



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato in Genetica Medica XX Ciclo

Direttore: Prof. Bruno Dallapiccola

Tesi sperimentale

## **INNOVAZIONI TECNOLOGICHE PER LO STUDIO DELLA COMPLESSITÀ DEL GENOMA UMANO**

Dottoranda

Dott.ssa Irene Bottillo

Relatore

Prof. Bruno Dallapiccola

A.A. 2007-2008





# Indice

Il genoma umano e il paradosso del valore C.....	8
DNA non codificante.....	9
Introni.....	9
Sequenze Regolatrici.....	9
Elementi ripetuti.....	9
Trasposoni.....	9
Pseudogeni.....	10
RNA non codificanti.....	10
Junk DNA.....	11
Variazioni del numero di copie (CNV).....	12
Meccanismi di regolazione genica.....	12
Splicing alternativo.....	13
RNA editing.....	14
Promotori alternativi.....	14
Fenomeni epigenetici.....	15
Modificazioni post-traduzionali.....	15
Nuove tecnologie per lo studio della complessità genomica.....	16
MLPA.....	16
PCR real time.....	16
Minigene assay.....	17
SNP array.....	19
Un esempio di complessità genomica: il gene <i>NF1</i> .....	20
Struttura.....	20
Espressione.....	22
Il promotore.....	22
La regione al 3'.....	22

Modificazioni post-trascrizionali.....	23
Isoforme.....	23
RNA editing .....	24
La proteina .....	24
La neurofibromatosi di tipo 1 (NF1:MIM#162200) .....	27
Tumori e NF1.....	27
Epidemiologia genetica.....	29
Mutazioni <i>de novo</i> .....	29
Patologia molecolare.....	30
Mutazioni somatiche .....	31
Neurofibromatosi tipo 1 a mosaico (segmentale) .....	34
Scopo del lavoro .....	36
Parte 1 – Sviluppo di un protocollo MLPA-real time PCR per la ricerca di delezioni-duplicazioni singolo-multiesoniche.....	38
Materiali e metodi.....	38
Pazienti.....	38
Analisi MLPA .....	38
PCR real time mediante chimica SYBR green.....	39
FISH .....	40
Risultati .....	40
Discussione.....	46
Parte 2 - Analisi di una delezione intragenica in un caso di mosaicismo germinale .....	52
Materiali e metodi.....	52
Pazienti.....	52
Analisi indiretta .....	52
Analisi mutazionale.....	52
PCR real time: analisi TaqMan .....	56
Risultati .....	57

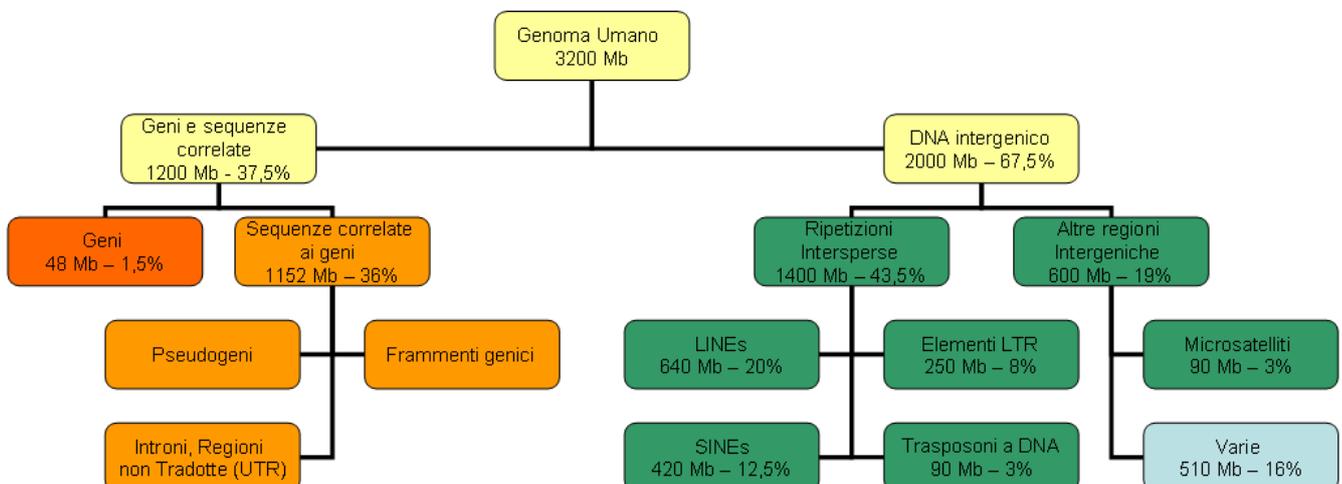
Discussione.....	62
Parte 3 – Sviluppo di un minigene assay per l’analisi delle mutazioni di splicing.....	65
Materiali e metodi.....	65
Mutazioni esaminate.....	65
Analisi <i>in silico</i> delle mutazioni .....	65
Costruzione e espressione del vettore minigene .....	66
Risultati .....	70
Discussione.....	72
Parte 4 - Caratteristiche molecolari dei tumori della guaina dei nervi periferici in casi sporadici e in soggetti affetti da neurofibromatosi 1 .....	76
Materiali e metodi.....	76
Campioni tumorali.....	76
Ricerca di mutazioni nel gene <i>NF1</i> .....	76
Ricerca di mutazioni puntiformi nei geni <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> .....	76
Risultati .....	77
Mutazioni di <i>NF1</i> germinali .....	77
Mutazioni di <i>NF1</i> somatiche negli MPNST <i>NF1</i> -associati.....	77
Mutazioni di <i>NF1</i> somatiche negli MPNST sporadici .....	78
Mutazioni di <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> somatiche.....	78
Discussione.....	82
Parte 5 – Mutazioni dei geni del pathway di <i>Ras</i> nel cancro coloretale sporadico.....	84
Materiali e metodi.....	84
Campioni tumorali.....	84
Ricerca di mutazioni nel gene <i>NF1</i> .....	84
Ricerca di mutazioni puntiformi nei geni <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> .....	84
PCR metilazione-specifica (MSP) del gene <i>RASSF1A</i> .....	85
Risultati .....	85
<i>NF1</i> .....	85

<i>KRAS</i> .....	85
<i>BRAF</i> .....	86
<i>RASSF1A</i> .....	86
Alterazione della cascata del segnale di <i>Ras</i> .....	86
Discussione.....	89
Conclusioni .....	91
Pubblicazioni.....	93
Bibliografia .....	95

## Il genoma umano e il paradosso del valore C

Circa il 98.5% del genoma umano è composto di sequenze non codificanti per proteine <sup>1</sup>. Si definisce DNA non codificante ogni sequenza di DNA in un genoma non soggetta a trascrizione in RNA o rimossa dall'mRNA prima della traduzione e che viene perciò considerata, allo stato attuale delle conoscenze, apparentemente priva di funzione, nonostante diverse ipotesi in merito siano state formulate.

Il termine C-value (valore C) si riferisce alla quantità di DNA contenuto in nel nucleo di una cellula aploide (ad esempio un gamete) <sup>2</sup>. Il C-value varia enormemente tra le specie viventi. Nel regno animale, esso può variare di oltre 3300 volte <sup>2</sup>. Le variazioni di C-value, in ogni caso, non sono in nessun modo correlate con la complessità degli organismi o il numero di geni contenuti nei genomi <sup>2</sup>. Tale semplice osservazione è stata a lungo ritenuta un controsenso, soprattutto prima della scoperta e caratterizzazione del DNA non codificante, ed ha portato alla formulazione del paradosso del C-value <sup>2</sup>. Il numero di geni umani sembra essere infatti 100 volte meno grande rispetto a quello di organismi molto più semplici, come *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* <sup>2</sup>. La maggior parte dei geni umani ha esoni multipli e degli introni, che sono frequentemente molto più lunghi degli esoni fiancheggianti <sup>2</sup>. I geni umani sono distribuiti in maniera non uniforme lungo i cromosomi. Ogni cromosoma contiene varie regioni ricche di geni e poveri di geni, che sembrano correlate con le bande cromosomiche ed il contenuto in basi GC. Il significato di questa alternanza non casuale di densità genica non è ben compresa allo stato attuale della conoscenza scientifica. In aggiunta ai geni codificanti proteine, il genoma umano contiene inoltre diverse migliaia di geni codificanti un RNA incluso il tRNA, l'RNA ribosomico, microRNA, ed altri geni ad RNA non codificanti.



## **DNA non codificante**

### Introni

Le regioni introniche (circa il 26% dell'intero genoma) derivano probabilmente da artefatti evolutivi <sup>3</sup>. La rimozione o il danneggiamento *in vitro* di sequenze introniche di un gene produce il non funzionamento del trascritto esattamente come se ad essere rimossa fosse una regione codificante.

### Sequenze Regolatrici

Il genoma umano ha molte differenti sequenze regolatrici che sono cruciali nel controllare l'espressione del gene. Queste sono di solito brevi sequenze che appaiono in prossimità ed all'interno dei geni. Una conoscenza sistematica di queste sequenze regolatrici e di come agiscano assieme in una rete regolatrice genica sta cominciando solo ora ad emergere dall'alta capacità di trattare informazioni attraverso gli studi di genomica comparata <sup>4</sup>.

### Elementi ripetuti

Ripetizioni in tandem: regioni di DNA costituite da sequenze di due o più nucleotidi ripetute una di seguito all'altra <sup>5</sup>. Si dividono in:

DNA minisatellite: corte sequenze ripetute in tandem di DNA (10-100 bp).

DNA microsatellite: unità di ripetizione molto corte (1-5 bp)

### Trasposoni

Elementi genetici capaci di spostarsi da una posizione all'altra del genoma <sup>6</sup>. Si dividono in:

Retrotrasposoni: frammenti di DNA capaci di trasciversi autonomamente in un intermedio ad RNA e replicarsi in diverse posizioni all'interno del genoma

Retrotrasposoni dotati di LTR: presentano alle estremità delle lunghe sequenze ripetute terminali (LTR, Long Terminal Repeat). Costituiscono approssimativamente l'8% del genoma umano.

Retrotrasposoni non dotati di LTR: non presentano sequenze ripetute alle estremità.

LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) <sup>7</sup>: lunghe sequenze di DNA (di più di 5000 coppie di basi). Codificano per 2 geni, uno dei quali presenta attività di trascrittasi

inversa e di integrasi, permettendo la copia e la trasposizione sia di loro stessi, sia di altre sequenze non codificanti (come le SINE). Poiché traspongono replicandosi, le LINE son in grado di accrescere la grandezza di un genoma. Il genoma umano, per esempio, contiene oltre 900.000 LINE, che costituiscono all'incirca il 21% dell'intero genoma.

SINE (Short Interspersed Nuclear Elements)<sup>8</sup>: brevi sequenze di DNA intersperse (di meno di 500 coppie di basi). Raramente vengono, e non codificano per la trascrittasi inversa; hanno perciò bisogno delle proteine codificate da altre sequenze (come le LINE) per trasporre. Appartengono alla famiglia delle sequenze Alu, capaci di legare l'enzima Alu I. Presenti nel genoma umano in oltre 1 milione di copie, le SINE costituiscono all'incirca l'11% del patrimonio genetico totale.

### Trasposoni a DNA

#### Pseudogeni

Sequenze di nucleotidi simile a geni (a livello di struttura), ma priva di alcuna espressione all'interno della cellula. Solitamente si tratta di geni ancestrali che hanno perso la capacità di essere espressi. Sebbene mantengano a volte alcune strutture tipiche dei geni (promotore, isole CpG o siti di splicing), queste sequenze non sono in grado di generare un prodotto proteico funzionale, spesso a causa di mutazioni genetiche consolidate durante l'evoluzione<sup>9</sup>.

#### RNA non codificanti

Trascritti genici che non vanno incontro a traduzione. L'RNA non codificante può svolgere diverse funzioni: può essere un RNA ribosomiale (rRNA), RNA transfer (tRNA) oppure può essere un componente di complessi enzimatici implicati nei processi di trascrizione, replicazione, splicing e in altri processi riguardanti l'espressione genica<sup>10-13</sup>.

tRNA. L'RNA transfer (o RNA di trasporto), è una piccola catena di RNA (di 74-93 nucleotidi) che trasferisce un amminoacido specifico ad una catena polipeptidica in crescita al sito ribosomiale della sintesi proteica durante la traduzione.

rRNA. L'RNA ribosomiale è la tipologia più abbondante di RNA presente nella cellula. E' il componente essenziale dei ribosomi.

snRNA. Gli small nuclear RNA (piccolo RNA nucleare) sono piccole molecole di RNA che partecipano alla maturazione dell'mRNA. Tali molecole sono sempre associate a

proteine specifiche, con cui formano complessi noti come small nuclear ribonucleoproteins (piccole ribonucleoproteine nucleari, o snRNP).

miRNA. I micro RNA sono piccole molecole di RNA di 20-22 nucleotidi che svolgono diverse funzioni, la più nota attualmente è una regolazione post-trascrizionale.

piRNA. L'RNA Piwi-interacting è una classe di piccole molecole di RNA (26-31 nucleotidi) che è espressa unicamente nei testicoli dei mammiferi e forma complesse proteine di RNA con proteine Piwi. Questi complessi di piRNA (piRCs) sono stati collegati al silenziamento trascrizionale dei geni da parte dei retrotrasposoni e ad altri elementi genetici nelle cellule dei filamenti germinali, in particolare quelle della spermatogenesi.

snoRNA. Gli small nucleolar RNA (piccoli RNA nucleolari) sono piccole molecole di RNA in grado di favorire alcune modificazioni chimiche dell'RNA ribosomiale e dei trascritti di altri geni che codificano per molecole di RNA. Gli snoRNA sono una componente delle small nucleolar ribonucleoprotein (piccole ribonucleoproteine nucleolari o snoRNP), composte appunto di snoRNA e di proteine.

### Junk DNA

Vi è ancora una grande quantità di sequenze che non cade all'interno di alcuna categoria nota. Molte di queste sequenze potrebbero essere un artefatto evolutivo che non presenta alcun fine oggi, e queste regioni sono a volte indicate nel loro complesso come DNA spazzatura o *junk DNA*. Esiste, tuttavia, una varietà di prove emergenti che indicano come alcune sequenze all'interno di queste regioni possano funzionare in modi non ancora compresi. Esistono infatti numerose ipotesi sull'origine e la persistenza nel genoma di ampie regioni non codificanti. Nessuna di queste è riuscita a convincere totalmente la comunità scientifica. È comunque possibile che ogni ipotesi sia parzialmente corretta, e che l'intero DNA spazzatura presente nel genoma si sia originato in numerosi modi diversi, alcuni dei quali descritti appunto dalle teorie seguenti.

Il junk DNA potrebbe avere una funzione protettiva nei confronti delle regioni codificanti. Dal momento che il DNA è continuamente esposto a danni casuali da parte di agenti esterni, infatti, una tanto alta percentuale di DNA non codificante permette di pensare che le regioni ad essere statisticamente più danneggiate siano in realtà non codificanti.

Il DNA spazzatura potrebbe anche essere una sorta di riserva di sequenze al momento non codificate, ma dalle quali potrebbe emergere un qualche gene in grado di

conferire vantaggio all'organismo. Da questo punto di vista, dunque, tali regioni costituirebbero le vere basi genetiche dell'evoluzione.

Parte del junk DNA è ritenuto essere, più semplicemente, un elemento spaziatore tra geni. In questo modo gli enzimi che hanno rapporti con il materiale genetico avrebbero la possibilità di complessare più agevolmente il DNA. Il DNA spazzatura così, potrebbe avere una funzione fondamentale pur essendo composto di una sequenza assolutamente casuale.

Alcune regioni di DNA non codificante potrebbero avere una funzione regolatoria sconosciuta.

### Variazioni del numero di copie (CNV)

Recenti scoperte mostrano che l'analisi dell'intero genoma su persone normali, rivela centinaia di regioni, di dimensioni variabili da almeno 100kb a qualche Mb, delete o duplicate (Copy Number Variation, CNV, variazione del numero di copie)<sup>14</sup>. Queste duplicazioni sono cioè polimorfiche nella popolazione. Almeno il 17% del genoma di persone sane presenta variazioni nel numero di copie. In queste regioni il genoma non è diploide come ci si attenderebbe in accordo alla genetica mendeliana ma si presenta in un numero di copie variabile da zero a parecchie più di 2. Come conseguenza i genomi di due persone sane possono differire in lunghezza fino a 20 Mb<sup>14</sup>. Queste regioni variabili contengono fra l'altro geni che hanno a che fare con l'espressione degli organi di senso, con l'immunità, con la tumorigenesi, con la risposta ai farmaci. Esse sembrano quindi dare un importante contributo alla diversità fra gli esseri umani intesa come diversità nella risposta agli stimoli sensoriali, agli agenti infettivi, ai farmaci, ai procarcinogeni ambientali e alimentari. Le variazioni del numero di copie di diversi geni sono pertanto le maggiori responsabili della nostra diversità fenotipica ed hanno aperto nuove prospettive per la comprensione delle patologie a base genetica, cioè di tutte le patologie, dalle malattie infettive, alle malattie autoimmuni, alle malattie neurodegenerative.

### **Meccanismi di regolazione genica**

Il concetto classicamente definito come "un gene-una proteina" è stato negli ultimi decenni smentito dagli studi sulla struttura e funzionamento del genoma umano. Le singole unità geniche codificano per più prodotti a causa di numerosi meccanismi mediante i quali la trascrizione di un singolo gene viene regolata per produrre isoforme diverse, o addirittura proteine con funzione differente (uso di promotori alternativi, splicing alternativo,

poliadenilazione alternativa, correzione dell'RNA, taglio post-traduzionale). La maggiore complessità dell'uomo rispetto ad altri organismi multicellulari più semplici deriva soprattutto dalle maggiori possibilità di regolare l'espressione dei geni e soprattutto dal fatto che un singolo gene può originare molti diversi trascritti e proteine.

### Splicing alternativo

Fino al 60% di tutti i geni umani presentano almeno una variante di splicing alternativo <sup>15</sup>. Lo splicing dell'mRNA è un processo essenziale e finemente regolato che si verifica dopo la trascrizione del gene e prima della traduzione dell'RNA messaggero. Gli esoni sono affiancati da brevi sequenze di splicing (siti di splicing) localizzate in 3' e 5' dei confini introne/esone <sup>15</sup>. Per la produzione di un mRNA codificante maturo, gli introni vengono eliminati mediante splicing dal pre-mRNA trascritto dal gene e gli esoni vengono quindi riuniti fra loro. Le varianti di splicing dell'RNA si originano quando l'apparato di splicing (lo spliceosoma) produce differenti mRNA maturi dal trascritto di un gene. Oltre ai siti di splicing canonici sono presenti elementi di sequenza più distanti che ne condizionano il riconoscimento e svolgono un ruolo nel dirigere il processo: lo splicing alternativo è regolato da proteine che si legano a specifici attivatori (enhancer) o repressori (silencers) dello splicing che si trovano negli esoni (ESE, ESS) o negli introni (ISE, ISS) <sup>16</sup>. Lo splicing alternativo regolato può quindi avvalersi sia di attivatori che di repressori. Le proteine SR (attivatori) si legano all'RNA mediante un dominio RRM (RNA Recognition Motif) e contengono nella regione C-terminale anche un dominio RS (Arg+Ser) che media le interazioni tra la proteina SR e le altre proteine componenti del macchinario di splicing <sup>16</sup>. I silenziatori vengono riconosciuti dalle proteine hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) che bloccano specifici siti di splicing, impedendone il loro utilizzo. L'attività fisiologica dei prodotti delle varianti di splicing (isoforme) rispetto alla proteina originale può essere uguale, opposta, o completamente differente e non correlata <sup>16</sup>. Lo splicing alternativo può essere costitutivo o regolato. Nel primo caso vengono sempre generate diverse isoforme dal trascritto primario. Nel secondo caso diverse forme vengono generate in tempi diversi, in differenti tessuti, o in risposta a stimoli e condizioni differenti <sup>16</sup>. L'espressione di una variante può quindi avere specificità di tessuto, di stimolo, o di patologia, e la presenza o il livello di specifiche varianti di splicing possono quindi causare e/o essere indicativi di una condizione patologica o fisiologica. Nel corso degli ultimi anni, lo splicing alternativo è stato analizzato con crescente attenzione, poiché si stima che oltre la metà dei geni presenti nel nostro genoma sembrava avere la possibilità di portare alla

sintesi di mRNA messaggeri diversi, rendendo questo meccanismo potenzialmente di grande importanza nella nostra evoluzione. Nel corso degli anni è divenuto inoltre, sempre più evidente il ruolo dello splicing alternativo nel differenziamento cellulare a seguito della identificazione di meccanismi in grado di realizzare splicing alternativi tessuto-specifici. In particolare, alcune proteine tessuto-specifiche sarebbero in grado di influenzare lo spliceosoma a livello di siti specifici per ciascun tessuto. Da questa combinazione di proteine tessuto-specifiche e complesso di splicing deriverebbe quindi la possibilità che uno stesso RNA messaggero precursore sia “maturato” in modo diverso in tipi cellulari diversi. Un simile dato va quindi a dare ulteriore forza all'ipotesi che lo splicing alternativo abbia giocato un ruolo estremamente importante nel differenziare i tipi cellulari e nella possibilità di aumentare la complessità di un organismo senza necessitare di nuovi geni.

### RNA editing

L'editing dell'RNA è un meccanismo post-trascrizionale per modificare il significato dell'informazione presente nel trascritto<sup>17</sup>. Esso prevede due meccanismi: deaminazione sito-specifica della citosina; inserzione o delezione di uridine diretta da specifici RNA guida<sup>17</sup>. Un altro esempio di editing nei mammiferi è la deaminazione dell'adenosina che produce inosina. Tale modificazione che ha luogo a livello del pre-mRNA può sia cambiare il pattern di splicing che il significato dei codoni. Infatti dato che l'inosina si appaia con la citosina, il processo di editing A>I può modificare l'aminoacido codificato dal codone. In entrambi i casi, l'editing può portare cambiamenti radicali alla sequenza e al senso di lettura dell'mRNA, tanto che la proteina risultante dalla sintesi di un mRNA maturo può essere molto diversa, nella composizione in amminoacidi, da quella prevista dal codice genetico. L'editing è catalizzato dall'enzima ADAR (adenosine deaminases acting on RNA) che riconosce una struttura appaiata nell'RNA.

### Promotori alternativi

I promotori sono costituiti da sequenze nucleotidiche di basi intervallate da corte sequenze che funzionano da moduli di controllo per l'espressione genica. Sono proprio questi moduli a caratterizzare i promotori: vi sono quelli costitutivi i cui elementi di controllo possono legarsi ubiquitariamente a fattori di trascrizione differenti (geni housekeeping) e quelli che rispondono a fattori specifici che ne modulano l'espressione genica<sup>18</sup>. Alcuni geni umani hanno due o più promotori alternativi, che determinano schemi di espressione specifici per determinati tipi cellulari<sup>18</sup>.

## Fenomeni epigenetici

Per epigenetica si intende una qualunque attività di regolazione dei geni tramite processi chimici che non comportino cambiamenti nel codice del DNA, ma possono modificare il fenotipo dell'individuo e/o della progenie <sup>19</sup>. La metilazione del DNA è una modificazione epigenetica del DNA. Il processo consiste nel legame di un gruppo metile (-CH<sub>3</sub>) ad una base azotata. Un esempio di metilazione del DNA è la metilazione della citosina nel dinucleotide CpG. Questo tipo di metilazione è quasi assente in particolari zone del genoma eucariotico chiamate anche isole CpG, contenenti parti regolative e promotori dei geni eucariotici. La metilazione fisiologica del DNA in queste regioni che sono poste generalmente a monte di promotori è un fenomeno che interviene nel controllo dell'espressione genica, nell'inattivazione del cromosoma X, nella struttura cromatinica e nell'imprinting genomico, nella determinazione dell'imprinting biologico. La metilazione della citosina è anche un importante fattore di mutazione. Infatti mentre la deaminazione della citosina produce uracile -una base azotata che non appartiene al DNA (bensì all'RNA) ed è immediatamente riconosciuta come estranea- la deaminazione della 5-metil citosina (5meC) la trasforma in timina, generando un mismatch, nel quale il sistema di riparazione dei mismatch (mismatch repair) non sempre preserva la corretta base azotata.

## Modificazioni post-traduzionali

Una modificazione post traduzionale è la modificazione chimica di una proteina in seguito alla sua traduzione. Molti amminoacidi possono essere modificati attraverso l'aggiunta di alcuni gruppi funzionali in grado di allargare la funzionalità complessiva della proteina. Modificazioni tipiche, ad esempio, sono l'aggiunta di gruppi acetile, fosfato, lipidici o glucidici. Un ulteriore tipo di modificazione post traduzionale è la rimozione di amminoacidi dalla regione N-terminale della proteina attraverso l'azione di una proteasi. Altre modificazioni, come la fosforilazione, sono comuni meccanismi di attivazione ed inattivazione di proteine ed enzimi.

## Nuove tecnologie per lo studio della complessità genomica

### MLPA

L'MLPA è essenzialmente un metodo per rendere i campioni di DNA adatti ad una reazione di PCR multiplex, in cui fino a 45 specifiche sequenze possono essere amplificate simultaneamente con l'utilizzo di una sola coppia di primer. Questa tecnica si basa principalmente sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze geniche, formate ognuna da due oligonucleotidi che si ibridano a regioni adiacenti della stessa sequenza target e che vengono successivamente uniti mediante "ligazione" enzimatica. Tutte le sonde presentano le stesse sequenze terminali 5' e 3', che ne permette la simultanea amplificazione con un'unica coppia di primer. Inoltre, l'oligonucleotide che ibrida alla regione al 3' della sequenza target è stato realizzato in modo da avere differente lunghezza per ogni specifico target, permettendo la formazione di una miscela di prodotti di amplificazione di lunghezza variabile, analizzabili mediante elettroforesi capillare. La peculiarità dell'MLPA, che consiste nel fatto che non i campioni genomici bensì le sonde aggiunte a tali campioni sono amplificate e quantizzate.

### PCR real time

La PCR real time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA. La PCR real time è in grado di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. Spesso la PCR real time è combinata con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA. In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione. Siccome sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni

multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Si può effettuare una quantificazione assoluta delle concentrazioni di specifici DNA o RNA producendo una curva standard di calibrazione; in alternativa si può effettuare una quantificazione relativa rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. La PCR real time rappresenta un innovativo sistema di rilevamento e di misurazione in tempo reale del DNA amplificato che consente sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione che rappresentavano una potenziale fonte di alterazione dei risultati. Il vantaggio in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alle PCR tradizionali, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

### **Minigene assay**

Quando delle mutazioni interferiscono con gli elementi regolativi per il corretto processamento dell'RNA, esse possono causare dei difetti di splicing. Le più comuni mutazioni di splicing sono a carico di sequenze molto conservate, come i siti di splicing AG e GT o il branch site. Al contrario altre mutazioni che alterano elementi regolativi meno conservati sono più difficili da identificare per mezzo della semplice analisi di sequenza: è complicato attribuire a queste mutazioni un significato funzionale, se non attraverso l'analisi del trascritto. Purtroppo spesso l'RNA dei pazienti non è disponibile e non è possibile testare direttamente lo svolgimento dello splicing in vivo mediante RT-PCR. Una tecnica alternativa si basa sull'espressione in vitro di geni artificiali ottenuti dalla fusione degli elementi genici di interesse con minigene inseriti in vettori di espressione eucariotici. I saggi mediante minigene rappresentano perciò un'importante risorsa per caratterizzare l'effetto di alcune mutazioni sull'efficienza e il corretto svolgimento del processo di splicing: qualsiasi regione di interesse, ad esempio un esone con i suoi introni fiancheggiati, può essere inserita in un minigene e trasfettata in linee cellulari eucariotiche; qui il minigene verrà trascritto in un pre-mRNA che subirà splicing; infine l'mRNA verrà analizzato, dopo RT-PCR, con primer disegnati per amplificare specificatamente i trascritti derivati dal minigene.

Un tipico vettore per l'espressione in vitro, come pSPL3, è un plasmide il cui sito multiplo di clonaggio è inserito in un introne fiancheggiato da due esoni che recano siti di splicing

(accettore e donatore) funzionali: una volta inserita nel vettore la regione di DNA (un esone e parte dei suoi introni fiancheggianti) contenente la mutazione che si suppone possa interferire con lo splicing, si ottiene un costrutto (Figura 1) che viene clonato in E.coli. Il DNA plasmidico, una volta isolato, viene trasfettato in cellule eucariotiche dove il minigene sarà trascritto e subirà il processo di splicing. Una volta isolato l'RNA da queste cellule, ed averlo retrotrascritto in cDNA, si potrà analizzare la dimensione del trascritto mediante una PCR con primer esonici vettore-specifici. Questa PCR mette in evidenza i prodotti di splicing che sono stati generati all'interno delle cellule eucariotiche: se il costrutto clonato conteneva una mutazione di splicing, si saranno uniti gli esoni del vettore e l'esone clonato sarà stato eliminato (exon skipping) insieme agli introni; se, invece la mutazione non presenta conseguenze funzionali, gli introni vengono eliminati correttamente ed il minigene verrà espresso in un trascritto contenente sia gli esoni del minigene, che l'esone inserito (Figura 2).

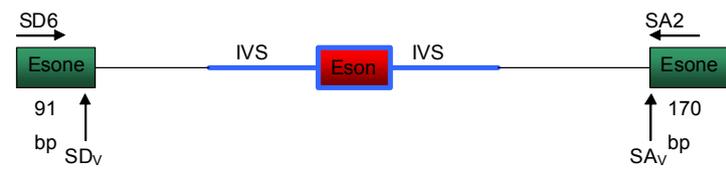


Figura 1. Costrutto risultante dal clonaggio della regione di DNA di interesse nel vettore pSPL3; il frammento clonato (un esone e parte nei suoi introni fiancheggianti, rappresentati in azzurro) si posiziona all'interno di un introne e tra due esoni, tutte sequenze già presenti nel vettore. SD6 e SA2 sono dei primer esonici vettore-specifici. SDV= sito donatore di splicing del vettore. SAV= sito accettore di splicing del vettore

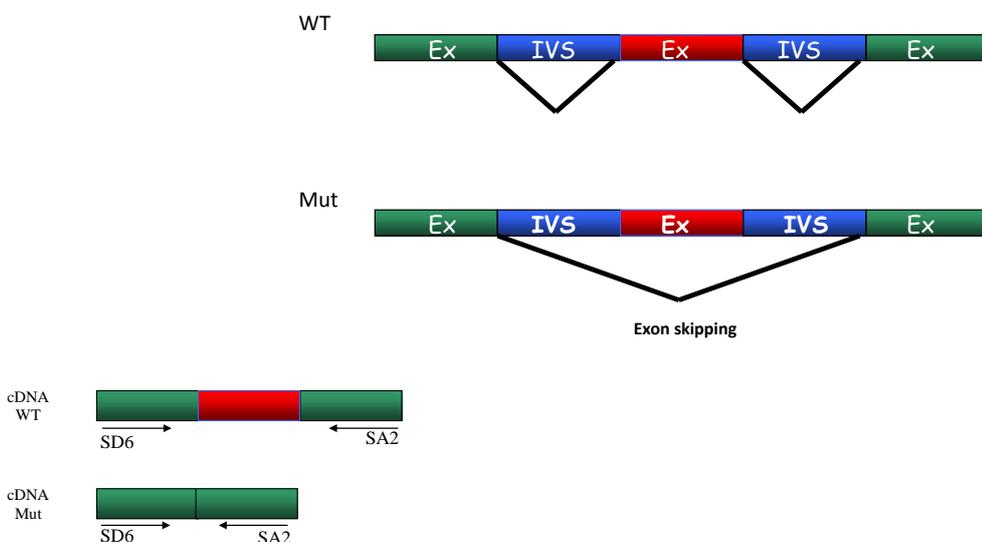


Figura 2. In alto: splicing che si realizza dopo trasfezione in cellule Cos1. In basso: PCR su cDNA con i primer SD6 e SA2 vettore-specifici.

