



PROGETTO SULLE ESOSTOSI MULTIPLE EREDITARIE

Dott. Leonardo D'Agruma

Servizio di Genetica Medica - Dipartimento dell'Età Evolutiva

IRCCS Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza"

San Giovanni Rotondo (FG)

ROMA 13-03-10

**DIAGNOSTICA MOLECOLARE ESOSTOSI MULTIPLE
(SAN GIOVANNI ROTONDO)
SITUAZIONE ATTUALE
Periodo 2007-2010**

Famiglie studiate: 48

Mutazioni identificate: 37 (78%)

26 Mutazioni in EXT1 + 11 Mutazioni in EXT2

31 mutazioni già conosciute

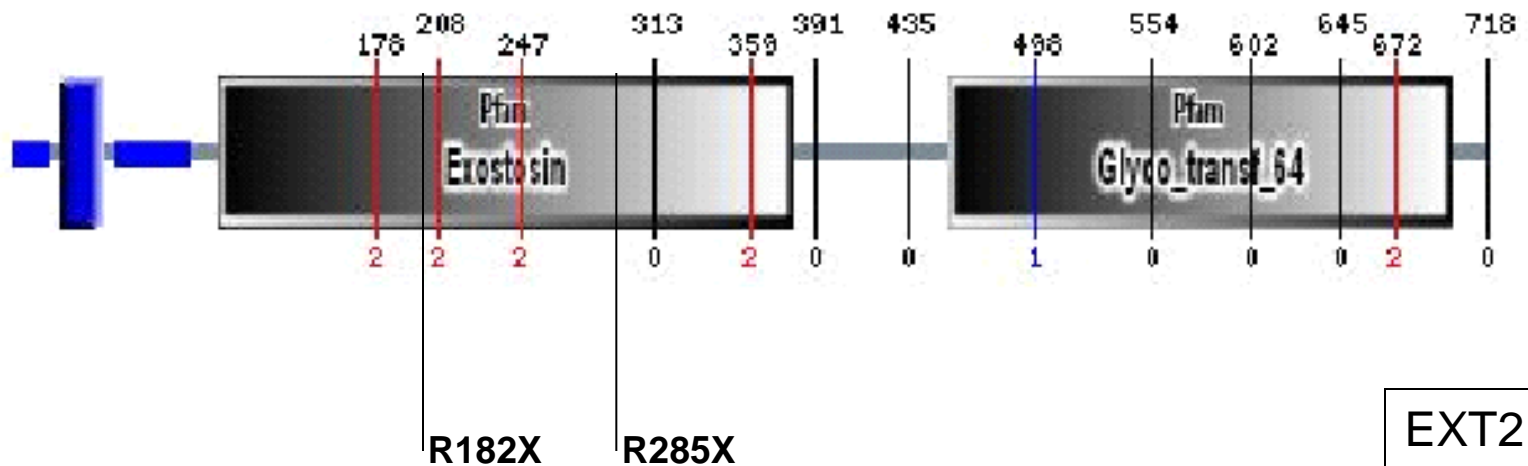
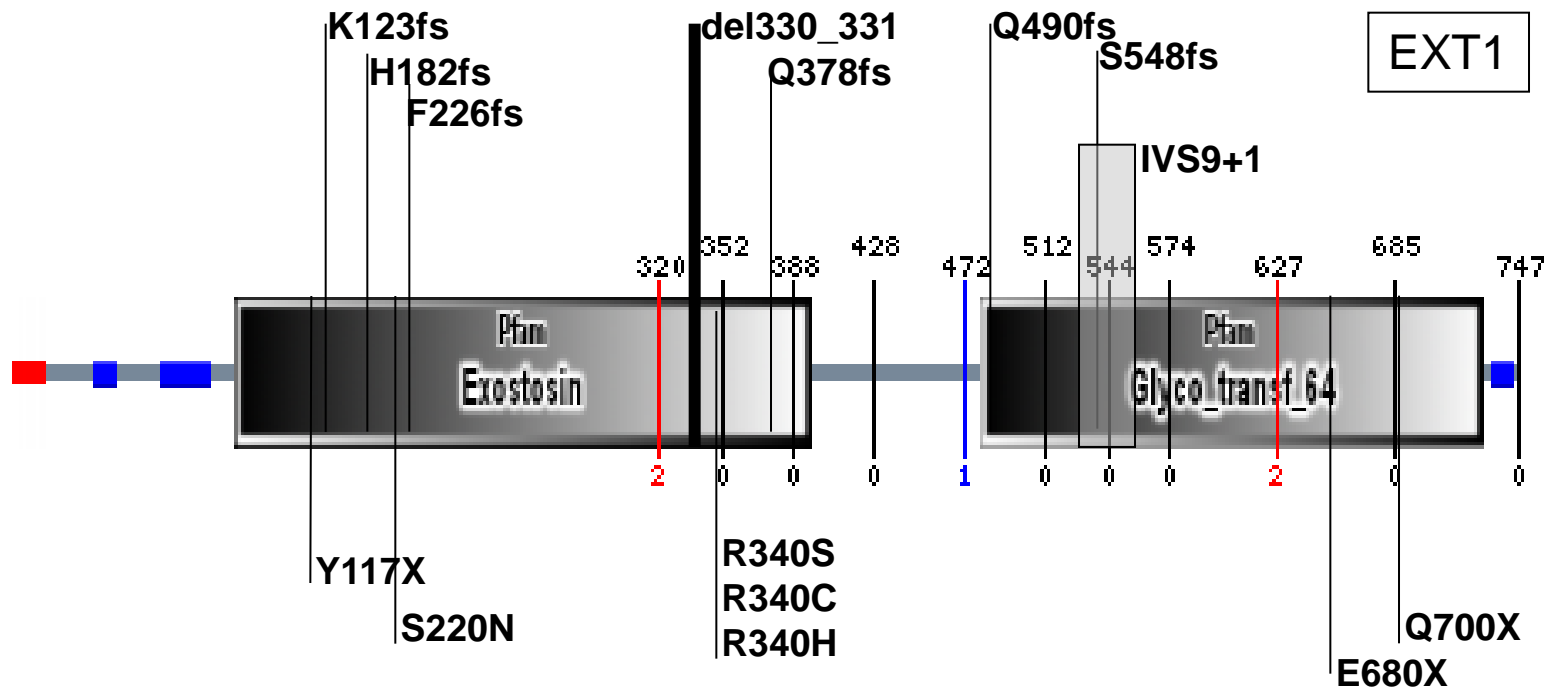
6 mutazioni nuove

