (2010);163(3):369-76.

Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, Xie LX, Salviati L, Hurd TW, Vega-Warner V, Killen PD, Raphael Y, Ashraf S, Ovunc B, Schoeb DS, McLaughlin HM, Airik R, Vlangos CN, Gbadegesin R, Hinkes B, Saisawat P, Trevisson E, Doimo M, Casarin A, Pertegato V, Giorgi G, Prokisch H, Rötig A, Nürnberg G, Becker C, Wang S, Ozaltin F, Topaloglu R, Bakkaloglu A, Bakkaloglu SA, Müller D, Beissert A, Mir S, Berdeli A, Varpizen S, Zenker M, Matejas V, Santos-Ocaña C, Navas P, Kusakabe T, Kispert A, Akman S, Soliman NA, Krick S, Mundel P, Reiser J, Nürnberg P, Clarke CF, Wiggins RC, Faul C, Hildebrandt F. *COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness.*  
J Clin Invest. (2011) 1(5):2013-24.

Casarin A, Giorgi G, Pertegato V, Siviero R, Cerqua C, Doimo M, Basso G, Sacconi S, Cassina M, Rizzuto R, Brosel S, Davidson MM, Dimauro S, Schon EA, Clementi M, Trevisson E, Salviati L. *Copper and bezafibrate cooperate to rescue cytochrome c oxidase deficiency in cells of patients with sco2 mutations.*  
Orphanet J Rare Dis. (2012) ;7(1):21.