## SNP array

Il recente progresso della genomica ha messo in luce come una parte rilevante della variabilità tra individui sia da attribuirsi a polimorfismi a singolo nucleotide SNP (Single Nucleotide Polimorfisms). Gli SNP acquistano particolare rilevanza in campo biomedico quando possono essere messi in relazione a patologie che non presentano una trasmissione genetica semplice: per questa ragione, molte linee di ricerca attuali sono orientate a eseguire analisi di correlazione tra la distribuzione degli SNP su geni potenzialmente coinvolti in patologie e i fenotipi esibiti dai soggetti portatori. Tali correlazioni, una volta dimostrate, permettono di usare gli SNP come marcatori molecolari. L'odierna tecnologia biomolecolare fornisce metodi per lo screening simultaneo di molteplici SNP. Due sono state le innovazioni sperimentali che hanno permesso l'analisi simultanea di decine di migliaia di geni. Una è l'utilizzo di supporti rigidi non porosi come il vetro, molto più adatti alla miniaturizzazione ed all'utilizzo di marcatori fluorescenti. L'altra è la sintesi ad alta densità spaziale di oligonucleotidi su vetrini sottilissimi con tecniche fotolitografiche. Si è così giunti alla nascita di una nuova tecnologia di analisi comunemente chiamata microarray o DNA chip. Uno SNP array è costituito da una collezione di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o chip di silicio formanti un array. Il principio su cui si fonda questa tecnica è dato dalla specificità con cui ibridizzano due sequenze nucleotidiche complementari. Una sequenza, la cui estremità è fissata al supporto, funge da sonda per l'identificazione dell'altra, che può essere o uno specifico mRNA o cDNA, nel caso degli studi di espressione genica, oppure un tratto di DNA amplificato, nel caso degli studi per l'identificazione di polimorfismi genetici. I microarray rappresentano l'applicazione più avanzata di queste tecnologie di ibridazione, essendo in grado di ospitare molte migliaia di sequenze-sonda diverse.

Gli SNP array permettono inoltre di identificare anomalie dovute alla variazione del numero di copie di geni al fine di comprendere quali CNV aumentino la suscettibilità a specifiche malattie e ne siano la causa diretta e se alcune di queste variazioni siano soggette a pressione selettiva. Gli SNP array ad alta densità sono stati pertanto utilizzati per l'analisi sistematica di LOH, CNV ed alterazioni cromosomiche. Inoltre gli SNP array permettono infine di identificare eventi di LOH avvenuta per conversione genica (senza variazioni del numero di copie del DNA).

## Un esempio di complessità genomica: il gene *NF1*

Il gene *NF1* (oltre 280 Kb con 61 esoni) è localizzato sul cromosoma 17q11.2 e codifica per una proteina (neurofibromina) regolatrice della crescita e della differenziazione cellulare; è un gene tumore-soppressore <sup>20</sup>. Il gene *NF1* è conservato durante il corso dell'evoluzione, dal lievito ai mammiferi, a conferma del suo importante ruolo biologico in un pathway di trasduzione del segnale che regola la proliferazione cellulare <sup>21</sup>.

### Struttura

Il gene *NF1* è molto complesso: ha un open reading frame (ORF) di 8454 nucleotidi e si estende per circa 280 kb di DNA genomico (<http://genome.ucsedu/>). È trascritto in direzione centromero→telomero e la struttura esone-introne è stata completamente caratterizzata (Figura 3) <sup>22, 23</sup>. Il gene è suddiviso in 61 esoni (57 più 4 che vanno incontro a splicing alternativo) <sup>24</sup>. L'esone 9a, l'esone 10a2, l'esone 23a e l'esone 48a sono trascritti in maniera alternativa. La sequenza genomica completa di *NF1* è depositata in GenBank con il numero di accesso AC004526 <sup>23</sup>.

Sequenze omologhe di *NF1* sono state identificate nelle regioni 2q21, 2q33, 14q11, 15q11, 18p11, 21q11 e 22q11 <sup>25</sup>. Altri *loci* sembrano mappare sul cromosoma 15 ed altri sul cromosoma 22 <sup>25</sup>. La mancanza di cDNA relativo a questi *loci* fa ipotizzare che essi siano pseudogeni apparsi in seguito a duplicazioni del *locus NF1* e che non siano codificanti in quanto hanno accumulato molte mutazioni di frameshift, nonsense e missenso; si crede inoltre che, ricombinandosi col vero gene *NF1* tramite riarrangiamenti intercromosomici, rappresentino il serbatoio di nuove mutazioni per questo *locus* e che ciò contribuisca all'elevato tasso di mutazione osservato per questo gene <sup>25</sup>.

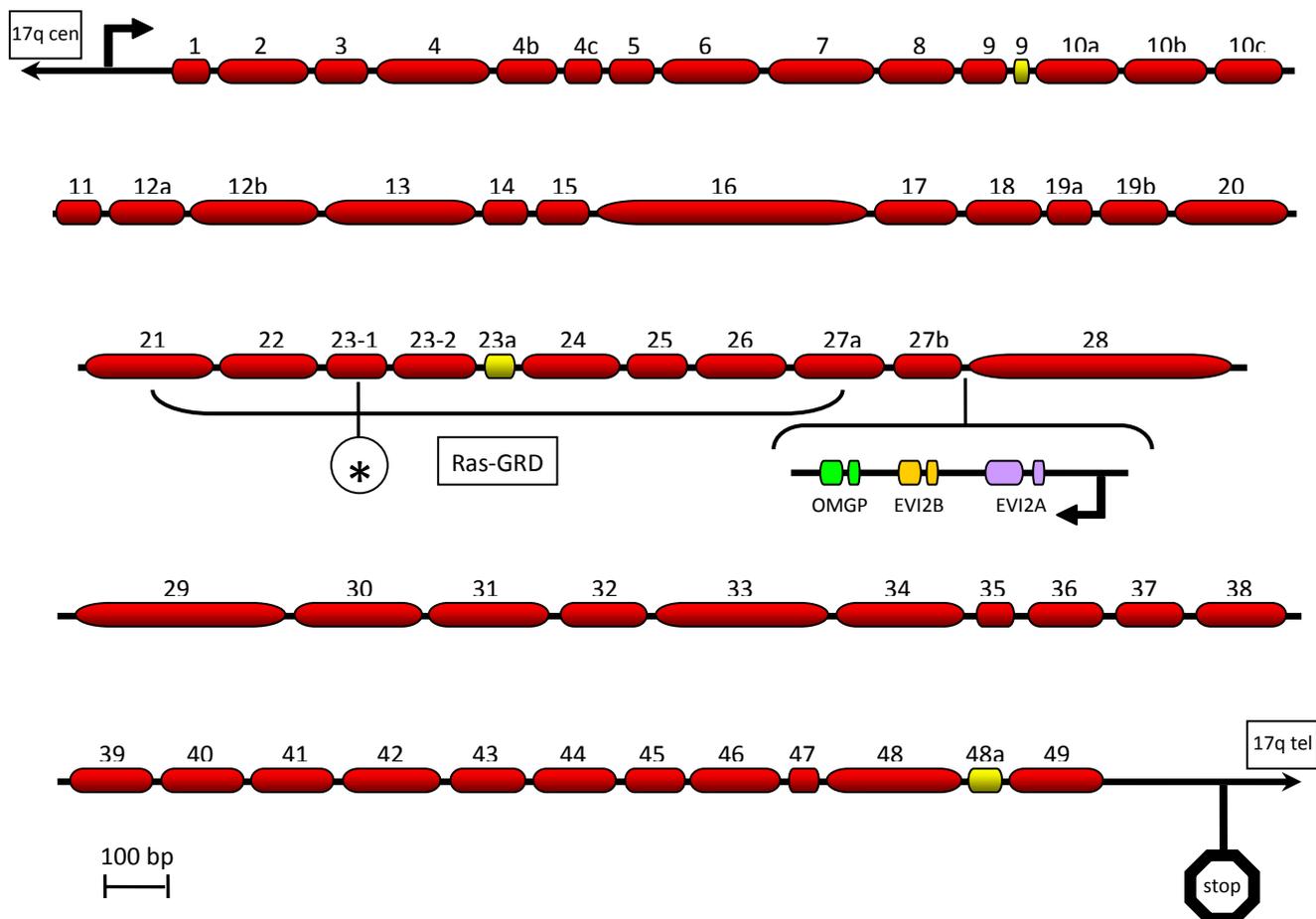


Figura 3. Schema degli esoni del gene *NF1*. Il sito di inizio della trascrizione è rappresentato dalla freccia a monte dell'esone 1, mentre il sito di stop della trascrizione e il sito di poliadenilazione da un ottagono a valle dell'esone 49. Il dominio Ras-GRD (dominio GAP) si estende dall'esone 21 al 27a. Le isoforme sono inserzioni "in-frame" degli esoni 9a, 23a e 48a (rappresentati in giallo). I geni contenuti nell'introne 27b (OMGP, EVI2B e EVI2A) vengono trascritti in direzione opposta a quella del gene *NF1*. L'asterisco nell'esone 23-1 rappresenta il sito dell' mRNA editing, C3916U, che inserisce un codone di stop prematuro al codone 1303. Gli esoni sono in scala – gli introni non sono in scala. La scala in basso a sinistra si riferisce alla grandezza degli esoni.

## Espressione

Il trascritto di *NF1* è lungo 12-14 kb, con un 3'UTR di 3.5 kb<sup>26</sup>. L'mRNA di *NF1* è ubiquitario<sup>26</sup>. La regolazione del gene *NF1* è molto complessa<sup>26</sup>. L'introne 27b contiene tre geni (*OMGP*, *EVI2B* e *EVI2A*) che vengono trascritti nel verso opposto a quello del gene *NF1*; ognuno di questi geni è formato da 2 esoni<sup>27, 28</sup>.

*EVI2A*. Codifica per un peptide di 232 aminoacidi con un dominio transmembrana; è espresso nel cervello e nel midollo osseo<sup>28</sup>.

*EVI2B*. Codifica per un peptide di 448 aminoacidi di cui non si conosce la funzione; è espresso esclusivamente nel midollo spinale<sup>28, 29</sup>.

*OMGP* (oligodendrocyte myelin glycoprotein). Codifica per un peptide di 416 aminoacidi<sup>30</sup> che viene espresso a livello della superficie cellulare e probabilmente svolge un ruolo come proteina dell'adesione cellulare<sup>31</sup>; è espresso principalmente negli oligodendrociti<sup>28, 32</sup>.

## Il promotore

La regione del promotore è stata isolata e la sua sequenza è conservata nel corso dell'evoluzione<sup>23</sup>; è un'isola CpG e, come per tutti i geni espressi a bassi livelli, non contiene TATA o CCAAT box che delimitino un forte sito di inizio della trascrizione<sup>33, 34</sup>. La regione contiene inoltre domini ipo- e iper-metilati che coincidono con i siti di attacco dei fattori di trascrizione<sup>34</sup>. Esiste un singolo sito di inizio di trascrizione a 484 bp a monte del sito di inizio della traduzione<sup>34</sup>. Il sequenziamento del promotore ha permesso l'identificazione di alcuni potenziali elementi cis-agenti, mentre, tramite espressione in vitro di costrutti recanti delezioni specifiche, è stato dimostrato che queste regioni regolative sono localizzate all'interno e non all'esterno del promotore<sup>34</sup>. Tutto ciò porta a supporre che il promotore di *NF1* sia debole e che bastino piccole perturbazioni nell'espressione del gene per provocare grandi variazioni nei livelli intracellulari del prodotto codificato.

## La regione al 3'

La regione 3' non tradotta (3'UTR) si estende per 3.5Kb a valle del codone di terminazione nell'esone 49 e mostra una forte omologia con sequenze murine implicate nella regolazione della stabilità dei trascritti<sup>28</sup>. Alcuni di questi siti di legame sono implicati nella regolazione a livello trascrizionale/post-trascrizionale dell'espressione di *NF1*.

## **Modificazioni post-trascrizionali**

Sono stati identificati due meccanismi che modulano l'espressione del gene NF1 e regolano i livelli intracellulari di neurofibromina: l'espressione di isoforme alternative e l'mRNA editing.

### Isoforme

I 61 esoni che costituiscono il gene *NF1* umano generano diversi trascritti sottoposti a splicing alternativo <sup>23, 35, 36</sup>. Le tre isoforme più importanti che sono state identificate mostrano un pattern di espressione diverso da quello della proteina normale e sono:

#### *Neurofibromina di tipo 2*

È l'isoforma più largamente espressa e include l'esone 23a <sup>36</sup>; questo si trova nel dominio funzionale della neurofibromina (il dominio ad attività GTPasica) e studi in lievito hanno evidenziato che l'isoforma che include questo esone mostra una minore attività catalitica, pur avendo una più alta affinità per Ras-GTP <sup>36</sup>. Topi mancanti di questa isoforma hanno sviluppo e predisposizione ai tumori normale, ma presentano disturbo dell'apprendimento <sup>36</sup>.

#### *Neurofibromina di tipo 3*

L'isoforma contenente l'esone 48a, che codifica una sequenza di 18 aminoacidi molto vicini all'estremità C-terminale della proteina, è preferenzialmente espressa nel muscolo (muscolo cardiaco sia fetale che adulto, muscolo scheletrico e alcuni muscoli lisci) e si crede coinvolta nello sviluppo dei miociti <sup>37</sup>.

#### *Neurofibromina 9br*

Contiene l'esone 9br, codificante per una sequenza di 10 aminoacidi che si inserisce tra il residuo 420 e il 421 <sup>38</sup>. La sua espressione è limitata al sistema nervoso centrale dell'adulto e nel feto si osserva un profilo di espressione analogo <sup>38</sup>.

Recentemente, è stata descritta una nuova isoforma alternativa della neurofibromina dovuta all'inserzione dell'esone 10a-2, che introduce un dominio di membrana <sup>39</sup>. Questa variante viene osservata nella maggior parte dei tessuti umani analizzati ed è pertanto possibile che svolga un ruolo "housekeeping" nelle membrane intracellulari, come ad esempio nel reticolo endoplasmatico <sup>39</sup>.

## RNA editing

Oltre all'espressione di trascritti alternativi, l'mRNA di NF1 subisce un processo regolativo post-trascrizionale, l'RNA editing: la base 3916 nell'esone 23-1 subisce una deaminazione da citosina a uracile <sup>40</sup>; questo porta ad avere un segnale di stop prematuro al codone 1303 e quindi una proteina mancante completamente del GRD <sup>40</sup>. L'analisi dell'RNA di campioni di linee cellulari diverse, di sangue periferico e di tessuti tumorali ha mostrato che l'editing avviene in tutti questi tessuti, ma con livelli diversi: più alti nei tumori maligni, intermedi nei neurofibromi plessiformi e più bassi nei neurofibromi cutanei e nei tessuti non tumorali <sup>40</sup>, e pertanto è stato ipotizzato che l'RNA editing possa costituire un meccanismo di inattivazione dell'allele selvatico nei tumori associati alla neurofibromatosi tipo 1 <sup>40</sup>.

## **La proteina**

L'mRNA di *NF1* codifica per una proteina di 2818 aminoacidi e di 327 kD, chiamata neurofibromina <sup>26</sup>. Gli esoni dal 21 al 27b codificano per il sito attivo della proteina che funziona come attivatrice delle proteine ad attività GTPasica (GAP) <sup>26, 41</sup>. L'mRNA del gene NF1 è espresso allo stesso livello in tutti i tipi di cellule esaminate <sup>42</sup>.

La neurofibromina è una proteina a localizzazione citoplasmatica <sup>23</sup>, anche se alcuni studi hanno identificato la presenza di questa proteina nel nucleo <sup>43</sup>. La neurofibromina contiene infatti un sito di localizzazione nucleare codificato dall'esone 43. Vandembroucke et al. 2004 <sup>43</sup> hanno descritto una variante di NF1 con perdita dell'esone 43 (NF1-Δ43) presente solamente nel citoplasma, al contrario della variante completa che mostra anche localizzazione nucleare. Gli stessi autori hanno ipotizzato che il trasporto della neurofibromina nel nucleo rappresenti un meccanismo di regolazione del suo funzionamento dal momento che i suoi partner di legame (proteina p21ras e microtubuli) sono citoplasmatici <sup>43</sup>. È interessante notare che l'isoforma NF1-Δ43 è espressa ad alti livelli nel polmone, fegato, placenta, reni e muscolo scheletrico, tutti tessuti non affetti nella neurofibromatosi tipo 1 <sup>43</sup>.

L'analisi della sequenza aminoacidica del prodotto di *NF1* ha mostrato una somiglianza tra una porzione della proteina e la famiglia delle proteine GAP <sup>20, 44</sup>: queste proteine, sia nei mammiferi che nel lievito, regolano lo stato di attivazione del proto-oncogene p21-Ras <sup>20, 41</sup>. Le proteine Ras o p21ras sono codificate dai geni *HRAS*, *KRAS* (viral Harvey and Kirsten murine sarcoma oncogenes) e *NRAS* (human neuroblastoma oncogene), hanno un peso molecolare di 21 kDa e svolgono un ruolo centrale nel differenziamento cellulare

e nella crescita, trasducendo il segnale dalla membrana plasmatica al nucleo per mezzo dei loro effettori <sup>45</sup>. Queste proteine sono ancorate covalentemente alla membrana plasmatica da un gruppo farnesilico, e sono legate ad un gruppo guaninico, continuamente in equilibrio tra il loro stato attivo (legato al GTP) e il loro stato inattivo (legato al GDP) <sup>45</sup>. Le p21ras hanno una attività GTPasica intrinseca basale che viene accelerata 105 volte dalle proteine GAP come p120-GAP e neurofibromina. La neurofibromina, per mezzo del suo dominio GAP (GRD) aumenta il tasso di idrolisi del GTP e diminuendo l'attività di p21ras funziona come tumore soppressore. Oltre al dominio GAP, la neurofibromina contiene un altro dominio definito SEC14 <sup>46</sup>. Il dominio SEC14 é tipico delle proteine di secrezione e delle proteine regolate dai lipidi, come ad esempio le RhoGAPs e le RhoGEFs <sup>46</sup>. Nella sua forma attiva p21ras interagisce con la chinasi Raf, che a sua volta fosforila e attiva una seconda chinasi denominata MEK (MAP chinasi/ERK chinasi) <sup>47</sup>. Attraverso la fosforilazione di residui di treonina e tirosina, MEK attiva i membri della famiglia delle chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK) <sup>47</sup>. Una volta attivate, le ERK fosforilano una serie di targets, tra cui altre chinasi come la RSK (chinasi ribosomale S6), e fattori di trascrizione come l'AMP ciclico e "CREB (Response Element Binding Protein)", trasmettendo i segnali per l'espressione di geni di controllo coinvolti nel ciclo cellulare, nell'apoptosi, nel differenziamento, e nella migrazione cellulare (Figura 15) <sup>47</sup>. Le mutazioni oncogenetiche dei geni *Ras* e la riduzione o la mancanza della neurofibromina favoriscono lo stato attivo della proteina p21ras, che risulta nella continua stimolazione della cascata del segnale Raf-MEK-ERK (MAPK) e conseguentemente nella proliferazione cellulare. È stato infatti dimostrato che la perdita della neurofibromina coincide con elevati livelli di p21ras in molti tipi di tumore <sup>48</sup>.

Oltre alla cascata del segnale MAPK, la proteina p21ras attiva un'altra serie di molecole effettrici, tra cui la fosfatiliositolo-3-chinasi (PI3K), "Rac (rho family, small GTP-binding protein Rac1)", e la "Ra1 GDP-dissociation stimulation (Ra1-GDS)" <sup>45</sup>. Rac/Rho sono coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro, e Ra1-GDS é una piccola GTPasi (Figura 4) <sup>45</sup>.

In assenza della neurofibromina, l'attivazione anomala di p21ras porta all'attivazione della PI3K, che fosforila a sua volta la proteina kinasi B (Akt o PKB) <sup>49</sup>. Questa proteina fosforila e inattiva il complesso TSC1-TSC2, formato dalla tuberina, un'altra proteina ad attività GAP, e dall'amartina <sup>49</sup>. Tuberina e amartina sono codificate rispettivamente dai geni *TSC1* e *TSC2*, responsabili della sclerosi tuberosa. L'inibizione del complesso TSC1-TSC2 da parte dell'Akt induce l'attivazione della piccola proteina GAP Rheb (Ras

homologue enriched in brain) e della serina/treonina chinasi mTOR, target della rapamicina <sup>49</sup>. mTOR é conservato durante l'evoluzione e regola la proliferazione cellulare nei lieviti, nella mosca e nei mammiferi, dove funziona come sensore per la presenza di nutrienti, fattori di crescita e energia cellulare, integrando pathways diversi, implicati a loro volta in numerosi processi cellulari <sup>50</sup>. Gli studi di Dasgupta et al. 2005 <sup>51</sup> e di Johannessen et al. 2005 <sup>49</sup> hanno confermato l'attivazione del signaling di TOR nelle cellule deficitarie per la neurofibromina (Figura 4).

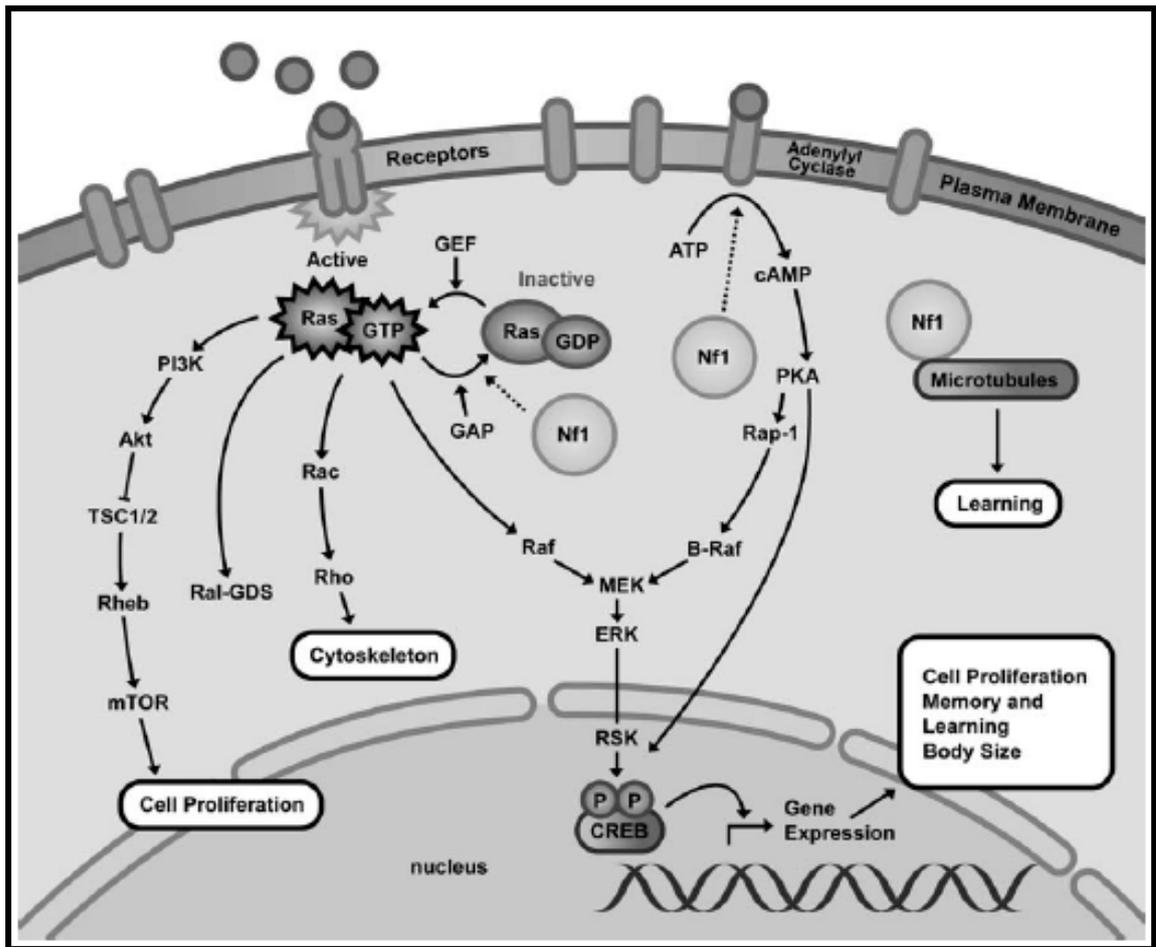


Figura 4. Meccanismi di azione della neurofibromina. La neurofibromina accelera l'attivazione del complesso GTP-ras mediante l'idrolisi del GTP. L'attività di Ras viene quindi inibita con un conseguente ridotto segnale mitogenico per lo stimolo della crescita. Nei soggetti affetti da neurofibromatosi tipo 1 l'inattivazione funzionale del gene NF1 ha come risultato una diminuita attività della neurofibromina che comporta un incremento dei livelli di Ras attivata e un'aumentata proliferazione cellulare. Sono inoltre illustrate le Interazioni di NF1 con altri pathways di signaling, inclusa la modulazione dell'adenilato ciclasi, l'associazione con i microtubuli e l'interazione con altri effettori.

## La neurofibromatosi di tipo 1 (NF1:MIM#162200)

Il gene NF1 è stato identificato e caratterizzato nel 1990<sup>52</sup>. La malattia viene trasmessa in maniera autosomica dominante, e ad oggi non è stata descritta eterogeneità genetica: tutti i pazienti NF1 presentano mutazioni allo stesso *locus*<sup>53</sup>.

Clinicamente la neurofibromatosi tipo 1 è caratterizzata da tre tipi di manifestazioni (Figura 5)<sup>53-56</sup>:

- segni clinici maggiori (che si manifestano nella grande maggioranza degli individui affetti e fanno parte dei criteri diagnostici): macchie caffèlatte (>6), lentiginosi ascellare, inguinale e/o della base del collo o del tronco, noduli iridei di Lisch e neurofibromi
- segni clinici minori (presenti in una discreta percentuale di individui affetti ma non tali da entrare a far parte dei criteri diagnostici): macrocefalia, bassa statura ed anomalie toraciche (pectus excavatum o carenatum)
- complicanze (variabili e poco frequenti ma spesso gravi e invalidanti): disturbi cognitivi e dell'apprendimento, neurofibroma plessiforme, scoliosi, pseudoartrosi, complicanze neurologiche, ipertensione arteriosa, malformazioni cardiovascolari.

### Tumori e NF1

La frequenza dei tumori nei soggetti con NF1 è superiore a quella riscontrata nella popolazione generale: questo dato è valido certamente per i tumori del SNC (specialmente il glioma delle vie ottiche), il neurofibrosarcoma ed il feocromocitoma, il cui rischio o frequenza relativa sono alti, ma il rischio assoluto è basso (con frequenze intorno all'1% o più).

#### *Neurofibromi cutanei*

La caratteristica dell'NF1 sono i neurofibromi, tumori benigni delle cellule di Schwann che si presentano lungo i nervi periferici. I neurofibromi sono di diverse varietà, ma tutti contengono cellule di Schwann, componenti neurali, fibroblasti e mastociti. I più comuni sono quelli cutanei e quelli nodulari.

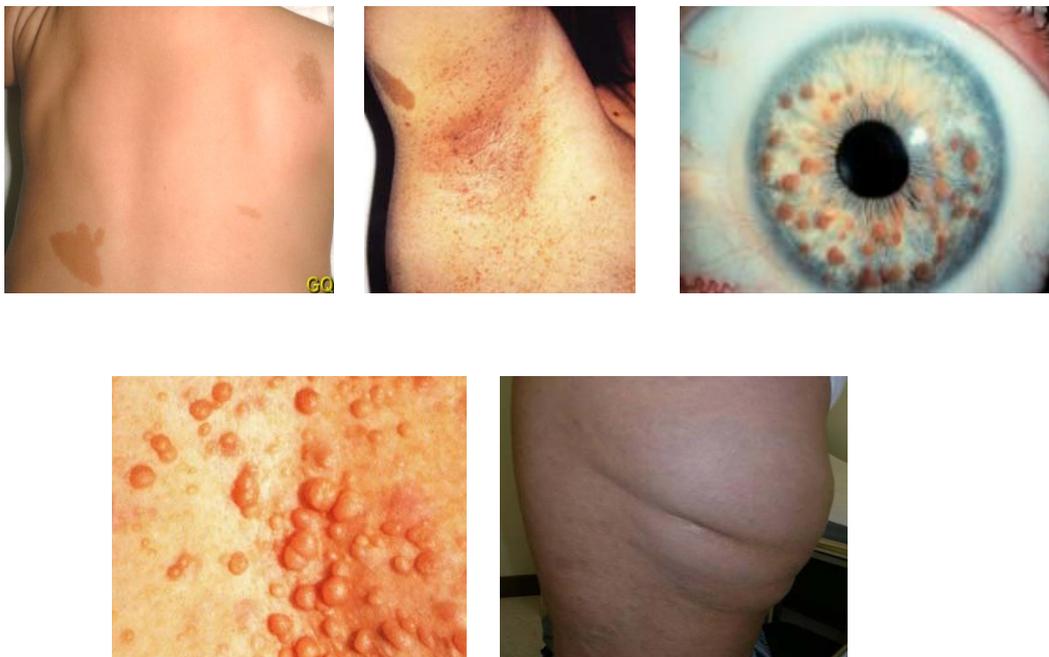
#### *Neurofibroma plessiforme*

È per frequenza (25-30%) la seconda complicanza dopo i disturbi d'apprendimento. Queste masse cutanee sono di consistenza molle, a margini mal definiti e dimensioni

variabili da pochi centimetri ad un'intera area del corpo. La cute sovrastante appare spesso iperpigmentata, ipertrofica o con ipertricosi.

### *MPNST*

Un neurofibroma plessiforme ha 5% di probabilità di progressione nella controparte maligna <sup>57</sup>, il neurofibrosarcoma, tumore maligno delle guaine dei nervi periferici (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) <sup>58</sup>. Questi sono rare neoplasie maligne solitamente correlate ad una prognosi negativa. In circa la metà dei casi gli MPNST insorgono in pazienti affetti da neurofibromatosi di tipo 1 <sup>57</sup>. Un paziente NF1 ha il 10% di rischio di sviluppare un MPNST nella vita <sup>58</sup>. L'età media dei pazienti NF1 al momento della diagnosi di MPNST è minore (28 anni) rispetto a quella dei pazienti affetti da MPNST sporadici (39 anni), e l'intervallo medio tra la diagnosi di MPNST e l'occorrenza della prima ricorrenza o metastasi del tumore risulta più breve negli individui NF1 che nei casi sporadici <sup>59</sup>. Infine la sopravvivenza a 5 anni dalla prima diagnosi è significativamente più bassa tra i pazienti NF1 <sup>59</sup>.



*Figura 5. Principali manifestazioni cliniche della neurofibromatosi di tipo 1. In alto da sinistra: macchie caffelatte, lentiginosi noduli di Lisch. In basso da sinistra: neurofibromi cutanei, neurofibroma plessiforme.*

## Epidemiologia genetica

- **Prevalenza.** La prevalenza della neurofibromatosi tipo 1 è di circa 1 su 4000 individui <sup>60</sup>. Non esiste prova che le differenze etniche si associno a cambiamenti nel numero degli individui affetti dal momento che famiglie e pazienti con l'NF1 sono stati riportati in tutto il mondo e che anche la distribuzione delle complicanze che si associano alla malattia è la stessa in tutte le popolazioni conosciute <sup>60</sup>.
- **Penetranza.** La NF1 è una malattia a penetranza completa <sup>60</sup>. La completa penetranza della NF1 implica che, se nasce un figlio affetto da due genitori inequivocabilmente non affetti, questo rappresenterà una nuova mutazione, e per i genitori il rischio di avere altri figli NF1 sarà molto basso.
- **Espressività variabile.** L'espressività variabile può raggiungere nella NF1 dei livelli drammatici; è noto che grandi famiglie con più individui affetti mostrino un ampio spettro di gravità di segni clinici e di complicanze, e che la variabilità all'interno di una famiglia di questo tipo è simile alla variabilità che si ha tra famiglie diverse; dato che tutti gli individui affetti di una famiglia sono portatori della stessa mutazione, quest'ultima si associa a fenotipi diversi nelle diverse persone <sup>60</sup>.

## Mutazioni *de novo*

Circa la metà dei pazienti NF1 presenta una storia familiare positiva <sup>60</sup>. Assumendo una penetranza completa della malattia, il 50% dei casi NF1 è dovuto a mutazioni *de novo*. La presenza di una mutazione di questo tipo si ipotizza quando una mutazione viene identificata in un paziente con entrambi i genitori sani. Considerando la prevalenza della malattia e la frequenza dei casi sporadici, il gene *NF1* presenta una delle più alte frequenze di mutazione per singolo *locus* conosciute nell'uomo <sup>61</sup>. Le stime attuali permettono di calcolare un tasso di nuove mutazioni che varia tra 1 su 7800 e 1 su 23000 gameti, circa dieci volte più alto rispetto alla maggior parte dei geni conosciuti (la variabilità riflette sia le differenze nelle diagnosi ed identificazioni dei casi sporadici fatte dai vari gruppi, sia le fluttuazioni statistiche e i diversi metodi usati per calcolare il tasso di mutazione). La ragione di un tasso di mutazione così elevato non è ben chiara e sono state avanzate diverse ipotesi sui meccanismi che lo determinano:

- le dimensioni del gene

- un probabile meccanismo di mutazione potrebbe coinvolgere i siti CpG. Generalmente i dinucleotidi CpG mostrano un alto tasso di mutazione dovuto alla spontanea tendenza della 5-metilcitosina a subire una deaminazione in timina
- *loci* omologhi al gene *NF1* sono stati identificati sui cromosomi 2, 12, 14, 15, 18, 20, 21 e 22<sup>25</sup> e non si può escludere che alcune mutazioni possano venire introdotte per conversione genica tra questi frammenti di DNA non funzionale ed il gene *NF1*

È importante tenere presente che i meccanismi descritti non sono tra loro mutuamente esclusivi, per cui più di uno di essi potrebbe contribuire ad aumentare il tasso di mutazione nel gene *NF1*.