69% mutazioni frameshift o nonsense

31% mutazioni missense

Tecniche utilizzate: PCR, Sequenziamento DNA ed MLPA

Frameshift	Codon change	Gene	Exon
c.369_370delAG	K123KfsX187	EXT1	1
c.546delC	H182HfsX191	EXT1	1
c.1468_1455del8	Q490TfsX110	EXT1	1
c.678delC	F226FfsX251	EXT1	1
c.968_974del7	p.330_331delNA	EXT1	2
c.1163_1164delAG	Q378HfsX389	EXT1	3
c.1644delC	S548SfsX620	EXT1	8
Missense			
c.1018C>A	R340S	EXT1	1
c.1018C>T	R340C	EXT1	1
c.1019G>A	R340H	EXT1	1
c.659G>A	S220N	EXT1	1
Nonsense			
c.351C>A	Y117X	EXT1	1
c.2038G>T	E680X	EXT1	10
c.2098C>T	Q700X	EXT1	11
c.544C>T	R182X	EXT2	3
c.853A>T	K285X	EXT2	5
Splicing			
c.1722+1G>A	p.545_574del30	EXT1	IVS8/skip EX8



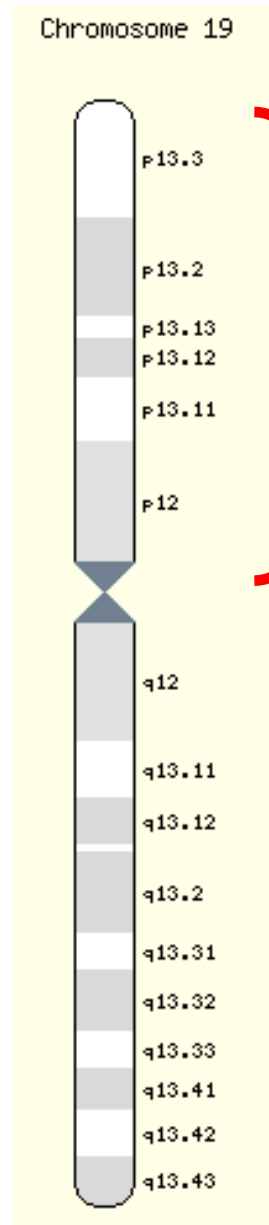
PROSPETTIVE FUTURE (Laterina 14-03-2009)

- Identificazione del terzo gene malattia nelle famiglie senza mutazioni nei geni EXT1 ed EXT2 (20 % dei casi familiari non risolti).
- Studio funzionale di mutazioni nei geni EXT1 ed EXT2 per comprendere i meccanismi molecolari alla base del difetto.
- Migliore comprensione dei processi della crescita ossea: differenziazione prematura dei condrociti che porta alla formazione delle esostosi.
- Sviluppo di modelli animali al fine di studiare le possibili correlazioni genotipo-fenotipo.

Progetto sulle Esostosi Multiple Ereditarie

- **Ricerca terzo gene responsabile di esostosi multiple.**

La ricerca del terzo gene avverrà attraverso una tecnica innovativa che si chiama Array-CGH. Tale tecnica permette di evidenziare nel genoma umano dei microriarrangiamenti cromosomici non evidenziabili con le normali tecniche citogenetiche. In particolare il DNA del paziente viene analizzato in maniera dettagliata con l'utilizzo di 2.700.000 marcatori molecolari (Affymetrix-Cyto 2) distribuiti sui vari cromosomi umani. Poiché dai dati della letteratura si evince che il terzo gene è localizzato sul braccio corto del cromosoma 19, si presterà particolare attenzione a questo cromosoma al fine di identificare i marcatori molecolari che definiscono la regione in cui si può trovare il gene candidato (studi di linkage). In seguito, attraverso studi di omologia e funzione genica, si procederà all'analisi dei geni candidati, individuando uno o due geni di interesse e sequenziando i pazienti negativi per EXT1 ed EXT2. Tale tecnica utilizzata potrebbe fornirci un'altra importante informazione. Essa potrebbe farci sapere se, oltre al cromosoma 19, c'è qualche altra zona del nostro genoma potenzialmente coinvolta nell'insorgenza delle esostosi multiple.



...ed EXT3 ?

**Possibile localizzazione gene EXT3
(Studi di linkage)**

Progetto sulle Esostosi Multiple Ereditarie

- **Analisi funzionale di mutazioni identificate.**

In questa parte del progetto saranno prese in considerazione diverse mutazioni già identificate nei geni EXT1 ed EXT2. In particolare verranno studiate mutazioni di splicing che potrebbero influenzare il normale processo di assemblaggio delle due proteine. Tale studio sarà eseguito su RNA dei pazienti portatori di tali mutazioni. Verrà eseguita un'analisi dei trascritti mediante retrotrascrizione dell'RNA e sequenziamento del cDNA ottenuto. Questa parte dello studio servirà per fornire maggiori informazioni riguardo la patogenicità di alcune mutazioni. Sono già in corso presso il nostro laboratorio alcuni studi di questo tipo.