Più dell' 80% delle nuove mutazioni sono di origine paterna<sup>62, 63</sup>, ad eccezione delle delezioni dell'intero gene, che costituiscono circa il 5% delle mutazioni a carico del gene *NF1*<sup>64</sup>. Nonostante sia stato ipotizzato un effetto dell'età paterna sul tasso di mutazione<sup>65, 66</sup>, se questo esiste, deve essere modesto<sup>67</sup>.

### **Patologia molecolare**

La ricerca di mutazioni nel gene *NF1* risulta particolarmente complessa a causa delle grandi dimensioni del gene e della assenza di "hotspot" di mutazione<sup>61</sup>. La maggior parte delle mutazioni provocano l'introduzione di un codone di terminazione prematuro e la produzione di una proteina tronca<sup>61</sup>. Presumibilmente, queste mutazioni provocano l'inattivazione della neurofibromina e sono a sostegno dell'ipotesi che la *NF1* sia una malattia dovuta ad una diminuzione dei livelli intracellulari di neurofibromina. Le piccole delezioni e le piccole inserzioni sono particolarmente frequenti e costituiscono circa un terzo delle mutazioni totali<sup>61</sup>. In genere, specifiche mutazioni non si associano a fenotipi caratteristici. Questa assenza di correlazione genotipo-fenotipo non deve comunque sorprendere in una malattia in cui non esiste correlazione clinica a livello intrafamiliare, e neppure tra gemelli monozigoti. Un'eccezione è rappresentata dai pazienti portatori di delezioni dell'intero gene, che costituiscono il 5% circa del totale dei pazienti *NF1*<sup>68</sup>. Questi individui presentano un numero di neurofibromi generalmente maggiore e un quoziente intellettivo più basso rispetto ai pazienti non microdeleti, e spesso si presentano con delle caratteristiche facciali distintive<sup>68</sup>. In questi pazienti è stato anche riportato un aumentato rischio per lo sviluppo di tumori, in particolare di MPNST<sup>69</sup>. La maggior parte delle microdelezioni del gene *NF1* sono di due tipi<sup>70, 71</sup>. Il tipo I è il più frequente, ha origine meiotica e si estende per 1.4 Mb<sup>70</sup>. I breakpoints di delezione sono localizzati in dei "low copy repeats (LCR, *NF1REP* A e C) fiancheggiati la regione microdeleta e 17

geni localizzati in questa regione <sup>70</sup>. La microdelezione di tipo II è più piccola (circa 1.2 Mb) e ha origine mitotica <sup>72</sup>. I breakpoints sono localizzati rispettivamente nel gene e nello pseudogene *JAZZ1* e *SUZ12*, e la delezione include un totale di 16 geni <sup>72</sup>. La microdelezione di tipo I si presenta spesso in mosaico <sup>73</sup>, e questa può essere la ragione per cui il fenotipo ad essa associato è in genere meno severo. Delezioni atipiche, con breakpoints diversi da quelli localizzati negli LCR repeats e dal gene/pseudogene *JAZZ1* sono più rare, ma sono anch'esse riportate.

### Mutazioni somatiche

Molti studi sulle mutazioni somatiche hanno dimostrato l'ipotesi che il gene *NF1* funzioni come un gene tumore-soppressore <sup>74-77</sup>.

Il modello dei geni tumore-soppressore, è stato formulato inizialmente da Knudson nel 1971 per spiegare la differenza tra le forme familiari e quelle sporadiche di retino blastoma <sup>78</sup> e prevede l'esistenza di geni "freno" che agiscano prevenendo la crescita cellulare incontrollata; mutazioni genetiche, ereditate o accumulate durante la vita, che inattivino tutte e due le copie di questi geni, portano allo sviluppo di tumori (Figura 6) <sup>78</sup>.

Nei tumori familiari si ha un allele inattivato costituzionalmente (ereditato) e l'altro inattivato in seguito ad una seconda mutazione a livello somatico. Nella popolazione generale il cancro solitamente non si presenta in giovane età, dato che le due mutazioni devono presentarsi indipendentemente; ma, per gli individui nati già con una copia del gene tumore-soppressore inattivata, ogni cellula parte molto svantaggiata: resta solo una copia sana del gene, e per questo si sviluppano con maggiore frequenza tumori in diversi tipi di tessuto.

Nel caso dell'*NF1* tutto questo significa che gli individui affetti ereditano una copia del gene mutato da un genitore, ma i neurofibromi si sviluppano solo quando anche il secondo allele diventa non funzionale a seguito di una mutazione somatica.

L'inattivazione somatica dell'allele selvatico di un gene tumore soppressore può coinvolgere grossi riarrangiamenti genomici (perdite di eterozigotità, LOH) o piccole alterazioni nella sequenza genica (mutazioni somatiche); nel gene *NF1* non è stata mai identificata inattivazione del promotore dovuta ad alterazione nel pattern di metilazione. La maggior parte degli studi iniziali sulle alterazioni somatiche di *NF1* è stata focalizzata sulla ricerca di perdite di eterozigotità (LOH), anche se la prevalenza di LOH stimata sui neurofibromi cutanei e plessiformi varia largamente da uno studio all'altro, dal 3% al 57%,

probabilmente a causa della eterogeneità cellulare che caratterizza i campioni tumorali <sup>74</sup>, <sup>75</sup>, <sup>79</sup>. Infatti, a livello del neurofibroma la seconda copia del gene *NF1* viene inattivata solo in un clone di cellule di Schwann, mentre le cellule di Schwann rimanenti, insieme agli altri tipi cellulari che compongono il neurofibroma, come i mastociti, le cellule perineurali, i fibroblasti, e le cellule endoteliali mantengono una copia funzionale del gene. Uno studio recente ha confrontato i livelli di LOH in neurofibromi prelevati da pazienti portatori di mutazioni germinali, rispetto ai livelli di LOH presenti in neurofibromi prelevati da pazienti portatori di microdelezioni dell'intero gene, e ha dimostrato che il meccanismo di inattivazione a livello somatico del gene *NF1* è diverso a seconda del tipo di mutazione germinale del paziente <sup>80</sup>. Se il paziente è portatore di una mutazione puntiforme il neurofibroma presenterà LOH, mentre se il paziente è portatore di una microdelezione il neurofibroma non presenterà LOH <sup>80</sup>. Una possibile spiegazione è che tra i 17 geni contenuti nella microdelezione ce ne possa essere qualcuno letale se deleto in omozigosi. Un'altra è che nei pazienti con microdelezione l'allele selvatico sia più vulnerabile alla mutazione perché il meccanismo di riparo del DNA (double-strand break repair) non può operare nella modalità priva di errori in quanto manca il cromatide fratello utilizzato come stampo. Questa seconda ipotesi spiegherebbe un aumento delle mutazioni somatiche rispetto alle perdite di eterozigosità nei pazienti microdeleti, ma difficilmente spiegherebbe la loro assenza. Mentre l'LOH è stata studiata a fondo nei tumori associati alla *NF1*, le mutazioni somatiche sono state studiate meno, a causa delle dimensioni del gene, e poiché la presenza di queste mutazioni è circoscritta alle cellule di Schwann per cui potrebbero non venire identificate se la tecnica utilizzata non è sufficientemente sensibile. Questo problema è stato brillantemente risolto da Maertens et al. 2006 <sup>81</sup> che hanno effettuato uno screening di mutazione direttamente su cellule di Schwann isolate dal neurofibroma e messe in coltura, eliminando in questo modo il "background" genetico rappresentato dal genotipo selvatico delle altre cellule che compongono il tumore. Utilizzando questa strategia, Maertens et al. 2006 <sup>81</sup> hanno identificato la mutazione somatica nel 76% dei neurofibromi, dimostrando che questo è il meccanismo principale attraverso il quale viene inattivata la copia selvatica del gene *NF1* a livello tumorale.

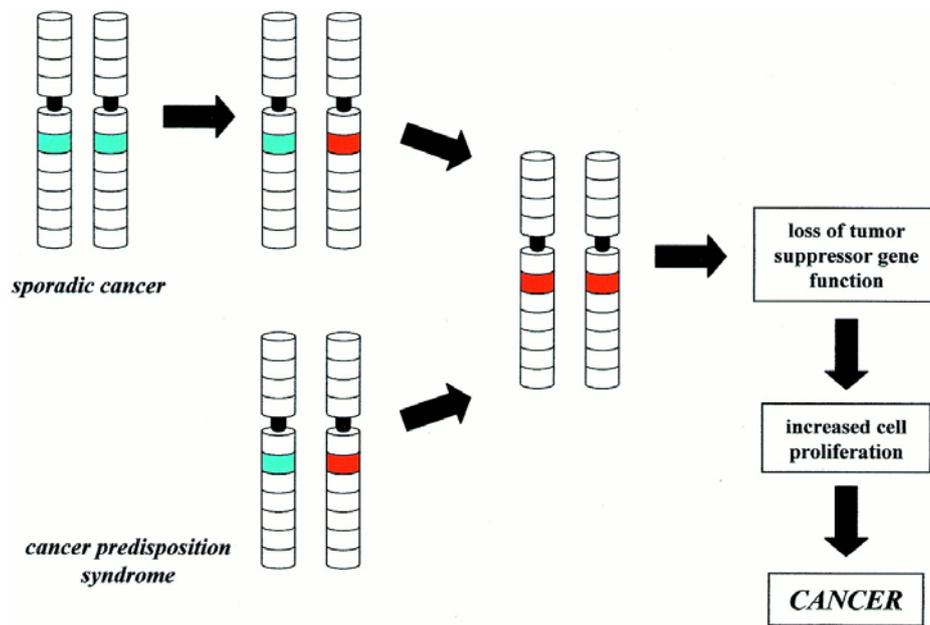


Figura 6. Ipotesi “two-hit” per la genesi dei tumori. Per un cancro sporadico l’inattivazione funzionale di uno specifico gene oncosoppressore non è sufficiente; sono necessari due separati eventi mutazionali. Nella NF1 invece, poiché una delle due copie del gene viene inattivata a livello costituzionale, per la proliferazione neoplastica è sufficiente una sola mutazione. L’allele selvatico (funzionale) è indicato in verde, quello mutato (non funzionale) in rosso.

### Neurofibromatosi tipo 1 a mosaico (segmentale)

Per mosaico genetico o mosaicismo si intende la presenza, in un individuo pluricellulare, di due o più linee genetiche diverse, ossia di diversi patrimoni genetici all'interno di una stessa cellula che vengano espressi contemporaneamente <sup>82</sup>. In pratica, non tutte le cellule di quell'organismo hanno lo stesso corredo cromosomico, oppure lo esprimono in maniera variabile. L'effetto clinico di un mosaicismo dipende dallo stadio embrionale in cui è avvenuta la mutazione: nel caso di una mutazione precoce si avrà un fenotipo generalizzato, nel caso di una mutazione più tardiva il fenotipo malato sarà confinato ad una singola regione del corpo <sup>82</sup>. Il mosaicismo può essere di tipo germinale, somatico (interessa solo le cellule somatiche e non la linea germinale), o gonosomico (interessa sia la linea somatica che quella germinale) <sup>82</sup>.

Nel contesto della NF1 vi sono soggetti sia in età pediatrica che adulta, che presentano uno o più segni della malattia circoscritti ad una o più regioni del corpo <sup>83-88</sup> (Figura 7); queste persone hanno genitori non affetti e, in rare occasioni, possono avere un figlio con NF1 classica: rappresentano infatti dei casi di mutazioni del gene *NF1* avvenute nei primi stadi dell'embriogenesi, cosicché solo i derivati delle linee cellulari mutanti presentano i sintomi della patologia. Inoltre se il mosaicismo coinvolge la linea germinale, la malattia può essere trasmessa <sup>89</sup>. Questa condizione clinica prende il nome di neurofibromatosi "segmentale" (SNF1) o "a mosaico" (definizione che tiene in considerazione la patogenesi di questa condizione causata da mosaicismo somatico del gene della NF1) e non rappresenta una entità distinta ma fa parte del fenotipo della NF1 <sup>88</sup>. La prevalenza della NF1 a mosaico/segmentale è di circa 1 su 36.000-40.000 individui nella popolazione generale, cioè dello 0.002% <sup>88</sup>.

I soggetti affetti possono presentare in segmenti corporei circoscritti:

- 1) solo anomalie pigmentarie (macchie pigmentarie e/o lentiginosi)
- 2) solo neurofibromi (cutanei e/o nodulari)
- 3) associazione di anomalie pigmentarie e neurofibromi
- 4) neurofibromi plessiformi isolati

A livello cellulare è stato evidenziato come la porzione di cute affetta sia costituita da un mosaico di cellule sane e di cellule mutate <sup>90</sup>. Tra queste ultime, alcune tipi cellulari sono portori di un secondo "hit" – mutazione o LOH – che insieme alla mutazione post-zigotica inattiva entrambe le copie del gene <sup>90</sup>. Come nella NF1 classica, il secondo "hit" si osserva

nelle cellule di Shwann nei neurofibromi, e nelle zone di cute iperpigmentata nei melanociti.

In rari casi, caratterizzati dalla ricorrenza della malattia in una famiglia con entrambi i genitori sani, un mosaicismismo germinale può mimare una non penetranza. Comunque, poiché il rischio di ricorrenza in famiglie con entrambi i genitori sani è molto basso, il mosaicismismo germinale sembra essere un evento molto raro.



*Figura 7. Neurofibromatosi tipo 1 segmentale (a mosaico). A sinistra: in questo bambino le macchie caffelatte e la lentiginosi sono localizzate alla regione toracica sinistra e nel braccio sinistro. Le altre aree del corpo sono prive di lesioni. A destra: in questo soggetto si notano neurofibromi cutanei localizzati alla regione inguinale sinistra.*

## Scopo del lavoro

Il concetto classicamente definito come “un gene-una proteina” è stato negli ultimi decenni smentito dagli studi sulla struttura e funzionamento del genoma umano, che hanno dimostrato come questo sia estremamente complesso: le regioni codificanti rappresentano solo l'1,5% della sequenza totale, con un'abbondanza di regioni regolatrici il cui ruolo è per lo più sconosciuto. Inoltre le singole unità geniche codificano per più prodotti a causa di numerosi meccanismi mediante i quali la trascrizione di un singolo gene viene regolata per produrre isoforme diverse, o addirittura proteine con funzione differente (uso di promotori alternativi, splicing alternativo, poliadenilazione alternativa, correzione dell'RNA, taglio post-traduzionale). Questa complessità rende estremamente ardua l'analisi molecolare di geni le cui mutazioni associano a patologie note, richiedendo spesso l'utilizzo di più protocolli di analisi indipendenti, soprattutto nel caso di geni di grandi dimensioni.

Il primo obiettivo di questa tesi sarà la messa a punto di una serie di protocolli sperimentali e di tecnologie innovative applicabili all'analisi del DNA genomico e dell'RNA messaggero volte a migliorare l'efficienza e la sensibilità dell'analisi molecolare di geni che mostrano una elevata complessità strutturale. Il gene preso a modello sarà il gene *NF1*, un ottimo modello di complessità genomica. A causa delle sue dimensioni, della presenza di una notevole eterogeneità allelica e dell'assenza di hotspot di mutazione, la caratterizzazione completa dell'intera sequenza codificante del gene risulta molto complessa, impiegando tempi di analisi lunghi e costi elevati. Le tecniche che in passato sono state maggiormente utilizzate nello screening di mutazione del gene *NF1* includono il single strand conformation analysis <sup>91</sup>, il denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) <sup>61</sup>, il sequenziamento diretto <sup>61</sup>, il protein truncation test (PTT) <sup>92, 93</sup> e la dHPLC <sup>94, 95</sup>. In particolare la messa a punto di un protocollo basato sulla dHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) <sup>94, 95</sup> ha consentito di avviare presso l'Istituto CSS-Mendel (anno 2001) un programma di screening di mutazione nel gene *NF1* in una larga casistica di pazienti con diagnosi clinica di neurofibromatosi di tipo 1. Poiché per sua definizione, la tecnica dHPLC permette solo l'identificazione di mutazioni puntiformi e di piccole delezioni e inserzioni, allo scopo di identificare anche i riarrangiamenti del gene *NF1*, questa tesi riguarderà lo screening mediante MLPA, una tecnica che permette l'analisi quantitativa dei singoli esoni del gene *NF1*, di tutti i pazienti risultati negativi allo screening dHPLC. In particolare, lo scopo di questo punto della tesi è di determinare la frequenza nel gene *NF1* di riarrangiamenti di singoli esoni e multiesonici, ancora

controversa, e di stabilire eventuali correlazioni genotipo-fenotipo. In parallelo, questo punto permette anche di valutare la possibilità di utilizzare questa tecnica per identificare le delezioni dell'intero gene, associate ad una forma grave della malattia.

Le basi molecolari del mosaicismo nell'NF1 non sono state ancora del tutto chiarite, in particolare quando esiste il sospetto clinico di un mosaicismo gonadico. La seconda parte di questa tesi riguarderà lo studio di una delezione intragenica del gene *NF1* individuata in un caso di mosaicismo germinale. Al fine di quantificare la percentuale di cellule spermatiche mutate, verrà applicata un'analisi di PCR real time. Questo studio contribuirà a migliorare l'accuratezza del calcolo del rischio di ricorrenza in pazienti affetti da NF1 in mosaico, e quindi a migliorare la consulenza genetica per le famiglie affette.

Poiché è stato dimostrato che le mutazioni del gene *NF1* sono in larga parte coinvolte nel processo di splicing, e tra queste molte mappano al di fuori dei siti canonici dello splicing, una terza parte del lavoro riguarderà la caratterizzazione dal punto di vista funzionale di tutte le varianti nucleotidiche presenti esclusivamente nel campione dei pazienti, che non alterino i siti *consensus* AG e GT maggiormente conservati dello splicing, ma che per la loro localizzazione lungo la sequenza del gene potrebbero svolgere un ruolo patogenetico.

L'ultimo obiettivo di questa tesi sarà quello di applicare i protocolli messi a punto per il gene *NF1*, all'analisi molecolare dei geni del pathway MAPK in diversi tipi tumorali. Inizialmente verranno definite le caratteristiche molecolari dei tumori della guaina dei nervi periferici (MPNST) in casi sporadici e in soggetti affetti da neurofibromatosi 1, al fine di individuare una "firma molecolare" che distingua le due tipologie di tumore. Gli stessi protocolli verranno utilizzati per investigare il ruolo della cascata del segnale delle MAP chinasi nella patogenesi del cancro coloretale sporadico, un tumore maligno del grosso intestino che rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei paesi occidentali.

# Parte 1 – Sviluppo di un protocollo MLPA-real time PCR per la ricerca di delezioni-duplicazioni singolo-multiesoniche

## Materiali e metodi

### Pazienti

Nel corso di questo studio sono stati analizzati 63 soggetti di nazionalità Italiana e di origine caucasica non imparentati tra loro con sospetto di neurofibromatosi tipo 1, afferiti all'Istituto CSS-Mendel dal 2001 al 2008. La diagnosi di NF1 è stata effettuata in base alla presenza dei criteri diagnostici della malattia. In collaborazione con i centri clinici di riferimento, sono stati raccolti per tutti i pazienti dati clinici completi, sulla base di un protocollo diagnostico e di un questionario dedicato. Tutti i pazienti erano risultati negativi ad una precedente ricerca di mutazioni puntiformi condotto tramite dHPLC e sequenziamento diretto<sup>94, 95</sup>. Per ogni paziente è stato effettuato un prelievo di sangue periferico da cui successivamente è stato estratto il DNA genomico seguendo un protocollo fenolo-cloroformio. I pazienti NF1 sono stati analizzati per la ricerca di sbilanciamenti di dose a carico del gene *NF1* mediante la tecnica MLPA. Tutti i pazienti risultati positivi all'MLPA sono stati confermati mediante PCR Real-Time e FISH.

### Analisi MLPA

Lo screening delle delezioni e inserzioni esoniche e multiesoniche del gene *NF1* è stato effettuato utilizzando il saggio MLPA SALSA P081/P082 NF1 (versione 04, 05-02-2005) (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), secondo il protocollo indicato nel kit. Il saggio SALSA P081/p082 NF1 MLPA consiste di due mix di reazione contenenti le sonde per tutti gli esoni del gene *NF1*, ad eccezione degli esoni 5, 7, 17, 19a, 45, e 47. In particolare, 100 ng di DNA genomico sono stati denaturati e ibridati per una notte con le sonde esone-specifiche, sottoposti a reazione di ligazione, e successivamente amplificati in una reazione di PCR. Gli amplificati ottenuti sono stati separati mediante un sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA). L'area di ogni frammento è stata quantificata con il programma GeneScan Analysis Software versione 3.7 (Applied Biosystem, Foster City, CA). I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Coffalyser (MRC-Holland). Con questo metodo i risultati sono dati come numero di copie alleliche rispetto ai soggetti di controllo, e un rapporto di ~1 dovrebbe essere ottenuto se entrambi gli alleli sono presenti. Una riduzione

o un aumento dei valori dell'area del picco rispettivamente  $<0.7$  o  $>1.3$  viene considerato corrispondente ad una delezione o ad una duplicazione. La stessa procedura utilizzata per il saggio MLPA SALSA P081/P082 NF1 è stata utilizzata per il kit MALPA SALSA P122 NF1 area. Questo è un altro saggio disegnato specificamente per identificare le delezioni che comprendono l'intero gene *NF1*. In particolare, il kit SALSA P122 area contiene quattro sonde centromeriche (nei geni *CRLF3*, *FLJ2735*, *CENTA2*, *RNF135*), cinque sonde intrageniche (esoni *NF1* 1, 12b, 23-2, 40 e 48), e tre sonde telomeriche del gene *NF1* (nei geni *HCA66*, *JJAZ1*, *KIAA0563-related gene*).

#### PCR real time mediante chimica SYBR green

I riarrangiamenti identificati mediante MLPA sono stati confermati mediante real-time PCR utilizzando un apparecchio ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) e il SYBR Green (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) come metodo di rivelazione. Per considerare le possibili variazioni legate alla quantità iniziale di DNA e alla presenza di inibitori nella reazione di PCR, per ciascun paziente è stato analizzato in contemporanea il gene di riferimento *ZNF80* in un altro tubo di PCR. La miscela della reazione di amplificazione (15 $\mu$ l) conteneva il master mix SYBR Green, 150 $\mu$ M di primer forward e primer reverse, e 60ng di DNA genomico. La reazione di PCR è stata effettuata alle seguenti condizioni: 2 minuti a 50°C, 2 minuti a 95°C, 40 cicli a 95°C per 30 secondi, da 52°C a 67°C (a seconda degli esoni) per 30 secondi, e 72°C per 30 sec. Dopo la reazione di amplificazione è stata generata una curva di denaturazione per ogni prodotto di PCR per stabilire la specificità della PCR (assenza di dimeri di primer o di altri prodotti non specifici). Ogni saggio includeva un controllo negativo senza template, un DNA di controllo non-deleto (CTRL-1) come calibratore, il DNA del paziente (in triplicato). I valori di soglia (Ct) ottenuti con il programma SDS versione 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA) sono stati esportati in un foglio Excel (Microsoft, Seattle, WA) per le analisi successive. Il calcolo del  $\Delta\Delta Ct$  per la quantificazione relativa del target è stato effettuato come segue:  $\Delta\Delta Ct = (Ct, \text{esone NF1 target} - Ct, \text{ZNF80})x - (Ct, \text{esone NF1 target} - Ct, \text{ZNF80})y$ , dove  $x$  = campione NF1 non caratterizzato e  $y$  = CTRL-1. I risultati relativi ad ogni campione sono stati espressi in cambiamenti di N-volte nelle copie dell'esone target in  $x$ , normalizzati al numero di copie relative del gene *ZNF80* nel campione di controllo CTRL-1, secondo la seguente equazione: copie di esone target =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Il saggio è stato ripetuto se le curve di amplificazione non riflettevano una cinetica esponenziale o il numero di copie del gene era inferiore a 0.7 o superiore a 1.3. Nei casi in cui il numero di

copie esoniche era compreso tra 0.7 e 1.3 è stato ipotizzato che il campione fosse portatore di due copie dell'esone target (N-volte = 1). Casi con un N-fold <0.7 sono stati considerati deleti.

## FISH

L'analisi FISH è stata effettuata utilizzando quattro sonde (RP11-353O18, RP11-17I16, CTD-2283L18 e CTD-3060L5) selezionate dal database pubblico UCSC (<http://genome.ucsc.edu>). Il clone RP11-353O18 si estende dall'introne 1 all'introne 27b del gene *NF1*. La sonda RP11-17I16 copre la porzione residua del gene *NF1* e parte del gene fiancheggiante *RAB11-FIP4*. Le sonde CDT-2283L18 e CDT-3060L5 attraversano rispettivamente i geni *JJAZ1* e *LRRC37B*. I cloni sono stati ottenuti dall'Istituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>). La marcatura e l'ibridazione delle sonde è stata effettuata come riportato in precedenza.

## **Risultati**

Sessantatrè pazienti negativi per le mutazioni puntiformi e le delezioni/inserzioni del gene *NF1* sono stati analizzati con il saggio MLPA SALSA P081/082 *NF1* che permette di identificare i riarrangiamenti di singoli esoni e multiesonici del gene *NF1*. L'analisi MLPA ha identificato un riarrangiamento al locus *NF1* in 30/63 (47.6%) pazienti. In totale, l'MLPA ha evidenziato nel gene *NF1*, 11 delezioni da singolo esone, 8 delezioni multiesoniche, 9 delezioni dell'intero gene, e due delezioni localizzate nell'introne 27b, che includevano il piccolo gene "oligodendrocyte-myelin glycoprotein (*OMG*). Due delle delezioni multiesoniche includevano esoni non contigui. In un paziente (111), l'analisi MLPA ha dato risultati ambigui con tutti gli esoni che presentavano valori MLPA superiori a quelli dei pazienti deleti, ma inferiori a quelli mostrati dai pazienti non deleti, suggerendo un mosaico per una delezione dell'intero gene. Dopo l'analisi MLPA, tutti i casi con segnali MLPA anomali sono stati rianalizzati mediante PCR real-time utilizzando il SYBR Green come sistema di detenzione. Le delezioni da singolo esone sono state confermate attraverso un singolo saggio real-time, mentre le delezioni multiesoniche sono state confermate rianalizzando mediante real-time tutti gli esoni compresi nella delezione. Tutte le delezioni identificate dall'MLPA, inclusi due riarrangiamenti che includevano esoni non contigui tra loro, sono state confermate dall'analisi real-time. Una lista dei riarrangiamenti identificati dall'MLPA e confermate con real time PCR è riportata in Tabella 1. Le delezioni degli esoni 12a e 18 sono state rispettivamente identificate in due e tre pazienti tra loro apparentemente non imparentati. La delezione degli esoni 3-4a è stata identificata in tre

pazienti. Nel paziente 175, la delezione degli esoni 3-4a è stata identificata come unica anomalia del gene *NF1*, nel paziente 113 questa delezione è stata trovata in combinazione con la delezione degli esoni 23-1 e 23-2, e nel paziente 201 questa delezione è stata rilevata come parte di un riarrangiamento multiesonico che coinvolgeva gli esoni 3-4a e 22. In due casi (41 e 216), è stata identificata come unica anomalia al locus *NF1* la delezione del gene *OMG*. I punti di rottura delle delezioni non erano distribuiti a caso lungo la sequenza genica, ma mappavano prevalentemente in specifici esoni. Venticinque dei 42 breakpoint di delezione erano localizzati in soli 9 introni e quattro punti di rottura mappavano nell'introne 4a. Gli introni 2, 11, 17, 18 e 34 contenevano ciascuno tre punti di rottura e gli introni 21, 22 e 36 presentavano ognuno altri due punti di rottura.

Il saggio MLPA SALSA P081/082 *NF1* ha identificato 9 casi con delezione dell'intero gene. Questi risultati sono stati confermati utilizzando il kit MLPA SALSA P122 *NF1* area, un saggio MLPA alternativo, che consiste di 12 sonde che coprono l'intera area del gene *NF1* e i suoi geni fiancheggianti. Il kit MLPA SALSA P122 *NF1* area permette di distinguere tra le delezioni di 1.5 Mb (tipo I) che attraversano 14 geni, con punti di rottura nei "low-copy repeats", e le delezioni di 1.2 Mb (tipo II), che coprono 13 geni e sono dovute alla ricombinazione tra il gene *JJAZ1* e il suo pseudogene. Tutte le delezioni dell'intero gene identificate dal kit MLPA SALSA P081/082 *NF1* sono state confermate dal kit MLPA SALSA P122 *NF1*. In particolare, il kit SALSA P122 *NF1* ha identificato sei casi portatori di una delezione di tipo I e tre casi con una delezione di tipo II. Tutte le delezioni identificate mediante MLPA sono state ulteriormente confermate mediante FISH utilizzando sonde specifiche per le delezioni di tipo I e II (Tabella 2). Inoltre, nel paziente 111, l'analisi FISH effettuata su cellule del sangue periferico ha confermato una delezione di tipo I in mosaico, in cui il 66% delle metafasi mostrava un segnale del cromosoma 17 mentre il rimanente 34% delle cellule presentava due segnali. In totale, una delezione dell'intero gene *NF1* è stata identificata in 9/201 (9.5%) pazienti.

Dopo l'analisi genetica, le caratteristiche cliniche dei pazienti con delezioni di singoli esoni o multiesoniche e dei pazienti con delezioni dell'intero gene sono stati revisionate. In particolare, è stato esaminato un gruppo di pazienti con delezioni di singoli esoni o multiesoniche del gene *NF1* composto da 19 probandi e un familiare affetto. Tra questi, 14 pazienti erano femmine e 5 maschi. L'età media all'esame clinico è stata di 24 anni (compresa tra 1 e 68 anni), e 8/20 (42%) pazienti avevano almeno un parente di primo grado con la *NF1*. La frequenza delle manifestazioni cliniche in questi pazienti è mostrata in Tabella 3. Una media di 2.6 criteri diagnostici era presente in ciascun paziente. Sei o più

macchie caffelatte sono state osservate in tutti i soggetti, mentre la lentiginosi ascellare è stata riportata in 10/19 (53%) dei casi. I neurofibromi cutanei, sottocutanei e plessiformi sono stati identificati rispettivamente in 8/20 (40%), 6/20 (30%) e 5/20 (25%) pazienti. Otto pazienti sono stati esaminati da un oculista e tra questi, solo due presentavano i noduli di Lisch. Un glioma ottico sintomatico è stato rilevato in un solo paziente. Nessun paziente portatore di delezioni di singoli esoni o multiesoniche presentava ritardo mentale. Tumori diversi dal glioma ottico e dai neurofibromi sono stati osservati in cinque pazienti. Tra le complicanze di tipo non tumorale, 3/20 (15%) pazienti avevano la scoliosi, mentre la displasia dello sfenoide è stata osservata in un caso. Pectus excavatum e dismorfismi facciali sono stati descritti rispettivamente in un paziente. Tutti i pazienti con delezioni di singoli esoni o multiesoniche presentavano i criteri NIH per la diagnosi di NF1<sup>96</sup>, ad eccezione dei pazienti sporadici 131, 182 e 18 che si presentavano con le sole macchie caffelatte rispettivamente all'età di un anno, due anni e cinque anni. Tra i pazienti con delezione dell'intero gene, è stata osservata una media di 2.7 criteri diagnostici, Tra i soggetti con delezione dell'intero gene è stata osservata una media di 3.1 criteri diagnostici. Il gruppo includeva quattro maschi e cinque femmine con una età media di 27.2 anni (compresa tra 8-47 anni). Solo un paziente presentava storia familiare della malattia. Macchie caffelatte e lentiginosi ascellare sono stati osservati in tutti i pazienti. Neurofibromi cutanei e sottocutanei sono stati osservati rispettivamente in 7/9 (78%) e 4/9 (44%) pazienti. I neurofibromi plessiformi sono stati osservati in 4/9 (44%) pazienti e il ritardo mentale in 3/9 (33%) pazienti. Dei quattro pazienti sottoposti a visita oculistica, nessuno presentava i noduli di Lisch. La scoliosi è stata osservata in 6/9 (67%) pazienti, due casi hanno presentato anomalie toraciche e uno aveva la displasia della tibia con pseudoartrosi. Due pazienti avevano dismorfismi facciali. Un paziente (208) aveva la sindrome di Watson, presentando macchie caffelatte, neurofibromi, ritardo mentale, anomalie toraciche e stenosi della valvola polmonare. I due pazienti con la delezione del gene *OMG* presentavano entrambi diagnosi di NF1 secondo i criteri clinici NIH. In particolare, il paziente 216 aveva macchie caffelatte, neurofibromi cutanei e plessiformi, lentiginosi ascellare e scoliosi all'età di 43 anni, mentre il paziente 21 presentava, all'età di 20 anni, una forma severa di NF1, con macchie caffelatte, lentiginosi ascellare, neurofibromi cutanei e sottocutanei, scoliosi e ritardo mentale.

Tabella 1. Delezioni identificate mediante kit MLPA P081/P082 NF1 e confermate con PCR real-time

<b>Paziente</b>	<b>Esone/introne deleto</b>	<b>Tipo di riarrangiamento</b>
175	3,4a	Delezione multiesonica
113	3,4a, 23-1,23-2	Delezione multiesonica
34	4a	Delezione di singolo esone
201	3,4a, 22	Delezione multiesonica
61	9,10a,10b,10c,11,12a,12b,13,14,15	Delezione multiesonica
72	10a	Delezione di singolo esone
117	11	Delezione di singolo esone
29	12a	Delezione di singolo esone
182	12a	Delezione di singolo esone
125	18	Delezione di singolo esone
191	18	Delezione di singolo esone
202	18	Delezione di singolo esone
18	22,23-1	Delezione multiesonica
131	26,27a	Delezione multiesonica
227	IVS27b, 34	Delezione di singolo esone
307	27b,IVS27b,28,29,30	Delezione multiesonica
16	35	Delezione di singolo esone
190	35,36	Delezione multiesonica
196	36	Delezione di singolo esone
41*	IVS27b	Delezione intronica
216*	IVS27b	Delezione intronica

\* Questi casi presentano un segnale MLPA ridotto per le sonde *OMG* 4075-L3310 e 4069-L3311; I risultati MLPA sono stati confermati mediante PCR real-time utilizzando i seguenti primer: *OMG\_Forward* 5'-GGGTAGAACATGGAGTCCC-3'; *OMG\_Reverse* 5'-AGTTCCAACCAACATGCCC-3'.

Tabella 2. Risultati dell'analisi MLPA e FISH; delezioni dell'intero gene di tipo I e di tipo II

<b>Pazienti</b>	<b>55</b>	<b>248</b>	<b>208</b>	<b>45</b>	<b>71</b>	<b>111*</b>	<b>27</b>	<b>318</b>	<b>305</b>
<b>MLPA</b>									
Sonde centromeriche									
CRLF3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FLJ12735	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CENTA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RNF135	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sonde intrageniche									
Exon 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exon 12B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exon 23-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exon 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exon 48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sonde telomeriche									
HCA66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JJAZ1	+	-	-	+	-	-	-	+	-
KIAA0563-related	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<b>FISH</b>									
RP11-353O18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP11-17I16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTD-2283L18	+	-	-	+	-	-	-	+	-
CTD-3060L5	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<b>Tipo di delezione</b>	<b>II</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>I</b>

\* Delezione dell'intero gene di tipo I in mosaico; + = pazienti con segnale MLPA o FISH non deletato; - = pazienti con segnale MLPA o FISH deletato.

Tabella 3. Caratteristiche cliniche di 20 pazienti portatori di riarrangiamenti del gene *NF1*

Paziente	Eta' alla diagnosi (anni)	Sesso	Storia familiare	MC	NC	NS	NP	LA	NL	SC	GO	RM	PA	DT	Altri tumori	Altro
Pazienti con delezioni esoniche o multiesoniche																
29	57	F	Fa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	I
29a	24	M	Fa	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
201	28	F	S	+	-	-	+	n.v.	n.v.	-	-	-	-	-	-	astrocitoma
202	53	M	S	+	+	-	-	+	n.v.	-	-	-	-	-	-	-
131	1	F	S	+	-	-	-	-	n.v.	-	-	-	-	-	-	-
113	26	F	S	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	ipotiroidismo, UBOs, convulsioni
175	48	F	Fa	+	-	+	-	-	n.v.	+	-	-	-	-	-	neurinoma, meningioma, adenoma
227	30	F	Fa	+	+	-	-	+	n.v.	-	-	-	-	-	-	-
61	37	M	S	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	I
117	30	F	S	+	+	-	-	-	n.v.	-	-	-	-	-	-	Neurinoma dell'acustico
72	26	F	Fa	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	shwannoma
196	25	F	S	+	-	-	-	+	n.v.	-	-	-	-	-	-	-
34	9	F	Fa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190	15	M	S	+	-	-	-	+	n.v.	-	-	-	-	-	-	-
191	1	F	S	+	-	-	-	+	n.v.	-	-	-	-	-	-	amartoma
16	20	F	S	+	+	-	-	-	n.v.	-	+	-	-	-	-	-
182	2	M	S	+	-	-	-	-	n.v.	-	-	-	-	-	-	Dismorfismi facciali
18	5	F	S	+	-	-	-	-	n.v.	+	-	-	-	-	-	-
125	3	M	Fa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
307	34	F	Fa	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pazienti con delezione dell'intero gene																
55	35	M	S	+	+	+	+	+	n.v.	+	-	-	-	-	-	-
248	35	F	S	+	+	+	+	+	n.v.	+	-	+	-	-	-	Dismorfismi facciali
208	11	F	S	+	+	-	-	+	n.v.	+	-	+	-	-	-	anomalie del petto, SVP
45	26	M	S	+	+	+	-	+	n.v.	-	-	-	-	-	-	P
71	36	M	S	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
111	47	F	S	+	+	-	-	+	n.v.	+	-	-	-	-	-	I, PeExc
27	33	M	Fa	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	E
318	8	F	S	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Dismorfismi facciali
305	14	F	S	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Pazienti portatori di una delezione del gene <i>OMG</i>																
41	20	F	S	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
216	43	M	S	+	+	-	+	-	n.v.	+	-	-	-	-	-	-

+ presente; - assente; n.v.- non valutato; MC- Macchie caffelatte; NC- Neurofibromi cutanei; NS- Neurofibromi sottocutanei; NP- Neurofibromi plessiformi; LA- Lentiginosi ascellare; NL- Noduli di Lisch; SC- Scoliosi; GO- Glioma ottico; RM- Ritardo mentale; PA- Pseudoartrosi; DT- Displasia della tibia; M- Maschio; F- Femmina; Fa- Storia familiare positiva; S- Sporadico; I- Ipertensione; UBOs- Unidentified Bright Objects; NB- Nevo di Becker; SVP- Stenosi della valvola polmonare; P- Ptosia; E- Epilessia; PeExc- Pectus Excavatum.

## Discussione

Questa prima parte della tesi è stata volta a migliorare l'efficienza dell'analisi molecolare del gene *NF1*, attraverso la messa a punto di un protocollo MLPA-real time PCR per la ricerca di delezioni e duplicazioni singolo-multiesoniche. Il lavoro ha riguardato l'analisi di un gruppo di 63 pazienti affetti da *NF1*, nei quali l'intera sequenza codificante del gene, incluse le giunzioni esone-introne era stata precedentemente analizzata per la ricerca di mutazioni puntiformi <sup>94, 95</sup>. Questo progetto è stato avviato con l'obiettivo di definire, in maniera il più possibile approfondita, lo spettro mutazionale del gene *NF1* nella popolazione Italiana, ed allo stesso tempo di identificare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo, utili in una patologia caratterizzata da espressività variabile come la *NF1*. Nonostante siano state identificate centinaia di mutazioni nel gene *NF1* <sup>61, 91, 94, 95, 97</sup>, ad oggi non è stata identificata alcuna correlazione genotipo-fenotipo. L'unica eccezione sono le delezioni dell'intero gene, che sono presenti in circa il 5% dei pazienti *NF1* e sono generalmente associate ad una forma grave della malattia <sup>68</sup>, e una delezione di 3 paia di basi nell'esone 17 del gene *NF1*, che è stata recentemente associata con l'assenza di neurofibromi <sup>98</sup>. Mentre le delezioni dell'intero gene sono state studiate a fondo nella *NF1* <sup>68-71, 80, 99, 100</sup>, i riarrangiamenti più piccoli che includono uno solo o più esoni del gene *NF1* sono stati studiati in misura minore dal momento che sono difficili da identificare con le tecniche di biologia molecolare tradizionali. Di conseguenza, la frequenza di queste mutazioni nella *NF1* è ancora poco chiara. Allo scopo di determinare la frequenza dei riarrangiamenti di singoli esoni o multiesonici del gene *NF1*, abbiamo studiato mediante MLPA, una tecnica che permette l'identificazione di riarrangiamenti intragenici, tutti i pazienti *NF1* nei quali la presenza di una mutazione puntiforme o di una piccola delezione o inserzione era stata esclusa precedentemente mediante dHPLC <sup>94, 95</sup>. L'analisi MLPA ha identificato una delezione di uno o più esoni del gene *NF1* nel 9.5% dei pazienti. Questa frequenza è simile a quella rilevata in uno studio precedente, in cui le delezioni singolo e multiesoniche sono state identificate nel 10% di pazienti *NF1* con MPNST, ma è più alta di quella rilevata in un secondo studio in cui Wimmer et al. 2006 <sup>101</sup> hanno identificato riarrangiamenti di singoli esoni e multiesonici solo nel 2% dei casi *NF1*. La differente sensibilità riscontrata nei due studi può essere spiegata, almeno in parte, dalle diverse tecniche di screening utilizzate. Mentre nello studio di Wimmer et al. 2006 <sup>101</sup> la maggior parte dei campioni è stata analizzata utilizzando l'RNA messaggero come template, tutti i nostri casi sono stati studiati utilizzando come materiale di partenza il DNA genomico. Inoltre, i due gruppi di pazienti presi in considerazione nei due studi sono diversi, poiché la

maggior parte dei casi da noi esaminati era composta da pazienti Italiani, mentre Wimmer e colleghi hanno analizzato pazienti di origine diversa <sup>101</sup>. Inoltre, non si può escludere che parte della variazione sia dovuta alle limitate dimensioni del campione analizzato. Tra le delezioni identificate dall'MLPA, le delezioni dell'esone 12a e dell'esone 18 sono state identificate in pazienti diversi apparentemente non imparentati, rispettivamente in due e tre pazienti. Un'analisi aplo-tipica effettuata utilizzando un set di microsatelliti associati strettamente al *locus NF1* ha dimostrato che queste delezioni non rappresentano effetti del fondatore nella popolazione Italiana (dati non presentati nella tesi). Prese insieme, le delezioni degli esoni 12a e 18 rappresentano il 17.2% delle delezioni identificate con l'MLPA, ma considerando tutti i pazienti partecipanti allo studio, prese insieme sono responsabili solo del 2.5% dei casi, e per questo non è necessario dare priorità al loro screening nella diagnosi molecolare. Oltre alle delezioni degli esoni 12a e 18, anche la delezione degli esoni 3-4a è stata identificata in pazienti diversi. In un paziente (175), è risultata l'unica anomalia presente; in un secondo caso (113) è stata riscontrata insieme alla delezione degli esoni 23.1-23.2; in un terzo caso (201) è stata identificata insieme alla delezione dell'esone 22. Queste delezioni potrebbero rappresentare la coincidenza di due delezioni del gene *NF1*, l'occorrenza di una lesione patogenetica e di un cambio polimorfico, o la presenza di una delezione multiesonica coinvolgente esoni non contigui tra loro. Purtroppo, sia il paziente 113 che il paziente 201 sono casi sporadici, e di conseguenza non è stato possibile studiare l'origine di queste delezioni nei genitori. L'ipotesi più probabile è che queste delezioni siano parte di riarrangiamenti genomici non contigui verificatosi in cis sullo stesso allele del gene *NF1*. La coincidenza di due mutazioni del gene *NF1* in un singolo paziente è improbabile, dal momento che l'omozigotità per le mutazioni del gene *NF1* nel topo provoca uno sviluppo anomalo del cuore e porta a morte embrionale <sup>102</sup>. È anche improbabile che una delle delezioni sia un polimorfismo dal momento che le delezioni identificate dalla tecnica MLPA coinvolgono uno o più esoni del gene *NF1* e si suppone pertanto che abbiano un effetto patogenetico. Ad eccezione della delezione degli esoni 22-23.1, che è stata precedentemente riportata tutte le altre delezioni identificate in questo studio sono nuove. È interessante notare che i punti di rottura delle delezioni non sono distribuiti a random lungo la sequenza genica, ma sono più frequentemente localizzati in alcune regioni geniche piuttosto che in altre. In particolare, più della metà dei punti di rottura è localizzata in 9 introni del gene *NF1*. È possibile che alcuni di questi punti di rottura siano identici. In accordo con questa ipotesi, Wimmer e collaboratori <sup>101</sup> hanno identificato lo stesso punto di rottura mediato da una

sequenza ALU in due pazienti indipendenti con delezione dell'esone 2. Gli stessi autori hanno riportato due delezioni con diversi punti di rottura nell'esone 23.2 <sup>101</sup>.

I pazienti portatori di delezioni dell'intero gene *NF1* sono generalmente affetti da una forma grave di NF1, caratterizzata da un elevato numero di neurofibromi, presenza di neurofibromi plessiformi, dismorfismi facciali, ritardo mentale e un rischio aumentato di alcuni tumori <sup>68</sup>. Utilizzando il kit MLPA SALSA P081/082 *NF1* abbiamo identificato una delezione dell'intero gene nel 4.5% dei pazienti NF1. Dal momento che le delezioni dell'intero gene si riscontrano nel 4-5% dei pazienti NF1 <sup>68</sup>, la sensibilità del test MLPA nell'identificare queste lesioni potrebbe essere vicina al 100%. In accordo con questa ipotesi, il test MLPA ha identificato anche una delezione dell'intero gene in mosaico presente in solo il 66% delle cellule del sangue periferico. La maggior parte delle delezioni dell'intero gene è di due tipi <sup>70</sup>: il primo tipo, denominato tipo I è rappresentato da una delezione germinale di 1.5 Mb con i punti di rottura in "low-copy repeats" chiamati LCR <sup>70</sup>, mentre il secondo tipo, denominato tipo II, si estende su 1.2 Mb ed è dovuto alla ricombinazione tra il gene *JJAZZ1* e il suo pseudo gene <sup>70</sup>. Molti pazienti NF1 sporadici portatori della delezione di tipo II sono dei mosaici con cellule normali e generalmente presentano un fenotipo meno grave dei pazienti con delezione di tipo I <sup>99</sup>. Per questo motivo, lo sviluppo di un metodo sensibile, affidabile e facile da utilizzare che permette di distinguere tra delezioni di tipo I e delezioni di tipo II presenta importanti implicazioni cliniche. Secondo la nostra esperienza, l'analisi MLPA del gene *NF1* potrebbe rappresentare un metodo efficiente per lo screening delle delezioni del gene *NF1*, specialmente in quei laboratori dove la FISH non è disponibile.

L'identificazione, nei pazienti con delezioni del gene *NF1* esoniche o multiesoniche, di un fenotipo clinico sovrapponibile a quello degli altri pazienti NF1 non deve sorprendere dal momento che la maggior parte delle mutazioni del gene *NF1* (allo stesso modo delle delezioni esoniche e multiesoniche) sono mutazioni che inducono la perdita di funzione della proteina, essendo per la maggior parte rappresentata da mutazioni troncanti. A differenza dei pazienti con delezioni esoniche o multiesoniche, i pazienti portatori di delezioni dell'intero gene presentano un fenotipo più grave di quello osservato nella popolazione generale <sup>68</sup>. I neurofibromi cutanei, sottocutanei, e plessiformi, che sono stati trovati rispettivamente nel 78%, 44% e 44% dei pazienti con delezioni dell'intero gene <sup>68</sup>, sono stati rilevati nel 45%, 30% e 25% dei casi con delezioni di singoli esoni o multiesoniche. Allo stesso modo, la scoliosi è stata identificata con maggiore frequenza nei pazienti con delezioni dell'intero gene confronto ai pazienti con delezioni parziali del

gene *NF1*. Un paziente (208) con una delezione dell'intero gene era affetto da sindrome di Watson, presentando macchie caffelatte, neurofibromi, ritardo mentale, anomalie toraciche e stenosi della valvola polmonare. La sindrome di Watson è stata associata precedentemente in un paziente a una duplicazione in tandem del gene *NF1*<sup>103</sup> e in altri pazienti a piccole delezioni e mutazioni puntiformi<sup>103</sup>, dimostrando come questa sindrome possa risultare da un'ampia varietà di mutazioni del gene *NF1*. Non deve sorprendere che i pazienti con le delezioni dell'intero gene presentino un fenotipo più grave dei pazienti con delezioni di singoli esoni o multiesoniche del gene *NF1*. La maggior parte delle delezioni che comprende l'intero gene *NF1* si estende infatti lungo 1.2-1.5 Mb di DNA genomico, e risulta nell'aploinsufficienza di 13-14 geni diversi. Al contrario, le delezioni del gene *NF1* esoniche o multiesoniche sono lesioni più piccole, che coinvolgono generalmente solo il gene *NF1*. Anche il ritardo mentale, una delle caratteristiche principali dei pazienti con delezioni dell'intero gene, è stato identificato a una frequenza più elevata nei pazienti con delezione dell'intero gene che nei pazienti con riarrangiamenti intragenici, e in particolare nei pazienti portatori di delezioni di tipo I. Ciononostante, il ritardo mentale è stato osservato anche in un paziente (41) con una delezione nell'introne 27b, che includeva il gene *OMG*. Questa delezione è stata confermata mediante real-time PCR utilizzando dei primer specifici per il gene *OMG*, mentre non è stata identificata utilizzando dei primer per gli esoni 27b e 28, dimostrando che il riarrangiamento identificato nel paziente 41 era limitato all'introne 27b. Il gene *OMG* è un importante inibitore della crescita dei neuriti e agisce attraverso il gene *NOGO* e il suo recettore<sup>31</sup>. Si potrebbe ipotizzare che il ritardo mentale osservato nel paziente 41 sia dovuto all'aploinsufficienza del gene *OMG*, sebbene uno screening del gene *OMG* per mutazioni puntiformi effettuato in pazienti con ritardo mentale non-sindromico non abbia identificato alcuna mutazione patogenetica<sup>32</sup>. È importante sottolineare che il paziente 41 non è risultato l'unico paziente con la delezione del gene *OMG* identificato nel nostro gruppo; un secondo caso (216) è risultato portatore di questa delezione. Considerando che sia il paziente 41 che il paziente 216 sono affetti da *NF1*, questa delezione deve in qualche modo alterare la funzione del gene. Una possibile spiegazione è che l'introne 27b contenga importanti elementi regolativi, ad esempio sequenze consenso attivanti/inibenti lo splicing, localizzate all'interno dell'introne. In accordo con questa ipotesi, elementi di questo tipo sono stati precedentemente osservati sia nel gene *NF1*, che in altri geni tumore-soppressore.

In generale, il metodo MLPA SALSA P081/082 *NF1* è risultato un valido metodo per lo screening dei riarrangiamenti del gene *NF1*. Ciononostante, è consigliabile riconfermare

ciascun riarrangiamento identificato mediante MLPA con una tecnica alternativa, dal momento che è stato osservato che l'MLPA può identificare dei falsi positivi. A questo riguardo è stato dimostrato che mutazioni puntiformi nella regione della sonda MLPA possono influenzare la capacità di ibridazione della sonda con il template corrispondente, mimando la presenza di una delezione. Per evitare questa possibilità, nel nostro screening abbiamo utilizzato un protocollo in due fasi nel quale tutti i riarrangiamenti identificati dall'MLPA sono stati successivamente confermati mediante real-time PCR utilizzando il SYBR Green come metodo di rilevamento. Sebbene la FISH rimanga la tecnica di elezione per l'identificazione delle delezioni dell'intero gene, l'MLPA potrebbe rappresentare una valida alternativa, soprattutto in quei laboratori dove la FISH non è disponibile. Un vantaggio dell'MLPA rispetto alla FISH è rappresentato dalla possibilità di utilizzare lo stesso template (DNA genomico) sia per lo screening delle mutazioni puntiformi che per lo screening dei riarrangiamenti genomici. Comunque, la rapidità e la semplicità di utilizzo dell'MLPA rispetto alla FISH è bilanciato dalla necessità di confermare i risultati ottenuti con una tecnica alternativa. A questo proposito, la conferma con il SYBR Green presenta diversi vantaggi, tra cui la possibilità di utilizzare limitate quantità di DNA e costi limitati dovuti alla possibilità di utilizzare gli stessi primer utilizzati per lo screening dHPLC.

Nel nostro campione, le delezioni di uno o più esoni del gene *NF1* sono state identificate nel 9.5% dei pazienti. Lo spettro di questi riarrangiamenti è risultato eterogeneo, con una proporzione simile di delezioni di singoli esoni e multiesoniche. In accordo con gli studi precedenti, le delezioni dell'intero gene sono state identificate nel 4.5% dei pazienti. In precedenza, utilizzando la dHPLC e il sequenziamento diretto, abbiamo identificato una mutazione puntiforme o una delezione/inserzione in 138/201 (68.7%) pazienti NF1. È anche possibile che mutazioni in regioni regolative del gene possano avere un ruolo patogenetico nella NF1. Sebbene mutazioni nel promotore del gene *NF1* non siano state ad oggi identificate<sup>33</sup>, lesioni in altre regioni codificanti non possono essere escluse. Inoltre, non possiamo escludere la possibilità che alcune mutazioni non siano state identificate dal nostro protocollo.

In conclusione, l'analisi MLPA seguita dalla real-time PCR ha identificato 29 riarrangiamenti genomici in una serie di 201 pazienti NF1. Questi dati suggeriscono la possibilità di aggiungere l'MLPA alla dHPLC nella diagnosi molecolare dei pazienti NF1. Inoltre, per ridurre i tempi di analisi, l'MLPA dovrebbe essere utilizzata con priorità in quei

pazienti che manifestano una forma grave di NF1, possibilmente dovuta alla presenza di una delezione dell'intero gene.

## Parte 2 - Analisi di una delezione intragenica in un caso di mosaicismo germinale

### Materiali e metodi

#### Pazienti

La famiglia NF-307 (Figura 8a) presenta 2 sorelle (individui II:2 3 II:3) e la figlia di una di loro (individuo III:1), affette da neurofibromatosi di tipo 1 classica. I loro genitori ed una terza sorella, dopo un attento esame clinico, sono risultati non affetti da NF1. Per lo studio erano disponibili, oltre al prelievo di sangue periferico di tutti i familiari, un campione di liquido seminale del padre (individuo I:1), ed un campione di liquido amniotico della fetto III:1.

#### Analisi indiretta

La famiglia NF-307 è stata genotipizzata mediante una batteria di 12 marcatori microsatelliti sia intragenici che fiancheggianti il gene *NF1* (D17S1873, D17S841, D17S1863, D17S635, D17S1849, D17S1166, IVS38GT53.0, 3'NF1-1, D17S1800, 3'NF1-2, D17S798 e D17S250). La reazione di PCR è stata effettuata su un volume finale di 25µl contenenti 100ng di DNA genomico, 25pmol di ciascun primer, 4µl di dNTPs 1.25mM, 2.5µl di buffer di reazione (150mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8.0), 2.5µl di MgCl<sub>2</sub> e 1.25 unità di Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizzando il seguente ciclo d'amplificazione: 11 min di denaturazione iniziale a 94°C seguita da 30 cicli comprendenti ciascuno una denaturazione a 94°C per 30 sec, un annealing a temperatura specifica per 30 sec e una estensione a 72°C per 30 sec, seguiti da una estensione finale di 7 min a 72°C e da uno step finale di 1 min a 4°C. Gli amplificati ottenuti sono stati separati mediante un sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 o 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA) e la segregazione degli alleli è stata determinata con il programma GeneMapper Analysis Software versione 3.7 (Applied Biosystem, Foster City, CA).

#### Analisi mutazionale

Il DNA genomico è stato analizzato per la determinazione di mutazioni del gene *NF1*. La ricerca di mutazioni puntiformi è stata condotta per mezzo del protocollo dHPLC-

sequenziamento diretto, mentre la ricerca di sbilanciamenti del numero di copie mediante il protocollo MLPA (v. sezione “Materiali e metodi” della Parte 1).

### *PCR*

I 61 esoni del gene *NF1* sono stati amplificati rispettivamente in 61 frammenti di PCR di dimensioni comprese tra 134 e 584 paia di basi (Tabella 4). I primer sono stati disegnati approssimativamente 20-30 paia di basi prima delle giunzioni introne-esone con lo scopo di rilevare anche i difetti di splicing senza però identificare un eccessivo numero di polimorfismi intronici. La PCR è stata effettuata su un volume finale di 50µl contenenti 100ng di DNA genomico, 50 pmol di ciascun primer, 8µl di dNTPs 1.25 mM, 5µl di buffer di reazione (100 mM TRIS pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin) e 2.5 unità di Ampli Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'amplificazione è stata ottenuta mediante il seguente ciclo di PCR: 11 min di denaturazione iniziale a 94°C seguita da 35 cicli comprendenti ciascuno una denaturazione a 94°C per 30 sec, un annealing a temperatura specifica per 30 sec (Tabella 4) e una estensione a 72°C per 40 sec, seguiti da una estensione finale di 7 min a 72°C; l'ultimo step, necessario per la massima produzione di molecole di DNA eteroduplice, è una denaturazione finale a 95°C per 5 min seguita da un'ora a temperatura ambiente. Le reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando un termociclatore “Applied Biosystems 9700 Thermocycler” (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### *dHPLC*

L'analisi dHPLC è stata effettuata utilizzando uno strumento, WAVE DNA fragment analysis system (Transgenomic, Crewe, UK), dotato di una colonna DNASep (Transgenomic, Crewe, UK). I prodotti di PCR sono stati separati mediante un gradiente lineare di acetonitrile al 5% ad un flusso di 1.5 ml/min. Le concentrazioni iniziali del tampone B, necessarie per la corretta eluizione del campione, sono state determinate automaticamente mediante il programma Navigator (Transgenomic, Crewe, UK). Ogni analisi dura circa 3 minuti e comprende la separazione cromatografica del campione, la rigenerazione e l'equilibratura della colonna. La temperatura di analisi dHPLC è stata determinata utilizzando il programma Navigator (Transgenomic, Crewe, UK). Il programma identifica come temperatura ottimale di analisi la temperatura alla quale il 70-80% di DNA è a doppia elica ed il restante 20-30% si trova in uno stato denaturato. Una lista completa dei primer, della lunghezza dei frammenti, delle temperature di PCR, e delle temperature dHPLC utilizzate per lo screening del gene *NF1* è riportata nella Tabella 4.

### *Sequenziamento diretto*

Il DNA genomico corrispondente a ciascun profilo di eluizione anomalo è stato riamplicato mediante PCR utilizzando i corrispondenti primer, e il prodotto di PCR è stato sequenziato in entrambe le direzioni con un sequenziatore automatico ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) e comparato con la sequenza mRNA di riferimento del gene *NF1* (GeneBank num. di accesso NT010799). La prima base (in posizione +1) della metionina iniziale è stata considerata il punto di inizio del cDNA.

## Tabella 4

### Condizioni di PCR e di analisi dHPLC

Esone	Primer FW	Primer RV	Ta PCR (°C)	Ampl. bp	T dHPLC	% B
1	5'-CTCCACAGACCCCTCCTTG-3'	5'-GGACAGAGTAGGTGAGGGGA-3'	58	242	64-68	57-54
2	5'-AAACGTCAATGATTTTCATGGC-3'	5'-GGGGAATTTGCTTTCTTTCTT-3'	58	281	55.5	56.6
3	5'-TTTCACCTTTTCAGATGTGTGTG-3'	5'-CTTTGTGAAATTTGATCTTGAG-3'	58	210	55.5	54.8
4a	5'-GTTTGAAAATTTTCAATAAGAAA-3'	5'-CTCACAGCAGCTTTGACCTCC-3'	58	417	51-57	61-57
4b	5'-CAAGTGGTCTCTGCCTT-3'	5'-GTCAAAAAGTACATCATGAATG-3'	58	283	55	55
4c	5'-TTTCTAGCAGACAACATATCGA-3'	5'-ATTTGCTGTTGTTAGCATCCT-3'	62	308	54.5	57.5
5	5'-GAAGGAAGTTAGAAGTTTGTGACA-3'	5'-ATGGCTGGTAAGGATACGATTG-3'	62	172	54	51
6	5'-CATGTTTATCTTTAAAAATGTTG-3'	5'-ATGTGAAGCAGTTTATTTTACTCAA-3'	62	332	54.5-56	58.6-56.6
7	5'-ATTTGCTATAATATTAGCTACATCTGG-3'	5'-GTTGATAAGTTCATAGGACTTGCTTT-3'	62	385	53-56.5	58-54.3
8	5'-GGATTTTACTGCCATTTGTGTG-3'	5'-TATCTAACTATATTTACTGATGCTGTTA-3'	58	276	56	56
9	5'-GCTGTTCTTTTGGCTTC-3'	5'-CCAAAAGGTTATGCTAAAATTC-3'	58	183	54.5-56	52.2-49.7
9br	5'-GCTTAAAAATTTGTATACAATAAAC-3'	5'-CCTGGAGTGGTCTCATGCAT-3'	58	193	55-60	52-48
10a	5'-CTACAGTGATAAACAGAGCAT-3'	5'-ATTCCTGCTGCTTTGGTT-3'	62	292	55-58	58-55
10a2	5'-CATTTTTTGGTGTATATAGCAAG-3'	5'-GTGTATAGTTACCATATAGTCACATC-3'	62	252	54-57-60.5	57-54-50
10b	5'-ATTATCCTGAGTCTTATGTC-3'	5'-TCTCAAAATATCACACTAAGTTA-3'	58	229	54-57	56.2-51.2
10c	5'-ACCCCTTAGCAGTCACTGTC-3'	5'-CTGTGAGTAACAGGTAGATG-3'	58	307	54-59	59-54.4
11	5'-GAAAGAGCTCAATTTCTTAGC-3'	5'-CACTCCAAAGGTTTATGTTG-3'	58	307	52-55	58-55
12a	5'-TGTATTCATTATGGGAGAATGCC-3'	5'-TGGAAGAATATTGGAATGGTAAAT-3'	58	269	54-56	56-54
12b	5'-GAGGTTTTTAGGAGAGTCTC-3'	5'-ATGTGCTCTGTTTGTCTTG-3'	58	315	54-57.5	58-53.4
13	5'-CACAGTTTATGCAATGTTAG-3'	5'-CTGCCTCAAGCACATGGC-3'	62	380	57-61	59-54
14	5'-GCTCTTCTACTCCTTTTGG-3'	5'-TATGCCCTTAGCAACAGAAA-3'	58	191	60	54
15	5'-ACTGGCTGTAGCTGATTGA-3'	5'-TCAAGAGTCGCTCAGTAAAGT-3'	62	247	57	57
16	5'-CATTTTTTGTACTTTTGTATGG-3'	5'-CTCTTATTTTTCACTTTCTC-3'	58	579	55-58	63-60
17	5'-ATTTGGCTATATGCTGTGG-3'	5'-ACTGCACACAAAAGTAGGGT-3'	58	385	55.5	58.8
18	5'-AGAAGTTGTGTACGTTCTTTCT-3'	5'-GCGGTTATTTGTAGAAAGGAG-3'	58	367	53-56	57-54.4
19a	5'-TCATGTCACTTAGTTATCTGG-3'	5'-CTTCAAGTATTAGTGGGTTTA-3'	58	242	55-57.5	58-55.7
19b	5'-TGAGGGGAAGTGAAGAAGCT-3'	5'-GCAAAAAGCAAATAAAGCC-3'	58	236	53.5-57.5	56.5-52.5
20	5'-CCACCCTGGCTGATTATCG-3'	5'-GCATGTAAGAGAAGCAAAAATTA-3'	62	402	57-59	59-57
21	5'-AGCAAAAATTAAGTACGCA-3'	5'-TCAGAGCCAGAAGAAAGATG-3'	58	393	57-59	59-57
22	5'-TGCCTACTTTAGCTTCTAC-3'	5'-GGCTGATTTGCTTTTAAAGG-3'	58	331	56.5-58	58.6-57
23.1	5'-TTTGTATCATTTTGTGTGTA-3'	5'-CTTTTCACATAGAACCCTGTTTTT-3'	58	283	56-57	58.2-57.2
23.2	5'-GGCTTAAATGTCTGTATA-3'	5'-GAGATTACCATTTATTAATCTAAAGT-3'	58	270	53-59	57-51.3
23a	5'-AGCCAGAAATAGTAGACATGATTGGG-3'	5'-TCTACTAATCTGGCACAAAATAG-3'	62	446	54.5	60.3
24	5'-TTGAACTCTTTGTTTTCATGCTT-3'	5'-GATAATCTAGCTATCTTAAATCC-3'	58	266	53-58	57-52.1
25	5'-AATTTATAGAATGAGGAAAG-3'	5'-GTACTGTTTTTACATGAAGTTCCT-3'	54	335	52-54-57	58-56-53.7
26	5'-GCTTTGTCTAATGTCAAGTCA-3'	5'-GATAGTGAACACTCTCCGTTAA-3'	62	342	56-58	58-54
27a	5'-ATGGTCTGAGGCTTTTGTG-3'	5'-GCCACCAGGCCACTTGTAG-3'	62	361	57	59
27b	5'-TTGCTTTTAAAAATTTTTTCAATTTAG-3'	5'-CCAGTTGACTTAAACAGGAAT-3'	58	330	55	55
28	5'-AAAAATAAATGATTAGTGGCATCTG-3'	5'-AAATGTACCGTAAGGCTGTG-3'	62	636	55-58	62-60
29	5'-TCTGGAGCCTTTAGAAATTTATGT-3'	5'-TCAGTTGATTTGGGGTTGTTG-3'	62	460	58-60.5	60-55.5
30	5'-GAAAAAATTTGGAACATAAAGG-3'	5'-TAACAATTAATCTAAAGAAATCAAAAG-3'	58	322	51-56.5	58-54
31	5'-TTTTTCCCCGAATCTTTATG-3'	5'-CTTCAGAAAGCATGTAGACACTCAC-3'	58	425	55-57	61-59
32	5'-ATCTAGTATTTTGGCCCTCAG-3'	5'-CCTTCGTACTATAGCATATCTG-3'	58	312	53-56	58-55
33	5'-TGCTAAAACCTTGGAGTCCCATG-3'	5'-GTGCTCTAACACCAAGTTG-3'	64	448	56-59	59-53.8
34	5'-TCTTAAATCAAAATGAAACATGG-3'	5'-AAAAACACTTGCATGGACTG-3'	58	432	51.5-57	60-55
35	5'-GCATGGACTGTGTTATTGGTA-3'	5'-TCTGTGGACTTTTAAATGCA-3'	58	319	53.5	56.8
36	5'-GCTGGACCAGTGGACAGAAC-3'	5'-GACGTTTAAATTTAGGGTCAATGA-3'	62	389	53-58	57.8-54.3
37	5'-TCCTGAATTCATCCGAGATT-3'	5'-TCATTTGGGTATCAGTGTGAA-3'	58	237	54-56	55.5-53.5
38	5'-AACTCAGTGTGTTTGAAGAG-3'	5'-GAGGTTCTAGATTACTCAAATTTAG-3'	62	257	57-60	56-53
39	5'-TTGAACACAAAATTAAGTGAAGCC-3'	5'-GAAGTAAAGTTAGCCCTTATGCTTAC-3'	62	318	56	55
40	5'-ATTCACATTCACATATGCATGTTTACCTTC-3'	5'-CTTTGGTTCAAGCACTACAG-3'	62	547	55-56	61.6-61.1
41	5'-GTGCACATTTAACAGGTAAT-3'	5'-ATCTAGAGATGGCCTAGGAAG-3'	62	373	55.5	58
42	5'-CTTGGAAAGGAGCAACGATGGTTG-3'	5'-CCATGTGAGTGTAGCAAAATTTTGTG-3'	58	356	55-60	56-52.2
43	5'-AGTGTATCCCATTTATAGACACTG-3'	5'-CATTGAAAATAAGGTGGGAGA-3'	58	234	55-57.5	56-52.4
44	5'-GAAGTAACATTGAAATAGTTAGG-3'	5'-TCCAGTCTACTTTAGGAGCC-3'	58	271	58.5	55
45	5'-CATGAATAGGATACAGTCTTCTAC-3'	5'-GTTAAATGCTTACCAGTAAATGTG-3'	62	269	57	56
46	5'-CTCATCTCCCTTTAATTTGGC-3'	5'-TCTGGAGAAAGATGGTTGATG-3'	58	295	54-56.5	57-55.1
47	5'-CTGTTACAATTAAGATACCTTG-3'	5'-GTATGCTGCTTTAAGAACACACA-3'	62	185	55.5	51.4
48	5'-AAGGAAGAAAATGATAAATTAAGTCC-3'	5'-GTTTATAGCAAAATTTGCTCTT-3'	58	423	53-58	61-56.9
48a	5'-ATTCAATAATTAACCAGATTCC-3'	5'-CTTTAGGAACTTGTAAGGCCACC-3'	58	327	54	58
49	5'-AGAATGTGTCCCGTTGTAA-3'	5'-TAATGAACCCATCCGGTTG-3'	58	369	58.5	58.4

### *Analisi dell'mRNA*

Al fine di confermare la delezione che si estende dall'introne 27b all'esone 30 del gene *NF1*, l'RNA dei pazienti II:2 e II:3 è stato isolato dai linfociti per mezzo di un protocollo guanidina-fenolo-cloroformio ed utilizzato per una RT-PCR. Il cDNA è stato sintetizzato con random primer e Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) a partire da 2µg di RNA totale. Per valutare la presenza della delezione il cDNA è stato amplificato con i seguenti primer: FW: 5'-AGATACACACTGGTCCAGCC-3' (nell'esone 27b) and Rv: 5'-GGCATCATCATTATGCTTGC-3' (nell'esone 31). Tutti i trascritti sono stati analizzati mediante sequenziamento.