ANALISI FUNZIONALI DI MUTAZIONI IDENTIFICATE

Sono attualmente in corso saggi funzionali sulle mutazioni EXT1 e EXT2 identificate in collaborazione con

Dr. John A. Di Battista and Casimiro Gerarduzzi
Division of Rheumatology and Clinical Immunology
Royal Victoria Hospital
McGill University Health Centre
MONTREAL, QC, CANADA

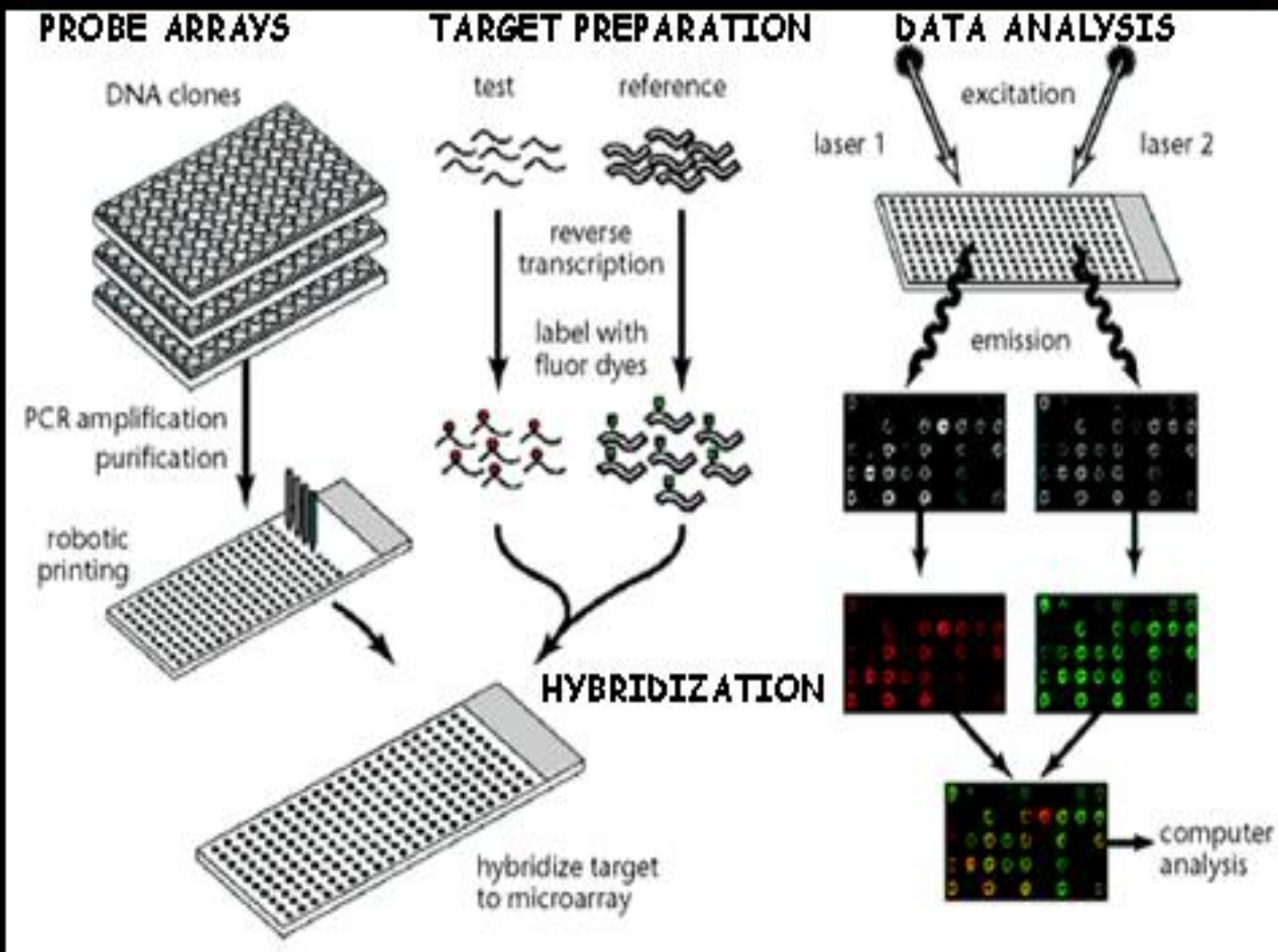
- 1) Le varie proteine mutanti saranno fatte esprimere in fibroblasti e colture primarie di condrociti.
- 2) Si indagherà se le mutazioni individuate alterano la localizzazione delle proteine nel reticolo endoplasmico.