### PCR real time: analisi TaqMan

Il DNA estratto da sangue dei membri della famiglia NF-307 ed il DNA dal liquido seminale del paziente I:1, è stato analizzato mediante PCR quantitativa real time. L'amplificazione è stata effettuata mediante chimica TaqMan utilizzando un apparecchio ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 2 sonde fluorescenti che mappano rispettivamente nell'esone 25 e 28 del gene *NF1*. Per considerare le possibili variazioni legate alla quantità iniziale di DNA e alla presenza di inibitori nella reazione di PCR, per ciascun paziente è stato analizzato in contemporanea il gene di riferimento *RNasiP* in un altro tubo di PCR. Ogni saggio includeva un controllo negativo senza template, un DNA di controllo non-deleto (CTRL-1) come calibratore, un DNA da linfociti di un controllo non-deleto e un DNA da liquido seminale di un controllo non-deleto (come controlli negativi), e il DNA-test. Inoltre sono stati inclusi nell'analisi 5 standard di mosaicismo, preparati diluendo diverse quantità (10%, 17%, 21%, 25% e 29%) del DNA di una figlia portatrice della mutazione in eterozigosi, con un DNA di un controllo non-mutato. La miscela della reazione di amplificazione (25µl) conteneva 12.5µl di TaqMan universal PCR master mix, no AmpErase, 1µl Assays-by-Design (Applied Biosystems, Foster City, CA) probe and primer mix, e 30ng di DNA genomico. La reazione di PCR è stata effettuata alle seguenti condizioni: 10 minuti a 95°C, 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 min. I risultati relativi ad ogni campione sono stati espressi in cambiamenti di N-volte nelle copie dell'esone target, normalizzati al numero di copie relative del gene *RNasiP* nel campione di controllo CTRL-1, secondo il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Nei casi in cui il numero di copie esoniche era compreso tra 0.7 e 1.3 è stato ipotizzato che il campione fosse portatore di due copie dell'esone target (N-volte = 1). Casi con un N-fold <0.7 sono stati

considerati deleti. Tutti i risultati sono stati confermati in 3 analisi di PCR real time indipendenti.

## Risultati

### *Dati clinici*

La tabella 5 riporta la descrizione delle caratteristiche cliniche degli individui della famiglia NF-397 affetti da NF1.

Tabella 5. Caratteristiche cliniche degli individui affetti della famiglia NF-307

<b>Segno clinico</b>	<b>II:1</b>	<b>II:2</b>	<b>III:1</b>
Età	39 aa	37 aa	3 aa
Sesso	F	F	F
Statura	153 cm	153 cm	n.v.
Macchie caffelatte	+	+	+
Neurofibromi cutanei	+	+	+
Neurofibromi sottocutanei	+	+	-
Neurofibromi plessiformi	+	+	-
Lentiginosi ascellare	+	+	+
Lentiginosi inguinale	+	+	+
Noduli di Lisch	+	+	-
Glioma ottico	-	-	-
Displasia della tibia	-	-	-
Displasia dello sfenoide	-	-	-
Pseudoartrosi	-	-	-
Ritardo mentale	-	-	-
Disturbi dell'apprendimento	-	-	-
Scoliosi	+	+	-
Macrocefalia	n.v.	n.v.	+
Difetti cardiaci	-	-	-
Ipertelorismo	-	-	-
Ptosi	+	+	-
Anomalie toraciche	-	-	-
MRI	n.v.	-	-
Altri tumori	-	-	-
Altre caratteristiche	Angioma	Malformazioni osso temporale	aplasia cutis congenita

aa = anni; + = presente; - = assente; F = femmina; n.v. = non valutato

Il probando (individuo II:3) è la terza figlia di genitori non-consanguinei. Alla prima valutazione clinica si presentava come una donna di 34 anni con macchie caffelatte, neurofibromi cutanei, sottocutanei e plessiformi, lentiginosi ascellare e inguinale e noduli di Lisch. Inoltre aveva scoliosi lieve. L'esame di NMR non ha rilevato altre caratteristiche associate alla NF1. Mostrava una displasia dell'osso temporale (lato orbitale).

La paziente II:2 si presentava come una donna di 36 anni con più di 15 macchie caffelatte, oltre a neurofibromi cutanei e sottocutanei. Mostrava inoltre 2 neurofibromi plessiformi, rispettivamente sul labbro inferiore e sul pollice destro. La lentiginosi ascellare e inguinale era presente, come anche i noduli di Lisch. Presentava una ptosi lieve, angiomi multipli e lieve scoliosi.

I genitori (individui I:1 e I:2) e la sorella (individuo II:1) dei pazienti II:2 e II:3 sono stati esaminati clinicamente e non mostrano alcun segno della NF1.

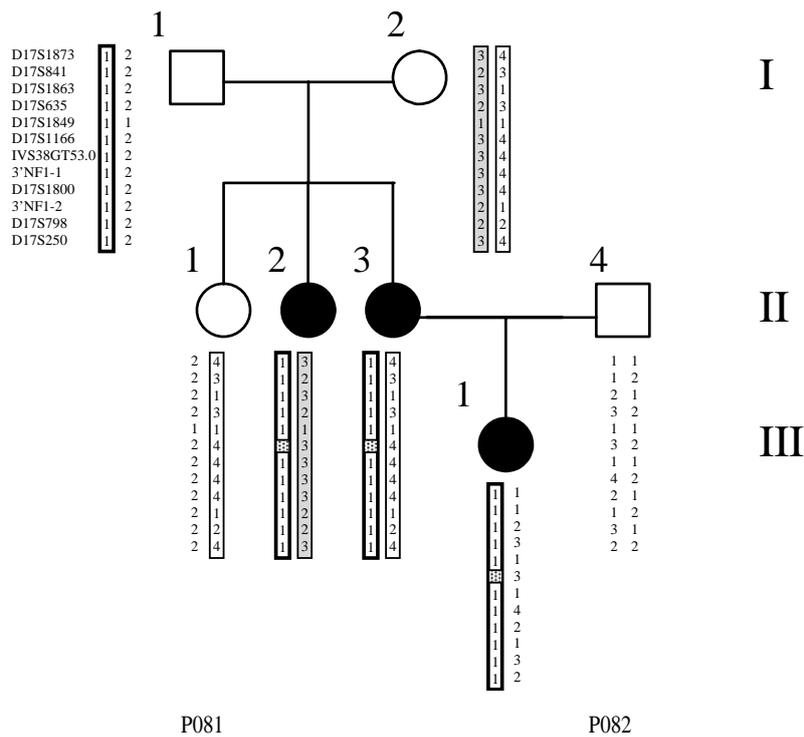
Al primo esame clinico, la probanda (II:3) era in gravidanza (5.6 settimane di amenorrea) e richiedeva la diagnosi prenatale. Dal momento che per questa famiglia non erano disponibili dati molecolari riguardo all'analisi del gene *NF1*, e considerando la complessità dell'analisi molecolare diretta, è stata offerta un'analisi indiretta di linkage.

La paziente III:1 è nata alla 38° settimana di gestazione, con un peso di 3350g. Alla nascita non presentava alcun segno clinico della NF1. È stata ri-esaminata all'età di 2.4 anni, quando presentava 6 macchie, lentiginosi inguinale e ascellare, macrocefalia e aplasia cutis congenita.

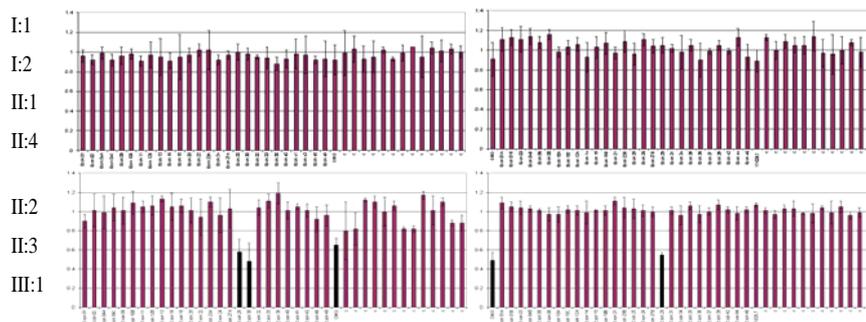
#### *Analisi molecolari*

L'analisi dei marcatori microsatelliti del DNA da linfociti dei componenti della famiglia NF-307 ha mostrato che le due sorelle (II:2 e II:3) affette ed il feto (III:1), condividono lo stesso allele paterno e due diversi alleli materni (Figura 8a). La sorella non affetta ha invece ereditato dal padre l'altro allele. Le due sorelle NF1 non hanno ricevuto l'allele paterno del marcatore D17S1166, che mappa nell'introne 27b del gene *NF1* (Figura 8a), un dato che suggerisce la presenza di una delezione intragenica. L'analisi diretta di *NF1* ha infatti rivelato nelle due sorelle affette e nella figlia di una di loro, la presenza di una delezione multiesonica che comprende l'introne 27b e gli esoni 28, 29 e 30 (Figura 8b). Per confermare questo risultato, l'mRNA dai linfociti è stato amplificato mediante RT-PCR con dei primer dall'esone 27b all'esone 31. La successiva analisi di sequenza ha confermato la perdita degli esoni 28-30 nelle due sorelle affette (Figura 8c). La stessa analisi non ha

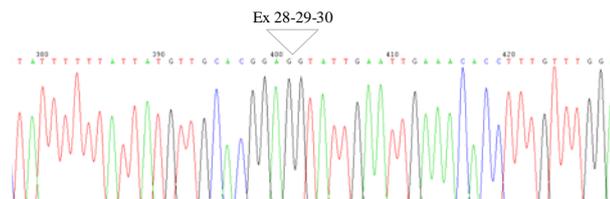
rivelato la presenza della mutazione nei genitori asintomatici e nella sorella non affetta. Per determinare e quantificare la segregazione dell'allele paterno è stato impiegato un saggio quantitativo di real time PCR, utilizzando due sonde mappanti rispettivamente all'interno (esone 28) ed all'esterno (esone 25) della delezione (Figura 9). Il DNA da linfociti degli individui I:1, I:2, II:1 e II:4 ha mostrato un pattern di amplificazione consistente con due copie degli esoni 25 e 28. A causa della delezione intragenica invece, il pattern di amplificazione dei pazienti II:2, II:3 e III:1 ha mostrato la presenza di due copie dell'esone 25 e di una copia dell'esone 28. Il DNA da liquido seminale dell'individuo I:1 ha rivelato un pattern di amplificazione dell'esone 28 corrispondente ad un valore intermedio tra una e due copie, suggerendo la coesistenza di due linee cellulari contenenti rispettivamente una copia selvatica del gene *NF1* ed una mutata. Il valore dell'N-fold del DNA da liquido seminale dell'individuo I:1 ( $N\text{-fold}=0,8$ ) era infatti compreso tra i valori degli standard di mosaicismo 10% e 17% (rispettivamente 0,83 e 0,75), suggerendo che la mutazione era presente in circa il 15% degli spermatozoi (Figura 9).



a



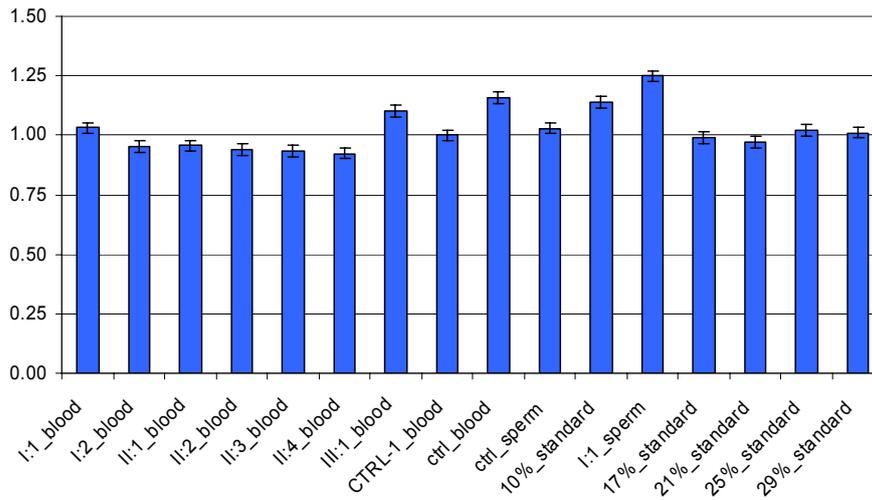
b



c

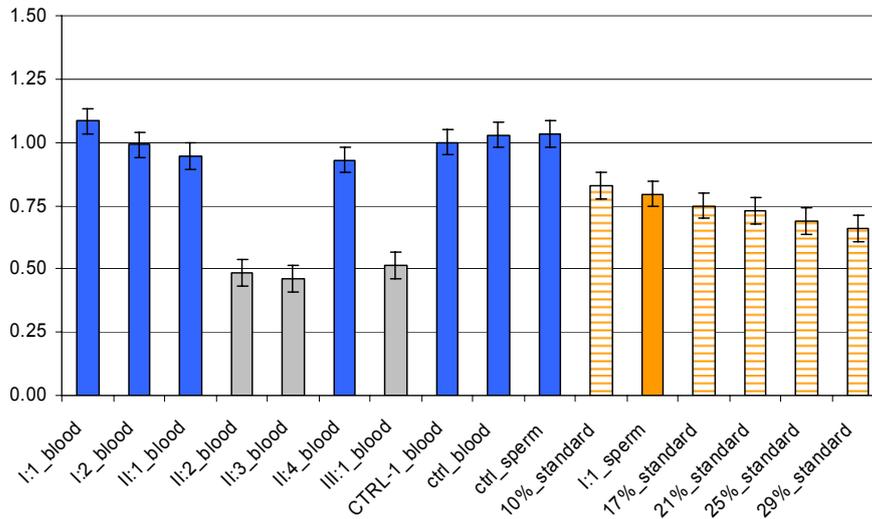
Figura 8. Studio del cromosoma 17 e del gene NF1. a. Segregazione dei marcatori microsatelliti nella famiglia NF-307. L'assenza dell'allele paterno per il marcatore D17S1166 nei pazienti II:2, II:3 e III:1 è indicata da un'area puntinata nell'aplotipo del cromosoma 17. b. Risultati del MLPA P081-82. Sequenze presenti in due copie nel genoma sono indicate dagli istogrammi viola. Gli istogrammi neri rivelano la presenza di una delezione. c. Analisi dell'mRNA da linfociti degli individui II:2 e II:3, che rivela la presenza di una delezione comprendente gli esoni 28-30 del gene NF1.

NF1 Ex25



a

NF1 Ex28



b

Figura 9. Risultati della real time PCR per gli esoni 25 (a) e 28 (b) del gene NF1. Gli assi x e y rappresentano rispettivamente i campioni di DNA analizzati, ed i valori di N-fold. Gli istogrammi blu corrispondono a due copie dell'esone test di NF1, quelli grigi ad una copia. I valori di N-fold dei DNA mosaico sono mostrati in arancio (liquido seminale dell'individuo I:1) e in arancio-rigato (mosaici standard).

## Discussione

In questo studio abbiamo descritto l'analisi clinica e molecolare di una famiglia in cui 2/3 sorelle nate da genitori non affetti, e la figlia di una di loro, sono affette da NF1. Per ricercare la segregazione dell'allele mutato la famiglia è stata inizialmente caratterizzata mediante un'analisi di linkage. Il risultato ha mostrato che le 2 sorelle affette hanno ereditato lo stesso cromosoma 17 paterno, e due diversi cromosomi 17 materni. Lo stesso allele a rischio è stato inoltre trasmesso al feto/soggetto III:1. L'analisi molecolare diretta ha rivelato che la neurofibromatosi 1 è dovuta ad una delezione multiesonica che si estende dall'introne 27b all'esone 30 del gene *NF1*. Quindi sulla base dei risultati dell'analisi di linkage, abbiamo dedotto che la mutazione fosse stata ereditata dal padre clinicamente non affetto. Dal momento che questa alterazione non era presente nei linfociti del padre, abbiamo ipotizzato che era insorta nella sua linea germinale. A conferma di questa ipotesi, la PCR real time sugli spermatozoi ha rivelato che circa il 15% delle cellule germinale dell'individuo I:1 erano portatrici della stessa delezione segregante nelle figlie affette. La ricorrenza della malattia in 2/3 concepimenti sembra essere pertanto dovuta al caso. In particolare in presenza di un mosaicismo del 15%, la probabilità (P) di generare 2 figlie affette in 3 gravidanze indipendenti è 5,73%. Questo calcolo è basato sulla formula di distribuzione binomiale  $P=3p^2q$ , dove  $p$ =probabilità a priori=15%, e  $q=(1-p)$ =probabilità complementare=85%. Considerando che l'analisi mutazionale sugli spermatozoi è stata condotta circa 30 anni dopo il concepimento della figlia affette più giovane, non possiamo escludere che la percentuale di cellule mutate sia variata nel tempo.

Ad oggi, un mosaicismo confinato alla linea germinale è stato precedentemente studiato mediante analisi molecolare solo in 2 pazienti NF1 nati da un padre non affetto che aveva trasmesso un delezione multiesonica comprendente 12kb del gene *NF1* ai due figli<sup>104, 105</sup>. In questo caso, la presenza della delezione era stata confermata nel 10% degli spermatozoi paterni<sup>105</sup>. Questa famiglia rappresenta pertanto un altro caso di mosaicismo presente in una bassa percentuale nel tessuto affetto. Risultati comparabili sono stati ottenuti nella sindrome di Rett, in cui in un paziente con due figlie affette è stata trovata una mutazione del gene *MECP2* presente in mosaico in una piccola percentuale di cellule germinali<sup>106</sup>.

Il gene *NF1* presenta uno dei più alti tassi di mutazione nell'uomo ( $\sim 1 \times 10^4$ /gameti/generazione)<sup>60, 61</sup>, e circa il 50% dei pazienti NF1 non ha una storia

familiare positiva per la malattia. Possono essere considerati i seguenti meccanismi alla base dell'origine delle mutazioni *de novo*: mutazioni post-zigotiche, e mosaicismo germinale dei genitori. L'identificazione di mutazione del gene *NF1* in individui affetti suggerisce un'accurata valutazione clinica dei genitori. Seguendo l'ipotesi di una mutazione post-zigotica, se i genitori risultano non affetti il rischio di ricorrenza può essere considerato trascurabile. Nella nostra esperienza sono infatti molto rare famiglie con genitori fenotipicamente non affetti e ricorrenza della malattia. I nostri risultati suggeriscono comunque che la consulenza genetica dovrebbe prendere in considerazione il mosaicismo germinale come un meccanismo possibile, anche se raro.

Nel tasso mutazionale della *NF1* esiste un bias legato al sesso: circa il 90% delle nuove mutazioni sporadiche sono di origine paterna<sup>62, 63, 65, 105</sup>. Riguardo gli eventi post-zigotici, l'origine paterna di molte delle mutazioni puntiformi *de novo*, potrebbe essere dovuto a differenze dello stato genere-specifico di metilazione del DNA, che può influenzare l'insorgenza di mutazioni nelle isole CpG<sup>65</sup>. Nel caso invece di eventi germinali parentali, si ipotizza che l'origine di nuove mutazioni possa variare a seconda del tipo di alterazione<sup>65</sup>. Per quanto riguarda le mutazioni puntiformi, è stato riportato un ridotto stato di metilazione del DNA negli oociti, rendendo le mutazioni ai siti CpG più comuni negli spermatozoi<sup>107, 108</sup>. Riguardo invece le delezioni di tutto il gene, le più ricorrenti (delezioni di tipo 1), con punti di rottura nelle low copy repeats fiancheggianti il gene *NF1* (*NF1*-LCR), sono causate da ricombinazione non allelica non omologa (non allelic homologous recombination, NAHR) e avvengono durante la meiosi<sup>99</sup>. Considerando che la mappa genomica femminile è circa 1,5 volte più lunga di quella maschile<sup>109</sup>, la probabilità di una ricombinazione meiotica è più alta nelle donne che negli uomini. Può essere quindi dedotto che negli individui *NF1* sporadici, le mutazioni puntiformi fanno supporre una ereditarietà paterna, mentre le delezioni di tipo 1 una ereditarietà materna.

Ad oggi l'origine parentale delle alterazioni multiesoniche del gene *NF1* non è stata completamente investigata. Comunque sia la delezione multiesonica descritta in questo studio, sia quella riportata da Lazaro et al. 1995<sup>104</sup>, sono di derivazione paterna. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire le basi degli eventi multiesonici nella *NF1*.

In questo studio abbiamo usato un sensibile metodo quantitativo (PCR real time) capace di individuare nei gameti maschili dei mosaicismi a bassa frequenza. Grazie a questo metodo in futuro, potrà essere identificato un maggior numero di mosaicismi germinali nella *NF1*.

Sul piano sperimentale, il protocollo qui descritto permetterà di definire la percentuale di cellule portatrici della mutazione, fornendo uno strumento per una iniziale predizione del rischio di ricorrenza nelle famiglie in cui segrega un mosaicismo.

Ulteriori studi sulla frequenza, grado e origine parentale del mosaicismo nei pazienti NF1 sporadici, permetterà di chiarire il ruolo della neurofibromina sia nelle singole cellule, che nell'organismo in fase di sviluppo.

## Parte 3 – Sviluppo di un minigene assay per l'analisi delle mutazioni di splicing

### Materiali e metodi

#### Mutazioni esaminate

Le varianti nucleotidiche studiate mediante analisi “minigene” includono una mutazione nonsense 910C>T (R304X), un cambio silente 1005C>T (N335N), e una mutazione silente e una mutazione missenso identificate in cis nello stesso paziente [945G>A/946C>A (Q315Q/L316M)], e precedentemente riportate <sup>95</sup>. La N335N è stata identificata in una famiglia di due generazioni (NF-01), portatrice anche di un'altra mutazione nel gene *NF1*, una delezione di una singola base (476delC) nell'esone 4a (Figura 10). La mutazione silente N335N è stata identificata nel probando (II-2) e suo figlio (III-1), entrambi affetti da *NF1*, e dal padre del probando (I-1) che presentava come unico segno clinico della neurofibromatosi tre neurofibromi cutanei. La mutazione 476delC è stata identificata nel probando e suo figlio, ma non nel padre del probando. Sia la N335N che la 476delC non sono state identificate in 200 soggetti di controllo. Un'analisi microsatellite effettuata utilizzando 10 marcatori strettamente associati al locus *NF1* (D17S1783, D17S841, D17S1863, D17S635, D17S1166, IVS-38, 3'-NF1-1, D17S1800, 3'-NF1-2 e D17S798) ha dimostrato che la N335N e la 476delC cosegregano sullo stesso cromosoma 17. I particolari dell'analisi microsatellite della famiglia NF-01 sono mostrati in Figura 10, mentre la Figura 11 è una schematizzazione di tutto il protocollo messo a punto.

#### Analisi *in silico* delle mutazioni

L'esone 7 del gene *NF1*, inclusi i cambi nucleotidici Q315Q, L316M, R304X e N335N, è stata analizzata utilizzando il programma disponibile in rete “ESEfinder web interface (Release 1.1)”, che permette la ricerca di putativi siti ESE utilizzando delle matrici corrispondenti ai motivi di quattro diverse proteine ricche in residui serina/arginina: SF2/ASF, SC35, SRp40, e SRp55. Il punteggio di una determinata sequenza è stato considerato potenzialmente significativo se maggiore del valore di soglia, definito dal programma alla pagina iniziale, e corrispondente ai seguenti valori: 1.956 per SF2/ASF, 2.383 per SC35, 2.670 per SRp40, 2.676 per la SRp55.

### Costruzione e espressione del vettore minigene

Lo studio di espressione in vitro è stato effettuato utilizzando il vettore pSPL3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA): la sigla “SPL” è l’abbreviazione di “splicing”. Questo vettore contiene: un’origine di replicazione e un marcatore (Amp<sup>R</sup>) per la crescita in E.coli, l’origine di replicazione e il promotore di SV40 per la crescita e la trascrizione nelle cellule eucariotiche Cos-1, ed un sito di clonaggio multiplo per gli enzimi di restrizione EcoRI, SstI, XhoI, NotI, XmaIII, PstI, BamHI e EcoRV (Figura 11). Questo costrutto contiene inoltre un segmento di DNA del gene *tat* di HIV-1: questo frammento di DNA presenta un sito accettore ed un sito donatore di splicing (compatibili con i siti di splicing di qualsiasi altro gene), e una parte delle sequenze esoniche fiancheggianti. Questo saggio prevede l’amplificazione mediante PCR del DNA genomico di un individuo non affetto, utilizzando dei primer che presentano all’estremità 3’ una codina con un sito di restrizione compatibile con uno degli enzimi contenuti nel sito multiplo di clonaggio del vettore (per l’enzima XhoI sul primer forward, e per l’enzima BamHI sul primer reverse) (Figura 26). Dopo digestione con XhoI e BamHI, i prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pSPL3 ed è stato isolato il DNA plasmidico (QIAprep Spin Midiprep Kit-Qiagen, Hilden, Germany); successivamente è stata effettuata una reazione di sequenza per escludere la presenza di mutazioni nella sequenza clonata. La mutazione da testare è stata introdotta mediante mutagenesi in vitro (QuickChange Site-Direct Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA); nella Tabella 6 sono descritti i primer utilizzati per la reazione di mutagenesi. L’identità della mutazione inserita è stata confermata mediante una ulteriore reazione di sequenza. Successivamente il costrutto selvatico e quelli mutati sono stati trasfettati in cellule Cos-1 (cellule di rene di scimmia verde africana) (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Le linee cellulari sono state fatte crescere in D-MEM a cui sono stati aggiunti: siero bovino fetale (FBS) al 10%, glutamina, aminoacidi non essenziali, penicillina e streptomina. La trasfezione è stata eseguita tramite elettroporazione (Elettroporatore Bio-Rad Gene Pulser II) impostando i seguenti parametri: 250µF di capacitance e bassa resistenza. Dopo la trasfezione l’RNA totale è stato isolato dalle cellule per mezzo di un protocollo guanidina isotiocianato; l’RNA è stato successivamente retrotrascritto in cDNA secondo il seguente protocollo: 5 µg di RNA, 1 µl di dNTPs 10 mM, 0.5 µg di oligo(dT), 2 µl di RT-Buffer 10X, 4 µl di MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl di DTT 0.1 M, 1 µl di RNaseOUT Recombinant RNase Inibitor e 50 unità di enzima SuperScript II RT, in un volume finale di 20 µl; la reazione è stata effettuata in un termociclatore Applied Biosystem 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster city, CA). La presenza di prodotti di splicing

aberranti è stata verificata mediante una PCR con i seguenti primer vettore-specifici: SA2 (5'-ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3') e SD6 (5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC-3'). La PCR è stata effettuata secondo il seguente protocollo: in un volume finale di 50 µl sono stati aggiunti 1 µg di cDNA, 5 µl di Buffer 3 (Roche, Mannheim, Germany), 2.5µl di dNTPs 10mM, 50pmol di ciascun primer e 3 unità di enzima Long Template PCR system (Roche, Mannheim, Germany). La reazione è stata effettuata in un termociclatore Applied Biosystems 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) mediante il seguente ciclo di PCR: una denaturazione iniziale di 2 min a 94°C, seguita da 40 cicli comprendenti ciascuno una denaturazione a 94°C per 30 sec, un annealing a 58°C per 30 sec ed una estensione a 68°C per un min, seguiti poi da una estensione finale di 10 min a 68°C. Gli amplificati sono stati analizzati su gel d'agarosio (1.8%) e sequenziati come descritto in precedenza.

Tabella 6. Sequenza dei primer utilizzati per la mutagenesi in vitro.

Mutazione	Primer	Sequenza
R304X	Primer plus	5'-AAGTTATTTCTGGACAGTCTATGAAAAGCTCTTGCTGGCCATGG-3'
	Primer minus	5'-CCATGGCCAGCAAGAGCTTTTCATAGACTGTCCAGAAATAACTT-3'
Q315Q	Primer plus	5'-GGCCATGGAGGAAGTAGGCCAACTGACAGAAAGTGCTGCAATTG-3'
	Primer minus	5'-CAATTGCAGCACTTTCTGTGCTGCTACTTCCTCCATGGCC-3'
L316M	Primer plus	5'-GGCCATGGAGGAAGTAGGCCAGATGACAGAAAGTGCTGCAATTG-3'
	Primer minus	5'-CAATTGCAGCACTTTCTGTGCTGCTACTTCCTCCATGGCC-3'
Q315Q+L316M	Primer plus	5'-GGCCATGGAGGAAGTAGGCCAAATGACAGAAAGTGCTGCAATTG-3'
	Primer minus	5'-CAATTGCAGCACTTTCTGTGCTGCTACTTCCTCCATGGCC-3'
N335N	Primer plus	5'-GTAAAGCAAGTACTTACATCAACTGGGAAGATAACTCTGTC-3'
	Primer minus	5'-GACAGAGTTATCTTCCCAGTTGATGTAAGTACTTGCTTTAC-3'

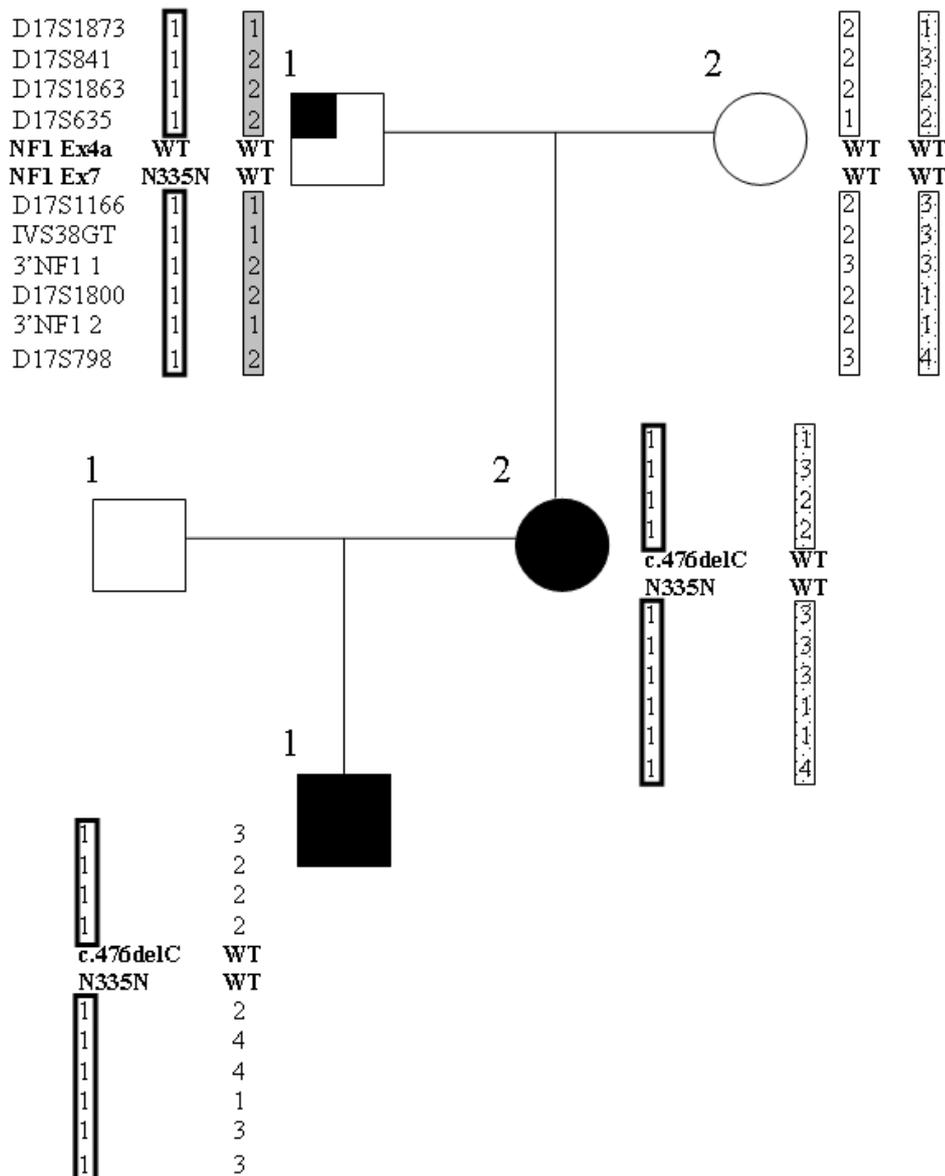
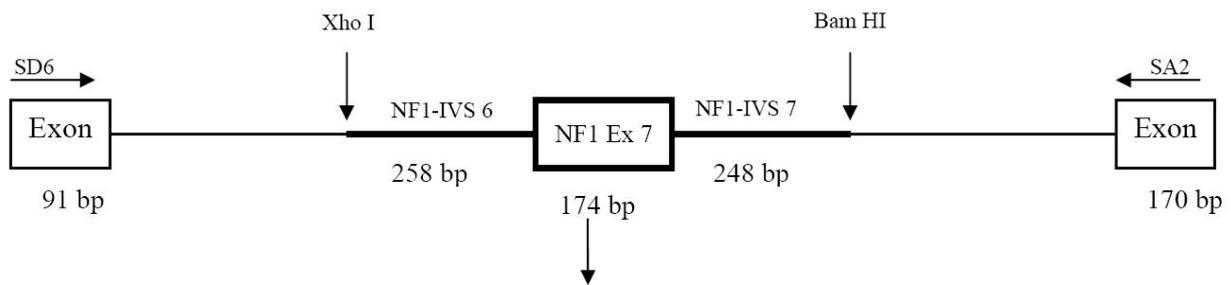


Figura 10. Famiglia NF-01; i componenti familiari sono indicati da un numero corrispondente alla generazione e da un numero personale (ad esempio, I:1 e III:1). I soggetti affetti sono rappresentati da un simbolo nero, quelli non affetti da un simbolo bianco. Il paziente con neurofibromi isolati è indicato da un simbolo parzialmente nero. Sono rappresentati gli aplotipi del cromosoma 17. Gli individui II:2 e III:1 portano la mutazione silente N335N e la delezione 476delC, mentre il soggetto I:1 porta solo la variante N335N.



```

Ex7 WT
AAG TTA TTT CTG GAC AGT CTA CGA AAA GCT CTT GCT GGC CAT GGA GGA AGT AGG CAG CTG ACA GAA AGT GCT GCA ATT GCC TGT GTC
AAA CTG TGT AAA GCA AGT ACT TAC ATC AAT TGG GAA GAT AAC TCT GTC ATT TTC CTA CTT GTT CAG TCC ATG GTG GTT GAT CTT AAG
Ex 7 R304X
AAG TTA TTT CTG GAC AGT CTA GGA AAA GCT CTT GCT GGC CAT GGA GGA AGT AGG CAG CTG ACA GAA AGT GCT GCA ATT GCC TGT GTC
AAA CTG TGT AAA GCA AGT ACT TAC ATC AAT TGG GAA GAT AAC TCT GTC ATT TTC CTA CTT GTT CAG TCC ATG GTG GTT GAT CTT AAG
Ex 7 Q315Q
AAG TTA TTT CTG GAC AGT CTA CGA AAA GCT CTT GCT GGC CAT GGA GGA AGT AGG CAG CTG ACA GAA AGT GCT GCA ATT GCC TGT GTC
AAA CTG TGT AAA GCA AGT ACT TAC ATC AAT TGG GAA GAT AAC TCT GTC ATT TTC CTA CTT GTT CAG TCC ATG GTG GTT GAT CTT AAG
Ex 7 L316M
AAG TTA TTT CTG GAC AGT CTA CGA AAA GCT CTT GCT GGC CAT GGA GGA AGT AGG CAG ATG ACA GAA AGT GCT GCA ATT GCC TGT GTC
AAA CTG TGT AAA GCA AGT ACT TAC ATC AAT TGG GAA GAT AAC TCT GTC ATT TTC CTA CTT GTT CAG TCC ATG GTG GTT GAT CTT AAG
Ex 7 Q315Q + Ex 7 L316M
AAG TTA TTT CTG GAC AGT CTA CGA AAA GCT CTT GCT GGC CAT GGA GGA AGT AGG CAG ATG ACA GAA AGT GCT GCA ATT GCC TGT GTC
AAA CTG TGT AAA GCA AGT ACT TAC ATC AAT TGG GAA GAT AAC TCT GTC ATT TTC CTA CTT GTT CAG TCC ATG GTG GTT GAT CTT AAG
Ex 7 N335N
AAG TTA TTT CTG GAC AGT CTA CGA AAA GCT CTT GCT GGC CAT GGA GGA AGT AGG CAG CTG ACA GAA AGT GCT GCA ATT GCC TGT GTC
AAA CTG TGT AAA GCA AGT ACT TAC ATC AAG TGG GAA GAT AAC TCT GTC ATT TTC CTA CTT GTT CAG TCC ATG GTG GTT GAT CTT AAG
  
```

Figura 11. Rappresentazione del costrutto minigene pSPL3-NF1-7. La sequenza genomica dell'esone 7 del gene NF1 è stata clonata nel plasmide pSPL3 insieme alle sue sequenze introniche fiancheggianti (258bp al 5' e 248bp al 3'). Le sequenze evidenziate rappresentano i cambi nucleotidici introdotti mediante mutagenesi in vitro per ottenere i costrutti mutanti.

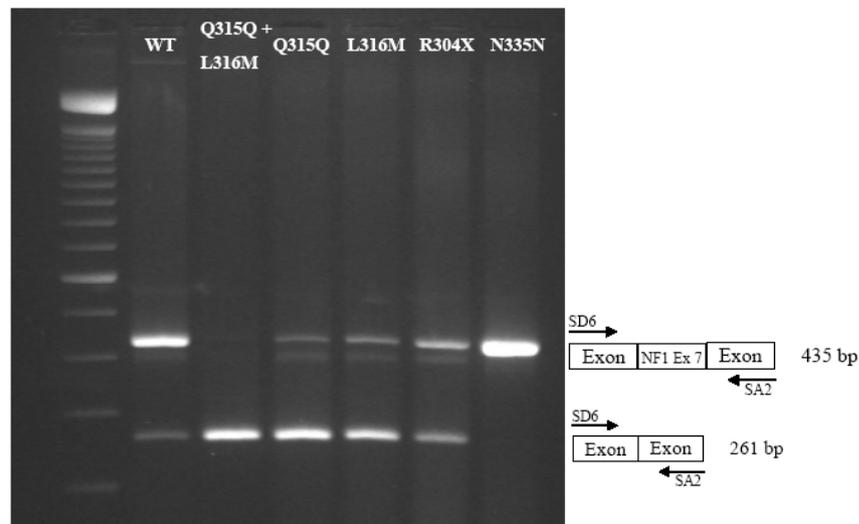
## Risultati

Mediante analisi bioinformatica e analisi funzionale abbiamo valutato l'effetto sul processo di splicing di quattro varianti nucleotidiche identificate nell'esone 7 di pazienti con diagnosi clinica di NF1. Queste includevano un cambio silente (N335N), una mutazione nonsense (R304X), e due mutazioni missenso (Q315Q e L316M). Ad eccezione della R304X, tutte le varianti studiate introducevano o abolivano un sito ESE secondo il programma ESEfinder. I risultati dell'analisi ESEfinder sono riportati in Tabella 7. La mutazione R304X non aggiunge o abolisce nessuna sequenza ESE, mentre i cambi Q315Q e L316M aboliscono rispettivamente un motivo ESE SF2/ASF e un motivo ESE SC35. Il cambio N335N, introduce un motivo per la proteina SRp40. Per confermare questi risultati abbiamo effettuato una serie di esperimenti in vitro che testavano la differente capacità di splicing delle sequenze mutanti rispetto alle sequenze selvatiche. Le Figure 12a e 12b mostrano i prodotti di PCR ottenuti dai costrutti minigene, prodotti dai primer SD6 e SA2 dopo la trasfezione. Ciascuna banda è stata quantificata utilizzando il programma Quantity One (Bio-Rad, Richmond, CA). Il costrutto selvatico mostra tre prodotti di splicing in diverse proporzioni: un frammento di 435bp (86%), un'altro frammento di 403bp (2%), e un terzo di 261bp (11%). Dopo l'estrazione da gel, ciascun frammento di PCR è stato caratterizzato mediante sequenziamento diretto. Il frammento di PCR di 435bp include l'esone 7 e le sue sequenze fiancheggianti, il prodotto di 403bp corrisponde all'esone 7, ma manca di 32 nucleotidi, e la terza banda di 261bp corrisponde ad un trascritto mancante l'intera sequenza dell'esone 7 (NF1 $\Delta$ E7). Il costrutto contenente le sostituzioni Q315Q e L316M esprimeva solo un frammento di PCR corrispondente al trascritto NF1 $\Delta$ E7. I costrutti contenenti le mutazioni L316M, Q315Q e R304X mostravano le stesse tre bande del prodotto di PCR selvatico, ma in diverse proporzioni, con il frammento NF1 $\Delta$ E7 fortemente rappresentato, e rispettivamente corrispondente al 75%, 86% e 44% del totale dell'RNA messaggero. I costrutti contenenti le mutazioni L316M, Q315Q e R304X esprimevano il trascritto di 403bp dell'esone 7, mentre il costrutto N335N mostrava solo il prodotto di PCR corrispondente all'esone 7.

Tabella 7. Risultati ottenuti con il programma ESE Finder per le mutazioni dell'esone 7.

Mutazione	SRp40(1)	SRp40(2)	SC35	SF2/ASF
	Soglia: 2.670	Soglia: 2.670	Soglia: 2.383	Soglia: 1.956
Ex7 WT	3,009308	-	2,855838	2,825583
Ex7 910C>T (R304X)	3,366003	↑ -	2,855838	2,825583
Ex7 945G>A (Q315Q)	3,009308	-	3,281102	↑ Below Thr ↓
Ex7 946C>A (L316M)	3,009308	-	Below Thr	↓ 3,819131 ↑
Ex7 Q315Q+L316M	3,009308	-	Below Thr	↓ Below Thr ↓
Ex7 1005T>C (N335N)	3,009308	3,455269	+ 2,855838	2,825583

SRp40, SC35 and SF2/ASF sono quattro proteine SR umane associate a sequenze ESE. ↑ indica un valore superiore al valore soglia. ↓ indica un valore inferiore rispetto al valore soglia. + indica l'acquisto di un sito di legame per una proteina SR.



	WT	Q315Q + L316M	Q315Q	L316M	R304X	N335N
435bp	86	0	8	20	49	100
403bp	2	0	6	5	7	0
261bp	11	100	86	75	44	0

Figura 12. Prodotti di PCR (primer SD6 e SA2) ottenuti dopo trasfezione. La banda in alto indica un prodotto di 435 bp (include l'esone 7). La banda in basso indica un prodotto di 261 bp (manca dell'esone 7). La banda centrale corrisponde a un prodotto alternativo di 403 bp. In basso è mostrata l'analisi quantitativa effettuata con il programma Quantity One (Bio-Rad, Richmond, CA). L'intensità di ciascuna banda, che rappresenta l'ammontare del trascritto, è espressa come percentuale.

## Discussione

Ricostruendo all'interno di un "minigene" artificiale una serie di mutazioni del gene *NF1* apparentemente ininfluenti sul processo di splicing, come ad esempio mutazioni nonsense, missenso o varianti silenti, abbiamo dimostrato che alcune di queste mutazioni alterano lo splicing modificando delle sequenze regolatorie esoniche, come gli "exonic splicing enhancer (ESE)" o gli "exonic splicing silencer (ESS)". In particolare, abbiamo analizzato, sia in silico che a livello funzionale, l'effetto sullo splicing di quattro diverse varianti nucleotidiche identificate nell'esone 7 del gene *NF1*. Questo gruppo di mutazioni includeva una mutazione nonsense ricorrente [910C>T (R304X)], un cambio silente [1005C>T (N335N)], e una mutazione silente e una mutazione missenso [946G>A/946C>A (Q315Q/L316M)] identificate in cis sullo stesso paziente. L'analisi in silico ha evidenziato che la presenza delle mutazioni Q315Q e L316M provoca rispettivamente la perdita di due siti ESE, uno per una proteina SF2/ASF e uno per una proteina SC35, suggerendo un ruolo per questi due nucleotidi nello splicing. Mediante un saggio funzionale basato sull'utilizzo di un minigene eterologo, abbiamo dimostrato che la presenza delle mutazioni Q315Q e L316M diminuisce l'efficienza di splicing dell'esone 7 e l'espressione della neurofibromina, spostando la proporzione tra i diversi trascritti del gene *NF1* significativamente verso un trascritto mancante dell'esone 7. Mentre il costrutto contenente entrambe le mutazioni Q315Q e L316M mostra solo l'espressione del trascritto mancante l'esone 7, i costrutti contenenti le due mutazioni prese singolarmente ritengono in parte l'espressione del trascritto selvatico. Come predetto dal programma ESEfinder le due mutazioni Q315Q e R316M sono localizzate in motivi ESE riconosciuti da proteine SR diverse. Poiché ciascuna mutazione altera un solo elemento ESE, prese singolarmente queste mutazioni mantengono l'espressione di una piccola quantità di trascritto selvatico. Al contrario, la presenza contemporanea delle due mutazioni elimina entrambi i siti ESE e inibisce completamente l'inclusione dell'esone 7 nel trascritto di *NF1*. In accordo con questi risultati, uno studio precedente basato su RT-PCR ha evidenziato nel paziente portatore delle due mutazioni Q315Q e R316M la presenza di un trascritto addizionale mancante dell'esone 7 e responsabile del 61% dell'intero trascritto *NF1*<sup>110</sup>. Secondo l'analisi ESEfinder, la mutazione R304X non altera alcun sito ESE. Ciononostante, una volta che la R304X è stata inserita nel contesto di un minigene eterologo, è stata capace di aumentare lo skipping dell'esone 7 del gene *NF1*. Risultati simili sono stati ottenuti in uno studio precedente esprimendo la mutazione R304X in un altro vettore<sup>111</sup>. Utilizzando il programma RESCUE-ESE, un metodo computazionale alternativo all'ESEfinder, questi

autori hanno evidenziato che la mutazione R304X causa la perdita di due esameri conservati nell'esone 7, ma allo stesso tempo crea due nuovi motivi esamerici <sup>111</sup>. Gli stessi autori, hanno speculato che la perdita dei due siti ESE come risultato della mutazione R304X potrebbe avere un effetto dominante sull'introduzione di due nuovi siti ESE <sup>111</sup>. Nel nostro esperimento, la ricerca di possibili siti di legame per proteine SR nell'esone 7 del gene *NF1* mediante il programma ESEfinder ha dimostrato la presenza di tre elementi ESE nella sequenza selvatica dell'esone 7 del gene *NF1*. Questo risultato, insieme alla identificazione nell'esone 7 di giunzioni di splicing deboli suggerisce che lo splicing alternativo di questo esone avvenga anche in condizioni non patologiche. Anche il costrutto minigene di tipo selvatico ha mostrato la presenza di tre trascritti alternativi del gene *NF1*, uno che include l'esone 7, uno che manca dell'intera sequenza dell'esone 7, e un terzo mancante gli ultimi 32 nucleotidi dell'esone 7, indicando l'esistenza in vitro di un equilibrio tra i diversi prodotti dello splicing di questo esone del gene *NF1*, anche se nel costrutto selvatico la variante *NF1*ΔE7 risulta meno espressa degli altri trascritti. L'analisi in silico dell'isoforma R304X non ha mostrato risultati rilevanti, mentre l'analisi in vitro ha dimostrato una riduzione del trascritto "full length" di *NF1*, anche se inferiore di quella osservata per le mutazioni Q315Q e L316M. Il trascritto mancante le ultime 32 basi dell'esone 7 è espresso da tutti i costrutti minigene. Alla nostra conoscenza, un RNA messaggero mancante gli ultimi 32 nucleotidi dell'esone 7 non è mai stato descritto. Sebbene questo trascritto possa rappresentare una isoforma del gene *NF1* espressa a livelli molto bassi, non possiamo escludere che questo messaggero sia in realtà un artefatto dell'analisi in vitro. Infatti, nei saggi funzionali che utilizzano costrutti minigene la proporzione di trascritti prodotti non sempre corrisponde in maniera precisa ai livelli di RNA misurati nei pazienti. Deve essere inoltre considerato che in vivo la trascrizione di un messaggero mancante 32 nucleotidi dell'esone 7 risulterebbe nella produzione di un trascritto "out-of-frame", che verrebbe molto probabilmente degradato dal pathway del "nonsense RNA-mediated decay (NMD)". Mentre le mutazioni Q315Q, L316M e R304X spostano l'equilibrio dei trascritti *NF1* verso l'eliminazione dell'esone 7, l'analisi minigene del cambio silente N335N dimostra che questa variante sposta completamente l'equilibrio dei messaggeri verso il trascritto "full length", essendo quest'ultimo l'unico trascritto identificabile. Precedentemente, è stato riportato che la sequenza intorno al nucleotide 1007G presenta una debole attività ESE e che la mutazione di questo sito non esercita un effetto significativo sullo splicing <sup>112</sup>. Sulla base di questo risultato, è stato ipotizzato che questa sequenza ESE sia parte di un elemento regolatorio composto dello splicing

(CERES), definito come “elemento con funzioni sovrapposte di stimolatore e inibitore dello splicing”<sup>112</sup>. Utilizzando l'interfaccia ESEfinder è stato possibile prevedere che la conseguenza del cambio N335N è l'introduzione di un nuovo sito ESE per una proteina SRp40. Alternativamente, il programma ExonScan (<http://genes.mit.edu/exonscan/>), un'altro algoritmo capace di simulare lo splicing basandosi sulla presenza di determinate sequenze nucleotidiche, fornisce una predizione diversa che mostra che la mutazione 910T>C (N335N) risulta nella perdita di un sito (ATCAAT) di silenziamento dello splicing (ESS) anche se contemporaneamente crea un nuovo sito (AACTGG) ESS. Come precedentemente ipotizzato per la mutazione R304X, anche per il cambio silente N335N, è possibile ipotizzare che la perdita di un ipotetico motivo di splicing rivesta un effetto dominante sull'acquisizione di un nuovo elemento di regolazione dello splicing. In accordo con questa ipotesi, l'analisi in vitro ha dimostrato che il nucleotide 1005T potrebbe appartenere ad una sequenza ESS, dal momento che la sostituzione di questo nucleotide elimina completamente l'espressione della variante di splicing mancante l'esone 7. La presenza di alcuni elementi ESE/ESS nell'esone 7 del gene *NF1* e l'esistenza del trascritto mancante l'esone 7 negli individui sani indica che lo splicing di questo esone debba essere finemente regolato. Bisogna anche considerare che l'esone 7 è un esone “in-frame”, pertanto la proteina risultante dallo splicing anomalo dell'esone 7 potrebbe in teoria ritenere qualche funzione, avendo perso solamente i residui codificati da questo esone. Ciononostante, l'esone 7 rappresenta un “hot spot” per le mutazioni del gene *NF1*, come dimostrato dal nostro studio, e pertanto rappresenta un esone importante nella patologia molecolare del gene *NF1*. Si potrebbe anche speculare che l'isoforma mancante dell'esone 7 possa avere un ruolo specifico nel metabolismo cellulare, o che la sua espressione possa rappresentare un meccanismo per regolare i livelli intracellulari della neurofibromina. La sostituzione N335N, che elimina in vitro l'espressione dell'isoforma mancante l'esone 7, è stata identificata in un soggetto in cui prima di diagnosticare la neurofibromatosi tipo 1 nella figlia e nel nipote, non erano soddisfatti i criteri clinici della *NF1*, dal momento che il paziente presentava solo tre neurofibromi cutanei. Un fenotipo *NF1* incompleto può essere spiegato in diversi modi. Ad esempio può essere dovuto dalla presenza di un mosaicismmo molto diluito per la mutazione 476delC, non identificabile nel sangue periferico di questo soggetto, ma presente in cis insieme alla sostituzione N335N nella linea germinale della figlia e del nipote. Purtroppo non è stato possibile esaminare nessuno dei neurofibromi del paziente per verificare questa ipotesi. Alternativamente, si può ipotizzare che la mutazione frameshift 476delC si sia originata *de novo* sullo stesso

allele (in cis) della N335N durante la spermatogenesi. Nonostante queste ipotesi, il contributo della variante N335N al fenotipo clinico della NF1 è comunque complicato da ipotizzare. Infatti, è difficile immaginare che questo cambio nucleotidico possa avere un effetto sullo splicing del gene *NF1* indipendentemente dalla mutazione frameshift 476delC, dal momento che questo tipo di mutazioni generalmente si associa alla mancata espressione dell'allele corrispondente. D'altra parte, l'assenza di questa variante nucleotidica in un ampio campione di soggetti di controllo dimostra che la N335N non è una variante polimorfica. Al contrario, il ruolo patogenetico delle mutazioni Q315Q e L316M non è difficile da inferire dal momento che entrambe le mutazioni sono sostituzioni *de novo* appartenenti a codoni adiacenti. Inoltre, come mostrato dall'analisi minigene la presenza delle due mutazioni prese singolarmente è sufficiente per aumentare l'espressione del trascritto mancante l'esone 7, suggerendo che ciascuna di queste mutazioni possa da sola provocare la neurofibromatosi tipo 1. In questo caso, le due mutazioni hanno agito nello stesso paziente NF1 in maniera additiva.

## **Parte 4 - Caratteristiche molecolari dei tumori della guaina dei nervi periferici in casi sporadici e in soggetti affetti da neurofibromatosi 1**

### **Materiali e metodi**

#### Campioni tumorali

Per lo svolgimento di questa tesi sono state analizzate 48 biopsie di MPNST prelevate da 48 pazienti non imparentati tra loro e così suddivisi: 26 pazienti (13 uomini, 13 donne) affetti da neurofibromatosi 1 e 22 (13 uomini, 9 donne) casi sporadici. Per 7/25 pazienti NF1 era inoltre disponibile una biopsia di neurofibroma cutaneo. Le biopsie di MPNST sono state raccolte presso il centro tumori del Norwegian Radium hospital (Oslo), del Lund University Hospital, del Karolinska Hospital (Stoccolma), e del University Medical Center (Groningen, The Netherlands) durante gli anni 1984-2002. A seguito di una classificazione istopatologica svolta secondo linee guida riportate in letteratura, i 48 MPNST sono stati così suddivisi: 40 tumori primitivi, 5 recidivanti e 3 metastatici; 30 (17 NF1-associati, 13 sporadici) di grado alto, 7 (1 NF1-associato, 6 sporadici) di grado basso, 11 (8 NF1-associati, 3 sporadici) non classificati. Sezioni dei tessuti congelati usati per l'estrazione del DNA sono state valutate da un patologo di riferimento per definire la proporzione di cellule tumorali all'interno di ciascun campione: la media è stata del 90% di cellule tumorali. Il DNA è stato estratto dai tessuti congelati e dal sangue seguendo un protocollo fenolo-cloroformio.

#### Ricerca di mutazioni nel gene *NF1*

La ricerca di mutazioni puntiformi e di sbilanciamenti del numero di copie del gene *NF1* sono state condotte secondo i protocolli "PCR-dHPLC-sequenziamento diretto" e "MLPA-real time PCR" precedentemente descritti (v. sezione Materiali e metodi della Parte 2).

#### Ricerca di mutazioni puntiformi nei geni *KRAS* e *BRAF*

Gli hot spot di mutazione del gene *KRAS* (esone 2 e 3) sono stati sequenziati direttamente con i primer: *KRAS* Ex2 F (5'-ACTGGTGGAGTATTTGATAG-3'); *KRAS* Ex2 R (5'-GTATCAAAGAATGGTCCT-3'); *KRAS* Ex3 F: (5'-ATAATAGCCAATCCTAA-3'); e *KRAS* Ex3 R (5'-ATGGCATTAGCAAAG-3'). Gli hot spot di mutazione del gene *BRAF* (esone 11 e 15) sono stati invece sequenziati secondo il protocollo riportato da Davies et al. 2002 <sup>113</sup>.

Le sequenze sono state comparate con la sequenza mRNA di riferimento del gene *KRAS*, (NM\_004985) e *BRAF* (NM\_004333). La prima base (in posizione +1) della metionina iniziale è stata considerata il punto di inizio del cDNA.

## **Risultati**

Un totale di 47 MPNST (25 NF1-associati e 22 sporadici) sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni puntiformi e delezioni-duplicazioni singolo-multiesoniche nel gene *NF1*. Sono stati inoltre inclusi nell'analisi 7 neurofibromi cutanei prelevati da 7 dei 25 pazienti NF1. Abbiamo identificato mutazioni del gene *NF1* in 9/22 MPNST sporadici, 23/25 MPNST NF1-associati, e in 3/7 neurofibromi cutanei. Tra i tumori NF1-associati, 11 mostravano 2 mutazioni *NF1*, mentre 12 erano portatori di una singola alterazione. Non abbiamo identificato alcuna mutazione *NF1* in 2 dei campioni NF1-associati ed in 13 dei campioni sporadici, ma la nostra analisi non ha riguardato le regioni non-codificanti del gene *NF1* (promotore, introni, 3'UTR). Le mutazioni del gene *NF1* identificate negli MPNST NF1-associati sono state indagate nel corrispondente DNA da linfociti per determinare quali fossero gli eventi germinali. Dal momento per alcuni dei tumori NF1-associati che non era disponibile un campione di sangue, non è stato possibile determinare il ruolo costituzionale o somatico per 10 alterazioni identificate nel gene *NF1*. Le tabelle 9 e 10 riassumo i dati clinici e molecolari dei campioni analizzati.

### Mutazioni di NF1 germinali

Negli MPNST NF1-associati sono state identificate in totale di 34 mutazioni, 10 delle quali rappresentano eventi germinali. Queste includono 8 diverse mutazioni puntiformi e 2 grandi delezioni (Tabella 8, Figure 13a e 14). Sei delle otto mutazioni puntiformi causano direttamente o indirettamente un codone di terminazione prematuro (PTC, premature termination codon): 3 mutazioni frameshift (2 delezioni e una inserzione) e 3 mutazioni nonsense. Inoltre sono state identificate una mutazione missenso e una di splicing a carico dell'esone 23-1. Cinque delle 8 mutazioni individuate sono nuove (Tabella 8).

### Mutazioni di NF1 somatiche negli MPNST NF1-associati

Le mutazioni somatiche identificate negli MPNST NF1 associati includono 6 grandi riarrangiamenti che includono il *locus NF1* (4 delezioni e 2 duplicazioni) e 4 mutazioni puntiformi tra cui: 3 frameshift e una nonsense, tutte mutazioni che introducono un PTC (Tabella 8, Figure 13b e 14). I campioni 24, 57, 65, 83, 96 e 116 sono portatori di una grande delezione che comprende tutti i probe del kit MLPA P122, come la delezione del

campione 56. Il campione 80 ha una delezione di 1Mb che non include le ultime 3 sonde telomeriche del kit MLPA P122 (*HCA66*, *JJAZ1* e *LOC114659*), mentre il campione 43 mostra una duplicazione che non include le sonde centromeri che *CRLF3*, *FLJ12735*, *CENTA2* e *RNF135*.

Il DNA di 7 neurofibromi cutanei prelevati da pazienti NF1 è stato inoltre incluso nelle analisi. Abbiamo identificato una piccola delezione somatica non presente nel corrispondente MPNST, in 3 di questi campioni (Tabella 10).

#### Mutazioni di NF1 somatiche negli MPNST sporadici

Abbiamo identificato un totale di 12 alterazioni nei 22 tumori sporadici analizzati. Queste includono 6 grandi riarrangiamenti (4 grandi delezioni e 2 grandi duplicazioni), 5 diverse mutazioni puntiformi e una delezione multiesonica che si estende dall'esone 2 al 49 (Tabella 9, Figure 13c e 14). Nel campione 50 è stata individuata una delezione di 1.3Mb che non comprende né le sonde centromeri che, né quella dell'esone 1 del kit MLPA P122. Inoltre abbiamo trovato una mutazione T>G nell'introne 48, 16 nucleotidi a monte dell'esone 48a. Ad eccezione di questa sostituzione intronica, tutte le mutazioni puntiformi riscontrate negli MPNST sporadici causano direttamente o indirettamente un PTC: 3 nonsense, una delezione di 4 nucleotidi e una di 13 nucleotidi.

#### Mutazioni di *KRAS* e *BRAF* somatiche

Dei 29 MPNST analizzati per mutazioni nei geni *KRAS* e *BRAF*, solo il campione 51 è risultato portatore di una mutazione in *BRAF* (Esone 15 c.1742A > G, N581S).