Progetto sulle Esostosi Multiple Ereditarie

- **Ricerca CNV e modulazione del fenotipo.**

Poiché non è possibile al momento stabilire con esattezza una correlazione genotipo-fenotipo sia per le mutazioni in EXT1 che per le mutazioni in EXT2, in questa parte del progetto saranno presi in considerazione alcuni pazienti con mutazioni in EXT1 o in EXT2 di cui si sappia l'esatta localizzazione anatomica delle esostosi. In particolare verranno studiati pazienti non imparentati tra di loro ed omogenei dal punto di vista genetico aventi lo stesso tipo di mutazione nello stesso gene che presentano però esostosi in parti diverse del corpo. Tali pazienti saranno analizzati tramite Array-CGH per valutare se nel nostro DNA sono presenti delle Copy Number Variation che possono modulare il fenotipo clinico e l'espressività clinica della malattia. Tali anomalie, che consistono in particolar modo nella alterazione del numero di copie di una determinata regione cromosomica, possono essere normalmente presenti nella popolazione generale (Copy Number Variations, CNVs) o comparire de novo in soggetti affetti da patologie genetiche (Copy Number Abnormalities, CNAs o rare CNVs). Tali CNV possono essere innocenti, vale a dire non causative di malattia, possono modulare il fenotipo e l'espressività clinica di alcune malattie o possono essere causative di malattia.

DNA MICROARRAY EXPERIMENT



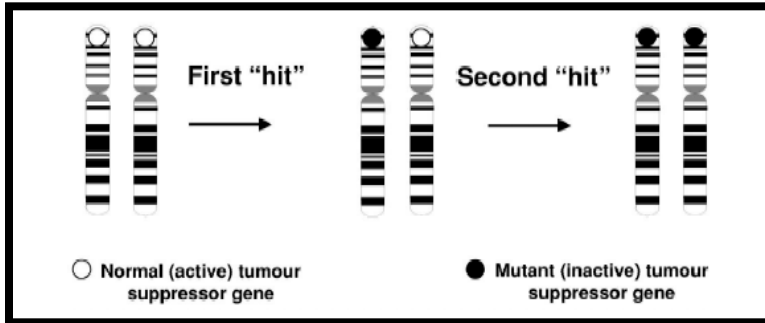
Progetto sulle Esostosi Multiple Ereditarie

- **Studio di mutazioni somatiche ed LOH su pezzi operatori.**

In questa ultima fase del progetto verranno studiate su tessuto osseo mutazioni somatiche dei geni EXT1 ed EXT2 ed LOH (Loss of Heterozigosity) al fine di confermare il ruolo di tumor suppressor genes dei due geni noti ed il modello “double-hit” dell’insorgenza delle esostosi multiple.

ALTERAZIONI DEI GENI EXT1 ed EXT2

Double somatic inactivation

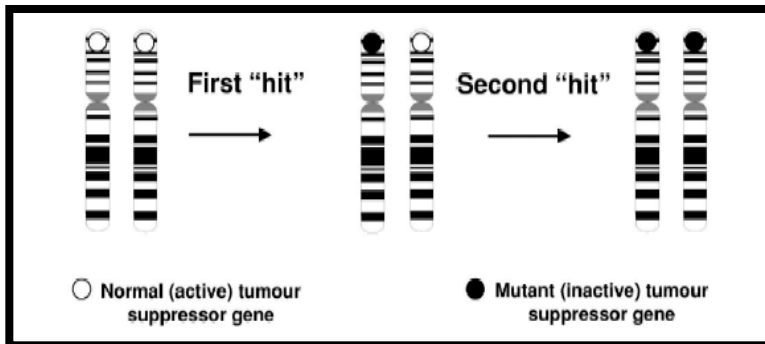


Forme sporadiche di:

OSTEOCONDROMA

ESOSTOSI ISOLATE NON FAMILIARI

Germline+Somatic inactivation



ESOSTOSI MULTIPLE EREDITARIE (HME)

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

e per il vostro sostegno.....!