Tabella 8. Caratteristiche cliniche e molecolari di 25 MPNST NF1-associati

ID	Sex	Age (years)	Grade	Sample type	Location	Germline event	Somatic event
20	F	19	Low	Primary	Retroperitoneum	<b>Ex12a, c.(1830_1836)del4</b> Frameshift	None found
24	M	41	High	Primary	Thigh	<b>Ex38, c.6961_6962insC</b> Frameshift	Deletion covering entire <i>NF1</i> *
29†	M	33	High	Primary	Low trunk	Deletion covering entire <i>NF1</i> *	None found
37†	F	34	High	Primary	Retroperitoneum	Ex16, c.2446C>T, R816X Nonsense	Ex6, c.(731–5_741)del9 Frameshift
38†	F	71	High	Primary	Upper trunk	None found	Ex12a, c.1830_1831delCinsTT Frameshift
43	M	14	High	Primary	Low trunk	Ex13, c.2041C>T, R681X Nonsense	Duplication covering entire <i>NF1</i> *
44†	M	17	High	Primary	Thigh	Deletion covering entire <i>NF1</i> *	Ex16, c.2446C>T, R816X Nonsense
46	M	45	n.e.	Recurrence	Knee	Blood not evaluated	None found
48	F	35	High	Primary	Thigh	None found	Deletion covering entire <i>NF1</i> *
53†	F	15	High	Primary	Pelvis	Ex4b, c.574C>T, R192X Nonsense	Ex24, c.4203_4204insT Frameshift
56†	M	24	High	Primary	Thigh	<b>Ex25, c.4276C&gt;A, Q1426K</b> Missense	Duplication covering entire <i>NF1</i> *
57	F	24	High	Primary	Intrathoracic	Deletion covering entire <i>NF1</i> *	
58	F	26	High	Primary	Retroperitoneum	Blood not evaluated Ex37, c.6792C>G, Y2264X, nonsense; deletion covering entire <i>NF1</i> *	
60†	M	20	High	Recurrence	Shoulder	Blood not evaluated <b>Ex23–2, c.4076_4077delC</b> Frameshift	None found
64	M	26	n.e.	Primary	Thoracic wall	<b>IVS 23–I, c.3368+1delG</b> Splicing	Deletion covering entire <i>NF1</i> *
65	M	53	High	Primary	Right shoulder	Ex37, c.6792C>A, Y2264X, nonsense; deletion covering entire <i>NF1</i> *	
67	M	28	n.e.	Metastasis	Lung/small intestine	Blood not evaluated	None found
74	M	29	High	Primary	Sacral region	<b>Ex33, c.6215_6217delC</b> , frameshift Blood not evaluated	
77	M	26	n.e.	Metastasis	Lung	Ex10c, c.1541_1542delAG, frameshift Blood not evaluated	
79	M	21	High	Primary	Thigh	Del Ex24–27b, large intragenic deletion Blood not evaluated	
80	F	25	High	Primary	Neck	1 Mb deletion* Blood not evaluated	
83	F	52	n.e.	Primary	Mediastinum	<b>Ex2, c.62T&gt;G, L21R</b> , missense; deletion covering entire <i>NF1</i> *	
86	F	42	High	Recurrence	Neck	Blood not evaluated None found	Deletion covering entire <i>NF1</i> *
96†	F	14	n.e.	Primary	Thigh	<b>Ex29, c.5207T&gt;A, V1736D</b> , missense; deletion covering entire <i>NF1</i> *	
116	F	30	n.e.	Primary	Retroperitoneum	Blood not evaluated Deletion covering entire <i>NF1</i> *	
						Blood not evaluated	

Nucleotide numbering is based on the *NF1* cDNA reference sequence (GenBank, NM.000267). The first base (position +1) of the initiator methionine is taken as the start of the cDNA.

F = female; M = male; n.e. = not evaluated.

\* Alterations encompassing the 17q11.2 locus as seen by P081–82/PI22 MLPA analyses.

† Previously analysed tumours without *TP53* gene point mutations [30].

Mutations in bold have not been described previously.

Tabella 9. Caratteristiche cliniche e molecolari di 22 MPNST sporadici

ID	Sex	Age (years)	Grade	Sample type	Location	Somatic event 1	Somatic event 2
23*	M	64	Low	Primary	Retroperitoneum	None found	None found
26*	M	22	High	Primary	Thigh	None found	None found
32*	F	77	High	Primary	Gluteal	None found	None found
34	M	15	Low	Primary	Thigh	Ex22, c.3826C>T, R1276X	<b>Ex16, c.2677-2689delA-AATTTATGGATC</b> Frameshift
35	M	42	High	Primary	n.e.	Nonsense	None found
40	F	50	Low	Primary	Thigh	None found	None found
49	M	27	High	Primary	Thigh	None found	None found
50	M	30	High	Primary	Leg	Del Ex2-49 <sup>†</sup>	None found
51	F	73	High	Primary	Buttock	Ex4b, c.539T>A, L180X	Duplication covering entire <i>NFI</i> <sup>†</sup>
52*	F	37	High	Primary	Arm	Nonsense	None found
61 <sup>o</sup>	F	59	Low	Primary	Axilla	Deletion covering entire <i>NFI</i> <sup>†</sup>	None found
63	M	62	n.e.	Recurrence	Thigh	Deletion covering entire <i>NFI</i> <sup>†</sup>	None found
68	M	41	High	Primary	Thigh	Deletion covering entire <i>NFI</i> <sup>†</sup>	None found
70	M	74	n.e.	Primary	Mediastinum	None found	None found
87	M	41	n.e.	Recurrence	Axilla	<b>Ex48a-16T&gt;G</b>	Duplication covering entire <i>NFI</i> <sup>†</sup>
88	F	32	Low	Primary	Thigh	Splicing Ex31, c.5839C>T, R1947X	None found
91*	F	45	High	Primary	Buttock	Nonsense <b>Ex37, c.(6787-6792)del4</b>	Deletion covering entire <i>NFI</i> <sup>†</sup>
115	M	54	High	Primary	Back	Frameshift	None found
117	M	79	High	Primary	Thigh	None found	None found
118	F	11	High	Primary	Thigh	None found	None found
119	M	54	Low	Primary	Thigh	None found	None found
120	F	32	High	Metastasis	Lung	None found	None found

Nucleotide numbering is based on the *NFI* cDNA reference sequence (GenBank, NM\_000267). The first base (position +1) of the initiator methionine is taken as the start of the cDNA.

M = male; F = female; n.e. = not evaluated.

\* Previously analysed tumours without *TP53* gene point mutations [30].

<sup>†</sup> Data derived from P081-82/P122 MLPA analyses.

Mutations in bold are presented here for the first time.

Tabella 10. Caratteristiche molecolari di 7 neurofibromi benigni.

Table 3. Molecular features of seven benign neurofibromas

ID	Germline event	Somatic event
20	<b>Ex12a, c.(1830-1836)del4</b> Frameshift	<b>Ex33, c.(6253-6354+5)del17</b> Frameshift
24	<b>Ex38, c.6961-6962insC</b> Frameshift	None found
29	Whole <i>NFI</i> gene deletion*	None found
37	Ex16, c.2446C>T, R816X Nonsense	None found
38	None found	<b>Ex22, c.3727-3728delCT</b> Frameshift
43	Ex13, c.2041C>T, R681X Nonsense	None found
44	Whole <i>NFI</i> gene deletion*	<b>Ex40, c.(7126-44.7174)del192</b> Frameshift

The ID of the neurofibromas corresponds to the ID of the patients with *NFI* tumours. Nucleotide numbering is based on the *NFI* cDNA reference sequence (GenBank, NM\_000267). The first base (position +1) of the initiator methionine is taken as the start of the cDNA. Mutations in bold have not been described previously.

\* Alterations encompassing the 17q11.2 locus as seen by P081-82/P122 MLPA analyses.

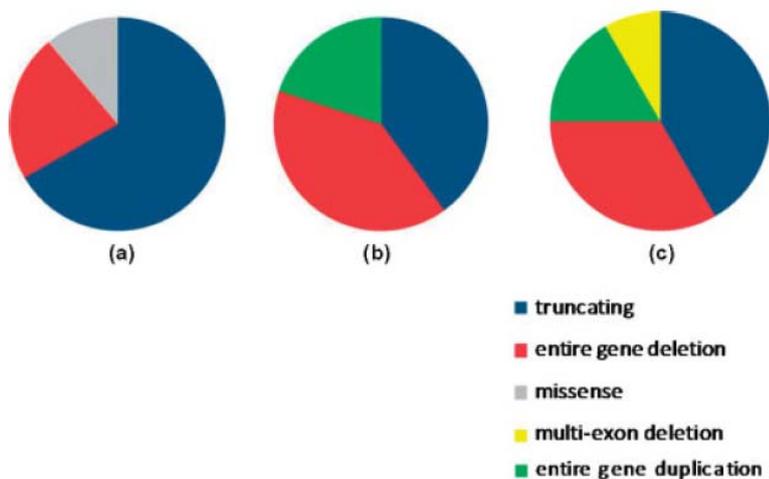


Figura 13. Spettro mutazionale germinale e somatico del gene *NF1*. a. Mutazioni germinali nei pazienti *NF1*. b. Mutazioni somatiche negli MPNST di pazienti *NF1*. c. Mutazioni somatiche negli MPNST di casi sporadici. Il codice dei colori corrispondenti alle diverse tipologie di mutazioni è illustrato sulla destra.

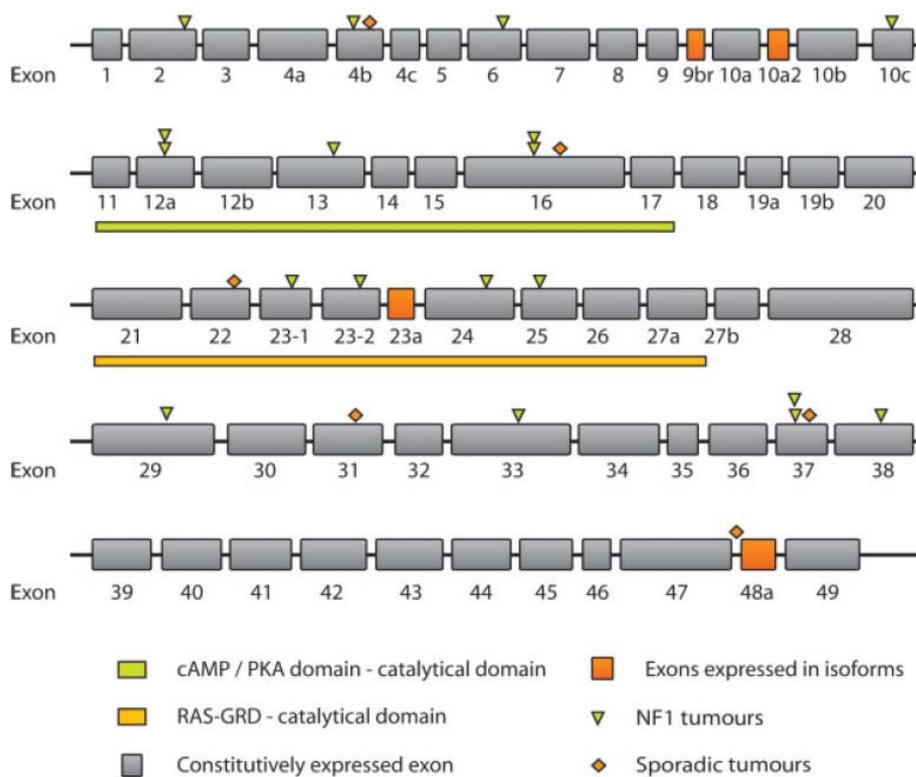


Figura 14. Distribuzione lungo la sequenza del gene *NF1* delle mutazioni puntiformi identificate negli MPNST *NF1*-associati e sporadici. Gli esoni costitutivi del gene sono rappresentati come rettangoli grigi, quelli che codificano per le isoforme come rettangoli arancioni. I triangoli ed i rombi rappresentano le mutazioni identificate rispettivamente negli MPNST *NF1*-associati e sporadici.

## Discussione

Questo studio ha riguardato l'analisi del gene *NF1* negli MPNST di soggetti sia affetti da *NF1* che sporadici. Come precedentemente riportato in letteratura, lo spettro mutazionale germinale del gene *NF1* identificato in casistiche di pazienti *NF1* con fenotipi diversi, comprende mutazioni troncanti (55%), mutazioni missenso (10%), delezioni multiesoniche (7%) e delezioni dell'intera sequenza codificante (5%), senza una ovvia correlazione genotipo-fenotipo<sup>94, 95, 114</sup>. I dati di questo studio mostrano invece che lo spettro germinale del gene *NF1* in pazienti con MPNST comprende mutazioni troncanti (67%), mutazioni missenso (11%) e delezioni dell'intero gene (22%) (Figura 13a), suggerendo che molti di questi tumori insorgono in pazienti portatori di alterazioni inattivanti un allele del gene (89%, mutazioni troncanti e delezioni dell'intero gene). Rispetto ad una casistica generale di pazienti *NF1*, la percentuale di mutazioni inattivanti è infatti maggiore nei pazienti che sviluppano MPNST. Questi risultati sono in linea con un recente lavoro che riporta che il 95% delle mutazioni germinali del gene *NF1* trovate negli MPNST sono inattivanti<sup>115</sup>.

Le mutazioni somatiche del gene *NF1* (Figura 13b) identificate in questo studio includono maggiormente delezioni dell'intera sequenza codificante e dei geni fiancheggianti, e sono comparabili a quelle degli MPNST sporadici (Figura 13c) dal momento che la maggior parte di loro porta ad inattivazione del gene.

Solamente lo 0.3% dei pazienti *NF1* è portatore di una duplicazione dell'intero gene<sup>101</sup>, mentre questo tipo di alterazione è risultata essere comune sia negli MPNST sporadici che in quelli *NF1*-associati (rispettivamente 17% e 22%).

Come precedentemente dimostrato esiste una differenza significativa tra il meccanismo di inattivazione che agisce a livello somatico nei neurofibromi di pazienti *NF1* portatori di grandi delezioni, rispetto ai pazienti *NF1* non-deleti<sup>80</sup>. I nostri dati mostrano che gli eventi somatici che avvengono in pazienti portatori di mutazioni germinali puntiformi sono preferenzialmente grandi riarrangiamenti cromosomici. A supporto di questa ipotesi il paziente 44, portatore di una grande delezione, ha sviluppato due diverse mutazioni puntiformi, rispettivamente in un MPNST ed in un neurofibroma benigno.

Come per quanto già descritto in letteratura per le mutazioni germinali<sup>28, 61</sup>, la maggior parte delle mutazioni puntiformi identificate negli MPNST sono causate da una transizione C>T in un di nucleotide CpG della sequenza codificante di *NF1* [c.574C > T (R192X); c.2041C > T (R681X); c.2446C>T (R816X); c.3826C > T (R1276X); c.5839C > T

(R1947X)], mettendo in evidenza che meccanismi simili agiscono nell'insorgenza di mutazioni germinali e somatiche.

La variante nucleotidica Ex48a-16T>G trovata nel paziente T87 è risultata assente in 200 cromosomi di controllo. L'esone 48a si trova vicino all'estremità C-terminale del gene, è soggetta a splicing alternativo e codifica per l'isoforma 3 della neurofibromina<sup>37</sup>. L'espressione di questa isoforma è stata trovata nel muscolo cardiaco, scheletrico e liscio, come anche nel cervello e nel tessuto nervoso<sup>37</sup>. Ad oggi la sua espressione non è mai stata valutata nei tumori e non possiamo escludere che possa svolgere un ruolo nello sviluppo degli MPNST.

In questo studio, oltre agli MPNST, sono stati analizzati anche dei neurofibromi cutanei benigni da 7 pazienti NF1. Dal momento che sono state identificate diverse mutazioni somatiche nell'MPNST e nel neurofibroma cutaneo prelevati da uno stesso paziente, i risultati dimostrano l'indipendenza di ogni "second hit".

La perdita di funzione della neurofibromina è probabilmente sufficiente alla formazione dei neurofibromi cutanei<sup>74</sup>, ma ulteriori alterazioni genetiche devono verificarsi per la trasformazione maligna del tumore (mutazioni nei geni *TP53*, *CDKN2A* o *RB1*). Dei campioni analizzati, 2/25 MPNST NF1-associati e 13/22 MPNST sporadici sono risultati negativi alla ricerca di mutazioni in *NF1*. Sebbene l'analisi condotta non ha riguardato alcune porzioni del gene (introni, 5' e 3'UTR), i nostri risultati fanno ipotizzare un maggior contributo allo sviluppo dei tumori da parte di altri geni, specialmente negli MPNST sporadici. I geni *KRAS* e *BRAF* sono pertanto stati inclusi nell'analisi ed una singola mutazione in *BRAF* (c.1742A > G, N581S) è stata identificata in un paziente con un tumore sporadico e portatore di 2 mutazioni in *NF1* (paziente 51). Questo risultato indica che né *KRAS*, né *BRAF* giocano un ruolo dello sviluppo degli MPNST.

Mutazioni nei geni *NF1* e *TP53* sono state descritte in alcuni MPNST, ma non nei neurofibromi benigni<sup>116-119</sup>. Dei campioni inclusi in questo studio, 14 (8 NF1-associati e 6 sporadici) sono risultati negativi ad una precedente ricerca di mutazioni in *TP53*.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno mostrato come lo spettro delle mutazioni germinali di *NF1* sia diverso da quello delle mutazioni somatiche individuate negli MPNST, mentre gli eventi somatici mostrano caratteristiche comuni tra gli MPNST sporadici e quelli NF1-associati. Il gene *NF1* è maggiormente coinvolto nella progressione dei tumori NF1-associati.

## Parte 5 – Mutazioni dei geni del pathway di *Ras* nel cancro coloretale sporadico

### Materiali e metodi

#### Campioni tumorali

Sessantacinque campioni di carcinoma coloretale sporadico (CRC) prelevati da 64 pazienti (età media 70 anni) sono stati inclusi in questo studio. Ventinove campioni mostravano instabilità ai microsatelliti (MSI), mentre 36 mostravano stabilità (MSS). L'intestino colon, includendo il retto, è stato schematicamente suddiviso in 2 sezioni: prossimale (o lato destro) che si estende dal cieco al trasverso, e distale (o lato sinistro) che si estende dal trasverso al retto. Dei 65 campioni tumorali, 23 erano localizzati nel colon prossimale e 42 nel distale. I campioni contenevano in media 84% di cellule tumorali.

Allo scopo di investigare il ruolo della cascata del segnale delle MAP chinasi nella patogenesi dei CRC, i campioni raccolti sono per la ricerca di alterazioni nei geni *KRAS*, *BRAF*, *NF1* e *RASSF1A*, tutti geni che fanno parte del pathway MAPK. Le correlazioni statistiche tra le alterazioni geniche individuate e le caratteristiche cliniche dei tumori analizzati sono state validate mediante il test esatto di Fisher e mediante il test chi quadrato di Pearson. Tutti i valori di *p* sono stati derivati usando il software SPSS (versione 15.0) (SPSS, Chicago, IL) e considerati significativamente statistici se  $p \leq 0.05$ .

#### Ricerca di mutazioni nel gene *NF1*

La ricerca di mutazioni puntiformi e di sbilanciamenti del numero di copie del gene *NF1* sono state condotte secondo i protocolli "PCR-dHPLC-sequenziamento diretto" e "MLPA-real time PCR" precedentemente descritti (v. sezione Materiali e metodi della Parte 2).

#### Ricerca di mutazioni puntiformi nei geni *KRAS* e *BRAF*

La ricerca di mutazioni puntiformi negli esoni hot-spot di mutazione dei geni *KRAS* e *BRAF* è stata effettuata come precedentemente descritto (v. sezione Materiali e metodi della Parte 4).

### PCR metilazione-specifica (MSP) del gene *RASSF1A*

La MSP del gene *RASSF1A* è stata condotta secondo il protocollo riportato da Fackler et al. 2004<sup>120</sup>. Un campione di DNA da placenta umana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) trattato con l'enzima metil-transferasi SssI (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) è stato utilizzato come controllo positivo per la MSP degli alleli metilati. Il DNA da linfociti di controllo è stato invece usato come controllo per gli alleli non metilati. I prodotti di PCR sono stati separati su un gel d'agarosio al 2% e l'intensità delle bande è stata quantificata indipendentemente da 2 persone. I campioni metilati con intensità uguale o maggiore ai controlli positivi, sono stati considerati ipermetilati.

### **Risultati**

La Figura 15 illustra la localizzazione delle mutazioni individuate rispettivamente nei geni *NF1*, *KRAS* e *BRAF* nei campioni di CRC inclusi in questo studio. Tutti i campioni analizzati e le alterazioni identificate sono mostrati in tabella 11 ed in Figura 16.

#### *NF1*

Uno dei 24 CRC analizzati per mutazioni nel gene *NF1* presenta 2 mutazioni missenso (D1302Y e V2577G), la prima delle quali mappa all'interno del dominio RAS-GRD. L'analisi di modelling molecolare ha mostrato che la mutazione D1302Y provoca la perdita di una carica negativa che potrebbe rivestire un ruolo nella ripiegamento della proteina e nel legame con altre proteine. Dei campioni rimanenti, 9 mostrano mutazioni introniche (Tabella 11), e 4 una duplicazione parziale o totale del gene *NF1* (Tabella 11). Il confronto tra i dati molecolari e quelli patologici mostra che 8/10 campioni con alterazioni esoniche o introniche risultano essere MSI ( $p=0.047$ ), mentre 3/4 duplicazioni sono state trovate in campioni MSS.

#### *KRAS*

Dei 65 tumori analizzati per mutazioni in *KRAS*, 26 (40%) sono portatori di un'alterazione (Tabella 11). Tra queste mutazioni, 24 sono missenso e mappano nei codoni 12, 13 o 61. Le restanti 2 mutazioni comprendono una inserzione di 3 nucleotidi nell'esone 2 (c.49insTGG), ed una delezione di 3 nucleotidi nell'esone 2 (c.184\_189delGAG) (Tabella 11). Inoltre 2 CRC mostrano 2 mutazioni di *KRAS* (Tabella 11). In totale le mutazioni in *KRAS* sembrano essere più frequenti in tumori MSS (69%) che in tumori MSI (46%) ( $p=0.08$ ).

## BRAF

L'analisi mutazionale del gene *BRAF* ha mostrato che 14/64 (22%) campioni presentano un'alterazione di questo gene. Undici dei 14 CRC sono portatori della mutazione ricorrente V600E (Tabella 11). Le mutazioni in *BRAF* sono fortemente associate a MSI, sesso femminile del paziente, e localizzazione prossimale del tumore (rispettivamente  $p=0.006$ ,  $p=0.015$  e  $p=0.025$ ).

## RASSF1A

Cinquantanove CRC sono stati analizzati tramite MSP e 18 (31%) sono risultati ipermetilati nel promotore del gene *RASSF1A*. La metilazione era più frequente nei tumori a localizzazione distale ( $p=0.041$ ), ma non segrega col fenotipo MSS. In 8 tumori l'ipermetilazione di *RASSF1A* è stata l'unica alterazione osservata tra i 4 geni analizzati. Non abbiamo accertato alcuna correlazione tra la metilazione di *RASSF1A* e lo stato mutazionale degli altri geni analizzati.

## Alterazione della cascata del segnale di Ras

Analizzando le mutazioni dei diversi geni in singoli campioni, abbiamo trovato che le alterazioni di *KRAS* e *BRAF* sono mutualmente esclusive ( $p=0.0001$ ). Il campione portatore della mutazione missenso di *NF1* era MSI, con localizzazione prossimale, e portatore di una mutazione in *BRAF*. Includendo anche le mutazioni introniche di *NF1*, risulta che 6/8 mutazioni di *BRAF* sono presenti in campioni mutati per *NF1* ( $p=0.03$ ) e co-segregano con il fenotipo MSI. Tre delle 4 duplicazioni del gene *NF1* sono state identificate in tumori non mutati per *BRAF* e *KRAS*. I restanti CRC presentano sia una mutazione di *KRAS* che una duplicazione di *NF1*.

In totale abbiamo trovato che 48/65 campioni (74%) di CRC presentano un'iper-attivazione del pathway di *RAS*, dovuta ad un'alterazione di almeno uno dei 4 geni analizzati (una alterazione in 37/48 CRC, due alterazioni in 10/48 CRC, tre alterazioni in 1/48 CRC). Per 24 dei campioni con l'analisi completa di tutti e quattro i geni, il numero di CRC con almeno una alterazione è 19 (79%): una alterazione è stata caratterizzata in 14 campioni, due in 4 campioni, tre in un campione.

Tabella 11. Eventi somatici identificati nei CRC in quattro geni del pathway MAPK

Tumor ID	MSI Status	<i>KRAS</i> <sup>mut</sup>	<i>BRAF</i> <sup>mut</sup>	<i>NF1</i> <sup>mut</sup>	MLPA	Real-time	RASS
848	MSI	WT	WT	NP	NP		U
854	MSI	c.184-189delGAG	WT	NP	NP		U
884	MSI	WT	V600E	D1302Y/V2577G	WT		U
894	MSI	c.49insTTG	WT	NP	NP		U
910	MSI	WT	WT	c.(3114-50)delTTG	WT		U
912	MSI	G13D	WT	NP	NP		U
955	MSI	WT	V600E	NP	NP		U
965	MSI	WT	V600E	NP	NP		U
980	MSI	WT	V600E	WT	WT		U
984	MSI	WT	V600E	WT	WT		U
988	MSI	WT	WT	NP	NP		ND
1022	MSI	WT	WT	NP	NP		U
1044	MSI	WT	V600E	c.480-57C>T	WT		U
1047	MSI	G12A/V14I	WT	WT	WT		M
1066	MSI	WT	WT	WT	WT		M
1117	MSI	WT	WT	NP	NP		U
1132	MSI	G12V	WT	NP	NP		U
1141	MSI	WT	WT	NP	NP		U
1190	MSI	WT	V600E	NP	NP		M
1193	MSI	WT	V600E	c.7395-7C>T	WT		U
1268	MSI	WT	V600E	Ex3+24G>A	WT		U
1273	MSI	WT	V600E	c.(1392+46_+53)delTT	WT		U
1314	MSI	WT	WT	NP	NP		U
1326	MSI	G13D	WT	c.(1392+46_+53)delTT	WT		U
1341	MSI	WT	V600E	c.(61-4_-12)delT	WT		M
1349	MSI	WT	WT	NP	NP		M
1363	MSI	G13D	WT	WT	Gain of IVS27b-Ex49	1.66	U
1388A	MSI	WT	WT	NP	NP		M
1388C	MSI	G13D	WT	NP	NP		M
868	MSS	WT	WT	NP	NP		U
886	MSS	G12D	WT	NP	NP		U
887	MSS	G12C	WT	NP	NP		M
896	MSS	WT	WT	WT	Gain of whole gene	1.59	M
904	MSS	WT	WT	NP	NP		U
922	MSS	G12V	WT	NP	NP		U
923	MSS	G13D	WT	NP	NP		U
927	MSS	G12V	WT	NP	NP		M
946	MSS	WT	WT	NP	NP		U
948	MSS	G12R	WT	NP	NP		U
953	MSS	WT	WT	WT	WT		U
966	MSS	Q61L	WT	NP	NP		U
974	MSS	G12A	WT	NP	NP		U
976	MSS	G12D	WT	NP	NP		M
1013	MSS	WT	D594G	NP	NP		U
1024	MSS	G12C	WT	NP	NP		U
1027	MSS	G13D	WT	NP	NP		U
1029	MSS	G12D	WT	NP	NP		U
1046	MSS	WT	WT	NP	NP		U
1060	MSS	WT	WT	NP	NP		M
1069	MSS	WT	WT	NP	NP		U
1103	MSS	WT	WT	WT	Gain of whole gene	1.25	U
1111	MSS	WT	WT	NP	NP		M
1121	MSS	G12A	WT	WT	WT		M
1124	MSS	G12D/G13D	WT	WT	WT		ND
1166	MSS	G13D	WT	WT	WT		M
1167	MSS	WT	WT	WT	Gain of whole gene	1.67	M
1194	MSS	WT	WT	NP	NP		M
1197	MSS	WT	WT	NP	NP		ND
1287	MSS	WT	WT	c.2252-31A>G	WT		ND
1294	MSS	WT	G469R	NP	NP		U
1296	MSS	G13D	WT	WT	WT		U
1340	MSS	WT	WT	WT	WT		ND
1364	MSS	WT	L597Q	NP	NP		M
1369	MSS	G12D	ND	NP	NP		ND
1391	MSS	G12D	WT	c.2252-31A>T	WT		U



*Figura 15. Distribuzione lungo la sequenza genica delle mutazioni identificate in ogni gene analizzato. Dei geni KRAS (a) e BRAF (b) gli esoni analizzati sono rappresentati in azzurro. Del gene NF1 (c) tutti gli esoni sono stati analizzati, e gli esoni in arancione indicano quelli che codificano per delle isoforme. Sulla destra sono mostrate alcuni dei risultati ottenuti per le reazioni di sequenza.*

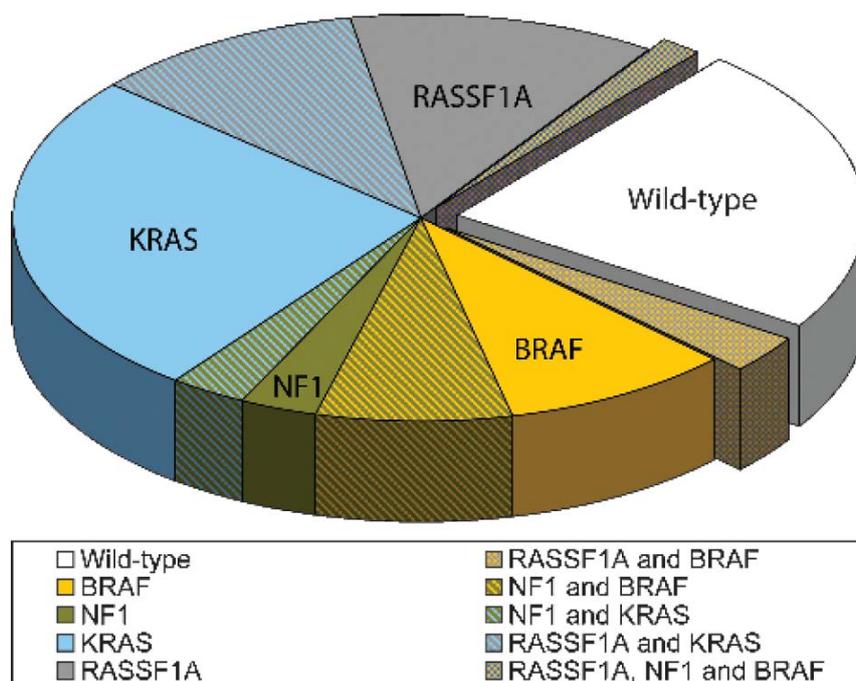


Figura 16. Alterazioni identificate nella serie di campioni inclusi nello studio. Il diagramma indica i 4 geni analizzati e la percentuale di tumori portatori di alterazioni. In senso orario a partire dalla fetta wild-type, sono indicate le alterazioni in “RASSF1A e BRAF”; “BRAF”; “BRAF e NF1”; “NF1”; “NF1 e KRAS”; “KRAS”; “KRAS e RASSF1A”; “RASSF1A”; “RASSF1A, NF1 e BRAF”.

## Discussione

Il ruolo del gene *NF1* è stato per la prima volta analizzato in un’ampia casistica di cancro coloretale. I lavori precedentemente pubblicati si erano infatti limitati all’analisi dei soli esoni del GRD in un limitato numero di campioni <sup>121, 122</sup>. In questo studio abbiamo identificato 9 mutazioni introniche che potrebbero essere coinvolte in meccanismi di splicing alternativo. Quattro di queste mutazioni sono inserzioni-delezioni di una o 2 basi all’interno di sequenze microsatelliti, causate pertanto da scivolamenti durante la replicazione del DNA in campioni con un difetto nel meccanismo di riparo del DNA <sup>123</sup>. L’analisi MLPA ha mostrato che il 17% dei campioni analizzati ha una duplicazione parziale o totale del gene *NF1*. Questo dato si discosta da quanto atteso per un gene tumore-soppressore: una duplicazione di *NF1* potrebbe portare ad una maggiore regolazione di *KRAS*, con un conseguente maggior controllo della proliferazione cellulare. I nostri dati sono però in accordo con quanto riportato da Čačev et al. 2005 <sup>124</sup>: i tumori coloretali, rispetto ai tessuti normali, mostrano un aumento significativo dell’espressione dell’isoforma I (che non comprende l’esone 23a) della neurofibromina <sup>124</sup>.

Il 40% dei campioni analizzati in questo studio mostrano una mutazione attivante nel gene *KRAS*. Questo gene, se mutato, porta alla fosforilazione dei geni a valle nella cascata del segnale, uno dei quali è *BRAF*. In questo studio abbiamo identificato mutazioni attivanti di *BRAF* nel 22% dei campioni. Di questi il 62% è risultato MSI.

Alcuni lavori descrivono un'iterazione indiretta tra *RASSF1A* e *KRAS* attraverso *RASSF5*<sup>125</sup>, mentre altri ipotizzano un'interazione diretta tra *RASSF1A* e *KRAS* attivato<sup>126</sup>. Come già descritto in letteratura, i nostri dati non mostrano una ricorrenza delle mutazioni di *BRAF* o *KRAS* in campioni in cui *RASSF1A* è metilato<sup>127</sup>.

In totale questo studio descrive come più del 70% dei CRC analizzati mostra un'attivazione del pathway MAPK. In conclusione, includendo anche le mutazioni del gene *NF1* che potrebbero avere un ruolo nel processo di splicing, il 77% dei campioni mostra una disregolazione di questa cascata del segnale.

## Conclusioni

Questa tesi riporta la messa a punto di una serie di protocolli sperimentali volti in primo luogo all'analisi molecolare del gene *NF1*, un gene complesso sia per la struttura, sia per la regolazione a cui è sottoposto. Successivamente le tecniche utilizzate sono state impiegate per l'analisi di meccanismi molecolari in cui questo gene è coinvolto.

I risultati ottenuti dalla messa a punto del protocollo MLPA-real time PCR dimostrano per la prima volta che una quota consistente dei pazienti *NF1* presenta delezioni esoniche e multiesoniche. Queste ultime, insieme alle delezioni dell'intero gene rappresentano in totale il 14% delle anomalie del gene *NF1*, per cui la diagnosi molecolare di neurofibromatosi tipo 1 deve essere necessariamente integrata nei pazienti negativi alla dHPLC con metodiche complementari, quali la FISH e l'MLPA. L'applicazione dello stesso protocollo ha inoltre permesso l'analisi di una delezione intragenica in un caso di mosaicismo germinale. Il metodo applicato si è rivelato capace di individuare un mosaicismo a bassa frequenza nei gameti maschili. Grazie a questo metodo in futuro potrà essere identificato un maggior numero di mosaicismi germinali nella *NF1* e si potrà definire la percentuale di cellule portatrici della mutazione, fornendo uno strumento per una iniziale predizione del rischio di ricorrenza nelle famiglie in cui segrega un mosaicismo.

Dal momento che le tecniche per l'identificazione di mutazione stanno diventando sempre più veloci ed economiche, la capacità di distinguere una mutazione da un polimorfismo rivestirà una sempre maggiore importanza, in particolare a livello diagnostico. Nelle nostre mani, il minigene assay si è rivelato uno strumento estremamente valido per la caratterizzazione funzionale delle mutazioni di splicing, ed in particolare di quelle che mappano fuori dai siti canonici AG e GT. In particolare, il saggio permette di studiare le conseguenze a livello funzionale di una specifica mutazione partendo direttamente dall'analisi del DNA genomico del paziente, evitando il trattamento di campioni di RNA messaggero, molecole facilmente deperibili e oltremodo difficili da reperire. I risultati hanno dimostrato che una quota dei difetti di splicing a carico del gene *NF1* è costituita da mutazioni che mappano al di fuori dei siti canonici di splicing.

Un'altra parte dello studio ha riguardato l'analisi del ruolo del gene *NF1* in diversi tipi tumorali: MPNST *NF1*-associati, MPNST sporadici e cancro coloretale sporadico. Per quanto riguarda gli MPNST, i risultati ottenuti contribuiscono all'individuazione di una "firma molecolare" che distingue le due tipologie di tumore (*NF1*-associati e sporadici). A

questo scopo nel nostro laboratorio sono in corso esperimenti di SNP array, estesi all'intero genoma, per l'analisi delle perdite di eterozigotità e per l'individuazione di marcatori molecolari (SNP e CNV) di entrambi i tipi di MPNST.

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di cancro coloretale sporadico hanno infine permesso di definire per la prima volta in un'ampia casistica, il ruolo di alcuni geni del pathway di Ras nella genesi di questo tumore.

## Publicazioni

*Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors.* Bottillo I, Ahlquist T, Brekke H, Danielsen SA, van den Berg E, Mertens F, Lothe RA, Dallapiccola B. *J Pathol.* 2009 Apr;217(5):693-701.

*Array-based comparative genomic hybridization in early-stage mycosis fungoides: recurrent deletion of tumor suppressor genes BCL7A, SMAC/DIABLO, and RHOF.* Carbone A, Bernardini L, Valenzano F, Bottillo I, De Simone C, Capizzi R, Capalbo A, Romano F, Novelli A, Dallapiccola B, Amerio P. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008 Dec;47(12):1067-75.

*RAS signaling in colorectal carcinomas through alteration of RAS, RAF, NF1, and/or RASSF1A.* Ahlquist T, Bottillo I, Danielsen SA, Meling GI, Rognum TO, Lind GE, Dallapiccola B, Lothe RA. *Neoplasia.* 2008 Jul;10(7):680-6, 2 p following 686.

*Complex rearrangement of chromosomes 7q21.13-q22.1 confirms the ectrodactyly-deafness locus and suggests new candidate genes.* Bernardini L, Palka C, Ceccarini C, Capalbo A, Bottillo I, Mingarelli R, Novelli A, Dallapiccola B. *Am J Med Genet A.* 2008 Jan 15;146A(2):238-44.

*Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification.* De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, Divona L, Giustini S, Sinibaldi L, Novelli A, Torrente I, Schirinzi A, Dallapiccola B. *J Med Genet.* 2007 Dec;44(12):800-8.

*Clinical lumping and molecular splitting of LEOPARD and NF1/NF1-Noonan syndromes.* Sarkozy A, Schirinzi A, Lepri F, Bottillo I, De Luca A, Pizzuti A, Tartaglia M, Digilio MC, Dallapiccola B. *Am J Med Genet A.* 2007 May 1;143A(9):1009-11.

*Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene.* Bottillo I, De Luca A, Schirinzi A, Guida V, Torrente I, Calvieri S, Gervasini C, Larizza L, Pizzuti A, Dallapiccola B. BMC Med Genet. 2007 Feb 12;8:4.

*NF1 gene mutations represent the major molecular event underlying neurofibromatosis-Noonan syndrome.* De Luca A, Bottillo I, Sarkozy A, Carta C, Neri C, Bellacchio E, Schirinzi A, Conti E, Zampino G, Battaglia A, Majore S, Rinaldi MM, Carella M, Marino B, Pizzuti A, Digilio MC, Tartaglia M, Dallapiccola B. Am J Hum Genet. 2005 Dec;77(6):1092-101. Epub 2005 Oct 26.

*Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1.* De Luca A, Schirinzi A, Buccino A, Bottillo I, Sinibaldi L, Torrente I, Ciavarella A, Dottorini T, Porciello R, Giustini S, Calvieri S, Dallapiccola B. Hum Mutat. 2004 Jun;23(6):629.

## Bibliografia

- 1 Petrov D. A. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet* 2001;**17**(1):23-8.
- 2 Patrushev L. I., Minkevich I. G. The problem of the eukaryotic genome size. *Biochemistry (Mosc)* 2008;**73**(13):1519-52.
- 3 Xiao P., Vadakkepat P., Lee T. H. Context-dependent DNA coding with redundancy and introns. *IEEE Trans Syst Man Cybern B Cybern* 2008;**38**(2):331-41.
- 4 Chatterjee S., Pal J. K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 2009;**101**(5):251-62.
- 5 Richard G. F., Kerrest A., Dujon B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;**72**(4):686-727.
- 6 Sinzelle L., Izsvak Z., Ivics Z. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci* 2009;**66**(6):1073-93.
- 7 Chueh A. C., Northrop E. L., Brettingham-Moore K. H., Choo K. H., Wong L. H. LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin. *PLoS Genet* 2009;**5**(1):e1000354.
- 8 Kroutter E. N., Belancio V. P., Wagstaff B. J., Roy-Engel A. M. The RNA polymerase dictates ORF1 requirement and timing of LINE and SINE retrotransposition. *PLoS Genet* 2009;**5**(4):e1000458.
- 9 Davies W. L., Collin S. P., Hunt D. M. Adaptive gene loss reflects differences in the visual ecology of basal vertebrates. *Mol Biol Evol* 2009.
- 10 Ponting C. P., Oliver P. L., Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009;**136**(4):629-41.
- 11 Mattick J. S. The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet* 2009;**5**(4):e1000459.
- 12 Amaral P. P., Mattick J. S. Noncoding RNA in development. *Mamm Genome* 2008;**19**(7-8):454-92.
- 13 Mehler M. F., Mattick J. S. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev* 2007;**87**(3):799-823.
- 14 Henrichsen C. N., Chaignat E., Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet* 2009;**18**(R1):R1-8.
- 15 Cooper T. A., Wan L., Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell* 2009;**136**(4):777-93.
- 16 Cartegni L., Chew S. L., Krainer A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;**3**(4):285-98.
- 17 Mattick J. S., Amaral P. P., Dinger M. E., Mercer T. R., Mehler M. F. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays* 2009;**31**(1):51-9.
- 18 Pankratova E. V. [Alternative promoters and the complexity of the mammalian transcriptome]. *Mol Biol (Mosk)* 2008;**42**(3):422-33.
- 19 Delcuve G. P., Rastegar M., Davie J. R. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 2009;**219**(2):243-50.
- 20 Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 1990;**63**(4):851-59.
- 21 Bernards A. Neurofibromatosis type 1 and Ras-mediated signaling: filling in the GAPs. *Biochimica Biophysica Acta* 1995;**1242**(1):43-59.

- 22 Viskochil D. The structure and function of the NF1 gene: Molecular pathophysiology. In: Gutmann DH MM, Riccardi VM, ed. *Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis*, 3rd ed. Baltimore: John Hopkins University Press 1999:119-41.
- 23 Marchuk D. A., Saulino A. M., Tavakkol R., Swaroop M., Wallace M. R., Andersen L. B., Mitchell A. L., Gutmann D. H., Boguski M., Collins F. S. cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics* 1991;**11**(4):931-40.
- 24 Jenne DE, Tinschert S, Dorschner MO, Hameister H, Stephens K, Kehrer-Sawatzki H. Complete physical map and gene content of the human NF1 tumor suppressor region in human and mouse. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;**37**(2):111-20.
- 25 Yu H., Zhao X., Su B., Li D., Xu Y., Luo S., Xiao C., Wang W. Expression of NF1 pseudogenes. *Hum Mutat* 2005;**26**(5):487-8.
- 26 DeClue J. E., Cohen B. D., Lowy D. R. Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**(22):9914-8.
- 27 Cawthon R. M., O'Connell P., Buchberg A. M., Viskochil D., Weiss R. B., Culver M., Stevens J., Jenkins N. A., Copeland N. G., White R. 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**(4):555-65.
- 28 Li Y., O'Connell P., Breidenbach H. H., 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.
- 29 Cawthon R. M., Andersen L. B., Buchberg A. M., Xu G. F., O'Connell P., Viskochil D., Weiss R. B., Wallace M. R., Marchuk D. A., Culver M., et al. cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics* 1991;**9**(3):446-60.
- 30 Viskochil D., Cawthon R., O'Connell P., Xu G. F., Stevens J., Culver M., Carey J., White R. The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Molecular and cellular biology* 1991;**11**(2):906-12.
- 31 Wang K. C., Koprivica V., Kim J. A., Sivasankaran R., Guo Y., Neve R. L., He Z. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002;**417**(6892):941-4.
- 32 Venturin M., Moncini S., Villa V., Russo S., Bonati M. T., Larizza L., Riva P. Mutations and novel polymorphisms in coding regions and UTRs of CDK5R1 and OMG genes in patients with non-syndromic mental retardation. *Neurogenetics* 2006;**7**(1):59-66.
- 33 Lee T. K., Friedman J. M. Analysis of NF1 transcriptional regulatory elements. *Am J Med Genet A* 2005;**137**(2):130-5.
- 34 Zou MX, Butcher DT, Sadikovic B, Groves TC, Yee SP, Rodenhiser DI. Characterization of functional elements in the neurofibromatosis (NF1) proximal promoter region. *Oncogene* 2004;**23**(2):330-39.
- 35 Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Letters* 2002;**522**(1-3):71-76.
- 36 Andersen L. B., Ballester R., Marchuk D. A., Chang E., Gutmann D. H., Saulino A. M., Camonis J., Wigler M., Collins F. S. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin

- isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol Cell Biol* 1993;**13**(1):487-95.
- 37 Gutman D. H., Andersen L. B., Cole J. L., Swaroop M., Collins F. S. An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. *Hum Mol Genet* 1993;**2**(7):989-92.
- 38 Danglot G., Regnier V., Fauvet D., Vassal G., Kujas M., Bernheim A. Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. *Human molecular genetics* 1995;**4**(5):915-20.
- 39 Kaufmann D, Muller R, Kenner O, Leistner W, Hein C, Vogel W, Bartelt B. The N-terminal splice product NF1-10a-2 of the NF1 gene codes for a transmembrane segment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;**294**(2):496-503.
- 40 Skuse G. R., Cappione A. J., Sowden M., Metheny L. J., Smith H. C. The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**(3):478-85.
- 41 Martin G. A., Viskochil D., Bollag G., McCabe P. C., Crosier W. J., Haubruck H., Conroy L., Clark R., O'Connell P., Cawthon R. M., et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990;**63**(4):843-9.
- 42 Norton KK, Xu J, Gutmann DH. Expression of the neurofibromatosis I gene product, neurofibromin, in blood vessel endothelial cells and smooth muscle. *Neurobiology of Disease* 1995;**2**(1):13-21.
- 43 Vandembroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L. Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Letters* 2004;**560**(1-3):98-102.
- 44 Xu G. F., O'Connell P., Viskochil D., Cawthon R., Robertson M., Culver M., Dunn D., Stevens J., Gesteland R., White R., et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 1990;**62**(3):599-608.
- 45 Ingram D. A., Hiatt K., King A. J., Fisher L., Shivakumar R., Derstine C., Wenning M. J., Diaz B., Travers J. B., Hood A., Marshall M., Williams D. A., Clapp D. W. Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro. *J Exp Med* 2001;**194**(1):57-69.
- 46 D'Angelo I., Welti S., Bonneau F., Scheffzek K. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO reports* 2006;**7**(2):174-9.
- 47 Harrisingh M. C., Lloyd A. C. Ras/Raf/ERK signalling and NF1. *Cell Cycle* 2004;**3**(10):1255-8.
- 48 Harrisingh M. C., Perez-Nadales E., Parkinson D. B., Malcolm D. S., Mudge A. W., Lloyd A. C. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. *Embo J* 2004;**23**(15):3061-71.
- 49 Johannessen C. M., Reczek E. E., James M. F., Brems H., Legius E., Cichowski K. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**(24):8573-8.
- 50 Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;**441**(7092):424-30.
- 51 Dasgupta B., Yi Y., Chen D. Y., Weber J. D., Gutmann D. H. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Res* 2005;**65**(7):2755-60.

- 52 Cawthon R. M., Weiss R., Xu G. F., Viskochil D., Culver M., Stevens J., Robertson M., Dunn D., Gesteland R., O'Connell P., et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 1990;**62**(1):193-201.
- 53 National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis. Bethesda, Md., USA, July 13-15, 1987. *Neurofibromatosis* 1988;**1**(3):172-8.
- 54 Cnossen M. H., Moons K. G., Garssen M. P., Pasmans N. M., de Goede-Bolder A., Niermeijer M. F., Grobbee D. E. Minor disease features in neurofibromatosis type 1 (NF1) and their possible value in diagnosis of NF1 in children < or = 6 years and clinically suspected of having NF1. Neurofibromatosis team of Sophia Children's Hospital. *J Med Genet* 1998;**35**(8):624-7.
- 55 Szudek J, Birch P, Riccardi VM, Evans DG, Friedman JM. Associations of clinical features in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genetic Epidemiology* 2000;**19**(4):429-39.
- 56 Huson S. M., Harper P. S., Compston D. A. Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales. *Brain* 1988;**111** ( Pt 6):1355-81.
- 57 Hagel C., Zils U., Peiper M., Kluwe L., Gotthard S., Friedrich R. E., Zurakowski D., von Deimling A., Mautner V. F. Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol* 2007;**82**(2):187-92.
- 58 Evans D. G., Baser M. E., McGaughan J., Sharif S., Howard E., Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *Journal of medical genetics* 2002;**39**(5):311-4.
- 59 Ferner R. E., Gutmann D. H. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. *Cancer research* 2002;**62**(5):1573-7.
- 60 Friedman J. M. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *American journal of medical genetics* 1999;**89**(1):1-6.
- 61 Fahsold R., Hoffmeyer S., Mischung C., Gille C., Ehlers C., Kucukceylan N., Abdel-Nour M., Gewies A., Peters H., Kaufmann D., Buske A., Tinschert S., Nurnberg 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. *American journal of human genetics* 2000;**66**(3):790-818.
- 62 Jadayel D., Fain P., Upadhyaya M., Ponder M. A., Huson S. M., Carey J., Fryer A., Mathew C. G., Barker D. F., Ponder B. A. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature* 1990;**343**(6258):558-9.
- 63 Stephens K., Kayes L., Riccardi V. M., Rising M., Sybert V. P., Pagon R. A. Preferential mutation of the neurofibromatosis type 1 gene in paternally derived chromosomes. *Hum Genet* 1992;**88**(3):279-82.
- 64 Upadhyaya M., Ruggieri M., Maynard J., Osborn M., Hartog C., Mudd S., Penttinen M., Cordeiro I., Ponder M., Ponder B. A., Krawczak M., Cooper D. N. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Human genetics* 1998;**102**(5):591-7.
- 65 Lazaro C., Gaona A., Ainsworth P., Tenconi R., Vidaud D., Kruyer H., Ars E., Volpini V., Estivill X. Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibromatosis type 1 patients. *Hum Genet* 1996;**98**(6):696-9.
- 66 Riccardi VM, Dobson CE 2nd, Chakraborty R, Bontke C. The pathophysiology of neurofibromatosis: IX. Paternal age as a factor in the origin of new mutations. *American Journal of Medical Genetics* 1984;**18**(1):169-76.

- 67 Valero MC, Pascual-Castroviejo I, Velasco E, Moreno F, Hernandez-Chico C. Identification of de novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients. *Human Genetics* 1997;**99**(6):720-26.
- 68 Riva P., Corrado L., Natacci F., Castorina P., Wu B. L., Schneider G. H., Clementi M., Tenconi R., Korf B. R., Larizza L. NF1 microdeletion syndrome: refined FISH characterization of sporadic and familial deletions with locus-specific probes. *American journal of human genetics* 2000;**66**(1):100-9.
- 69 De Raedt T., Brems H., Wolkenstein P., Vidaud D., Pilotti S., Perrone F., Mautner V., Frahm S., Sciort R., Legius E. Elevated risk for MPNST in NF1 microdeletion patients. *American journal of human genetics* 2003;**72**(5):1288-92.
- 70 Dorschner M. O., Sybert V. P., Weaver M., Pletcher B. A., Stephens K. NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Human molecular genetics* 2000;**9**(1):35-46.
- 71 Lopez-Correa C., Dorschner M., Brems H., Lazaro C., Clementi M., Upadhyaya M., Dooijes D., Moog U., Kehrer-Sawatzki H., Rutkowski J. L., Fryns J. P., Marynen P., Stephens K., Legius E. Recombination hotspot in NF1 microdeletion patients. *Human molecular genetics* 2001;**10**(13):1387-92.
- 72 Steinmann K., Cooper D. N., Kluwe L., Chuzhanova N. A., Senger C., Serra E., Lazaro C., Gilaberte M., Wimmer K., Mautner V. F., Kehrer-Sawatzki H. Type 2 NF1 deletions are highly unusual by virtue of the absence of nonallelic homologous recombination hotspots and an apparent preference for female mitotic recombination. *Am J Hum Genet* 2007;**81**(6):1201-20.
- 73 Rasmussen S. A., Colman S. D., Ho V. T., Abernathy C. R., Arn P. H., Weiss L., Schwartz C., Saul R. A., Wallace M. R. Constitutional and mosaic large NF1 gene deletions in neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* 1998;**35**(6):468-71.
- 74 Sawada S., Florell S., Purandare S. M., Ota M., Stephens K., Viskochil D. Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. *Nat Genet* 1996;**14**(1):110-2.
- 75 Serra E., Puig S., Otero D., Gaona A., Kruyer H., Ars E., Estivill X., Lazaro C. Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas. *Am J Hum Genet* 1997;**61**(3):512-9.
- 76 Devilee P., Cleton-Jansen A. M., Cornelisse C. J. Ever since Knudson. *Trends Genet* 2001;**17**(10):569-73.
- 77 John AM, Ruggieri M, Ferner R, Upadhyaya M. A search for evidence of somatic mutations in the NF1 gene. *Journal of Medical Genetics* 2000;**37**(1):44-49.
- 78 Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;**68**(4):820-3.
- 79 Eisenbarth I., Beyer K., Krone W., Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *American journal of human genetics* 2000;**66**(2):393-401.
- 80 De Raedt T., Maertens O., Chmara M., Brems H., Heyns I., Sciort R., Majounie E., Upadhyaya M., De Schepper S., Speleman F., Messiaen L., Vermeesch J. R., Legius E. Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: Comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;**45**(10):893-904.
- 81 Maertens O., Brems H., Vandesompele J., De Raedt T., Heyns I., Rosenbaum T., De Schepper S., De Paepe A., Mortier G., Janssens S., Speleman F., Legius E., Messiaen L. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat* 2006;**27**(10):1030-40.
- 82 Hall J. G. Review and hypotheses: somatic mosaicism: observations related to clinical genetics. *Am J Hum Genet* 1988;**43**(4):355-63.

- 83 Colman S. D., Rasmussen S. A., Ho V. T., Abernathy C. R., Wallace M. R. Somatic mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 1996;**58**(3):484-90.
- 84 Kehrer-Sawatzki H., Cooper D. N. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes? *J Med Genet* 2008;**45**(10):622-31.
- 85 Maertens O., De Schepper S., Vandesompele J., Brems H., Heyns I., Janssens S., Speleman F., Legius E., Messiaen L. Molecular dissection of isolated disease features in mosaic neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 2007;**81**(2):243-51.
- 86 Moss C., Green S. H. What is segmental neurofibromatosis? *Br J Dermatol* 1994;**130**(1):106-10.
- 87 Schultz E. S., Kaufmann D., Tinschert S., Schell H., von den Driesch P., Schuler G. Segmental neurofibromatosis. *Dermatology* 2002;**204**(4):296-7.
- 88 Tinschert S., Naumann I., Stegmann E., Buske A., Kaufmann D., Thiel G., Jenne D. E. Segmental neurofibromatosis is caused by somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Eur J Hum Genet* 2000;**8**(6):455-9.
- 89 Consoli C., Moss C., Green S., Balderson D., Cooper D. N., Upadhyaya M. Gonosomal mosaicism for a nonsense mutation (R1947X) in the NF1 gene in segmental neurofibromatosis type 1. *J Invest Dermatol* 2005;**125**(3):463-6.
- 90 Vandenbroucke I., van Doorn R., Callens T., Cobben J. M., Starink T. M., Messiaen L. Genetic and clinical mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *Hum Genet* 2004;**114**(3):284-90.
- 91 Messiaen L. M., Callens T., Mortier G., Beysen D., Vandenbroucke I., Van Roy N., Speleman F., Paepe A. D. 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**(6):541-55.
- 92 Heim R. A., Kam-Morgan L. N., Binnie C. G., Corns D. D., Cayouette M. C., Farber R. A., Aylsworth A. S., Silverman L. M., Luce M. C. Distribution of 13 truncating mutations in the neurofibromatosis 1 gene. *Human molecular genetics* 1995;**4**(6):975-81.
- 93 Origone P., De Luca A., Bellini C., Buccino A., Mingarelli R., Costabel S., La Rosa C., Garre C., Coviello D. A., Ajmar F., Dallapiccola B., Bonioli E. Ten novel mutations in the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in Italian patients. *Human mutation* 2002;**20**(1):74-5.
- 94 De Luca A., Buccino A., Gianni D., Mangino M., Giustini S., Richetta A., Divona L., Calvieri S., Mingarelli R., Dallapiccola B. NF1 gene analysis based on DHPLC. *Human mutation* 2003;**21**(2):171-2.
- 95 De Luca A., Schirinzi A., Buccino A., Bottillo I., Sinibaldi L., Torrente I., Ciavarella A., Dottorini T., Porciello R., Giustini S., Calvieri S., Dallapiccola B. Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat* 2004;**23**(6):629.
- 96 Stumpf D. A., Alksne J. F., Annegers J. F., Brown S. S., Conneally P. M., Housman D., Leppert M. F., Miller J. P., Moss M. L., Pileggi A. J., Rapin I., Strohmman R. C., Swanson L. W., Zimmerman A. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Archives of neurology* 1988;**45**(5):575-8.
- 97 Han S. S., Cooper D. N., Upadhyaya M. N. Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Human genetics* 2001;**109**(5):487-97.
- 98 Upadhyaya M., Huson S. M., Davies M., Thomas N., Chuzhanova N., Giovannini S., Evans D. G., Howard E., Kerr B., Griffiths S., Consoli C., Side L., Adams D.,

- Pierpont M., Hachen R., Barnicoat A., Li H., Wallace P., Van Biervliet J. P., Stevenson D., Viskochil D., Baralle D., Haan E., Riccardi V., Turnpenny P., Lazaro C., Messiaen L. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *American journal of human genetics* 2007;**80**(1):140-51.
- 99 Petek E., Jenne D. E., Smolle J., Binder B., Lasinger W., Windpassinger C., Wagner K., Kroisel P. M., Kehrer-Sawatzki H. Mitotic recombination mediated by the JJAZF1 (KIAA0160) gene causing somatic mosaicism and a new type of constitutional NF1 microdeletion in two children of a mosaic female with only few manifestations. *J Med Genet* 2003;**40**(7):520-5.
- 100 Kehrer-Sawatzki H., Kluwe L., Sandig C., Kohn M., Wimmer K., Krammer U., Peyrl A., Jenne D. E., Hansmann I., Mautner V. F. High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JJAZ1 gene. *American journal of human genetics* 2004;**75**(3):410-23.
- 101 Wimmer K., Yao S., Claes K., Kehrer-Sawatzki H., Tinschert S., De Raedt T., Legius E., Callens T., Beiglbock H., Maertens O., Messiaen L. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes, chromosomes & cancer* 2006;**45**(3):265-76.
- 102 Gutmann D. H., Giovannini M. Mouse models of neurofibromatosis 1 and 2. *Neoplasia (New York, NY)* 2002;**4**(4):279-90.
- 103 Tassabehji M., Strachan T., Sharland M., Colley A., Donnai D., Harris R., Thakker N. Tandem duplication within a neurofibromatosis type 1 (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome. *American journal of human genetics* 1993;**53**(1):90-5.
- 104 Lazaro C., Gaona A., Lynch M., Kruyer H., Ravella A., Estivill X. Molecular characterization of the breakpoints of a 12-kb deletion in the NF1 gene in a family showing germ-line mosaicism. *Am J Hum Genet* 1995;**57**(5):1044-9.
- 105 Lazaro C., Ravella A., Gaona A., Volpini V., Estivill X. Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *N Engl J Med* 1994;**331**(21):1403-7.
- 106 Evans J. C., Archer H. L., Whatley S. D., Clarke A. Germline mosaicism for a MECP2 mutation in a man with two Rett daughters. *Clin Genet* 2006;**70**(4):336-8.
- 107 Driscoll D. J., Migeon B. R. Sex difference in methylation of single-copy genes in human meiotic germ cells: implications for X chromosome inactivation, parental imprinting, and origin of CpG mutations. *Somat Cell Mol Genet* 1990;**16**(3):267-82.
- 108 Haines T. R., Rodenhiser D. I., Ainsworth P. J. Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development. *Dev Biol* 2001;**240**(2):585-98.
- 109 Dib C., Faure S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;**380**(6570):152-4.
- 110 Colapietro P., Gervasini C., Natacci F., Rossi L., Riva P., Larizza L. NF1 exon 7 skipping and sequence alterations in exonic splice enhancers (ESEs) in a neurofibromatosis 1 patient. *Hum Genet* 2003;**113**(6):551-4.
- 111 Wimmer K., Eckart M., Stadler P. F., Rehder H., Fonatsch C. Three different premature stop codons lead to skipping of exon 7 in neurofibromatosis type I patients. *Hum Mutat* 2000;**16**(1):90-1.
- 112 Zatkova A., Messiaen L., Vandenbroucke I., Wieser R., Fonatsch C., Krainer A. R., Wimmer K. Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of

- exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Hum Mutat* 2004;**24**(6):491-501.
- 113 Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M. J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B. A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G. J., Bigner D. D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J. W., Leung S. Y., Yuen S. T., Weber B. L., Seigler H. F., Darrow T. L., Paterson H., Marais R., Marshall C. J., Wooster R., Stratton M. R., Futreal P. A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;**417**(6892):949-54.
- 114 De Luca A., Bottillo I., Dasdia M. C., Morella A., Lanari V., Bernardini L., Divona L., Giustini S., Sinibaldi L., Novelli A., Torrente I., Schirinzi A., Dallapiccola B. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet* 2007;**44**(12):800-8.
- 115 Upadhyaya M., Kluwe L., Spurlock G., Monem B., Majounie E., Mantripragada K., Ruggieri M., Chuzhanova N., Evans D. G., Ferner R., Thomas N., Guha A., Mautner V. Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). *Hum Mutat* 2008;**29**(1):74-82.
- 116 Holtkamp N., Atallah I., Okuducu A. F., Mucha J., Hartmann C., Mautner V. F., Friedrich R. E., Mawrin C., von Deimling A. MMP-13 and p53 in the progression of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neoplasia* 2007;**9**(8):671-7.
- 117 Birindelli S., Perrone F., Oggionni M., Lavarino C., Pasini B., Vergani B., Ranzani G. N., Pierotti M. A., Pilotti S. Rb and TP53 pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001;**81**(6):833-44.
- 118 Legius E., Dierick H., Wu R., Hall B. K., Marynen P., Cassiman J. J., Glover T. W. TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 1994;**10**(4):250-5.
- 119 Lothe R. A., Smith-Sorensen B., Hektoen M., Stenwig A. E., Mandahl N., Saeter G., Mertens F. Biallelic inactivation of TP53 rarely contributes to the development of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 2001;**30**(2):202-6.
- 120 Fackler M. J., McVeigh M., Mehrotra J., Blum M. A., Lange J., Lapidus A., Garrett E., Argani P., Sukumar S. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 2004;**64**(13):4442-52.
- 121 Offman J., Gascoigne K., Bristow F., Macpherson P., Bignami M., Casorelli I., Leone G., Pagano L., Sica S., Halil O., Cummins D., Banner N. R., Karran P. Repeated sequences in CASPASE-5 and FANCD2 but not NF1 are targets for mutation in microsatellite-unstable acute leukemia/myelodysplastic syndrome. *Mol Cancer Res* 2005;**3**(5):251-60.
- 122 Cawkwell L., Lewis F. A., Quirke P. Frequency of allele loss of DCC, p53, RBI, WT1, NF1, NM23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1994;**70**(5):813-8.
- 123 Ball E. V., Stenson P. D., Abeysinghe S. S., Krawczak M., Cooper D. N., Chuzhanova N. A. Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum Mutat* 2005;**26**(3):205-13.

- 124 Cacev T., Radosevic S., Spaventi R., Pavelic K., Kapitanovic S. NF1 gene loss of heterozygosity and expression analysis in sporadic colon cancer. *Gut* 2005;**54**(8):1129-35.
- 125 Macheiner D., Gauglhofer C., Rodgarkia-Dara C., Grusch M., Brachner A., Bichler C., Kandioler D., Sutterluty H., Mikulits W., Schulte-Hermann R., Grasl-Kraupp B. NORE1B is a putative tumor suppressor in hepatocarcinogenesis and may act via RASSF1A. *Cancer Res* 2009;**69**(1):235-42.
- 126 Geli J., Kiss N., Lanner F., Foukakis T., Natalishvili N., Larsson O., Kogner P., Hoog A., Clark G. J., Ekstrom T. J., Backdahl M., Farnebo F., Larsson C. The Ras effectors NORE1A and RASSF1A are frequently inactivated in pheochromocytoma and abdominal paraganglioma. *Endocr Relat Cancer* 2007;**14**(1):125-34.
- 127 Lazcoz P., Munoz J., Nistal M., Pestana A., Encio I., Castresana J. S. Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and CASP8 in neuroblastoma. *BMC Cancer* 2006;**6**:254.

Desidero rivolgere un sentito ringraziamento al  
Prof. Bruno Dallapiccola  
che mi ha dato l'opportunità di realizzare questa tesi

Ringrazio inoltre le Dott.sse Isabella Torrente, Annalisa Schirinzi, Valentina Lanari,  
Valentina Pinna, Monia Magliozzi, il Dott. Alessandro De Luca e tutti gli amici dell'Istituto  
CSS-Mendel per il loro prezioso aiuto

Un particolare ringraziamento va a Lorenzo con cui ho condiviso gli anni di Dottorato,  
perché insieme abbiamo seguito con tenacia passioni e aspirazioni comuni

Un grazie a Danilo e ai miei familiari  
che mi hanno sempre motivata, ascoltata, sopportata e sostenuta