

CENTRO FIBROSI CISTICA
Ospedale Civile Maggiore - Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

Servizio Aggregato

Laboratorio di Patologia Molecolare tel 045/807.2364
fax 045/807.2840

Verona, 21 dicembre 2004

Al Presidente AISS
Sig. Aurelio Lococo

P/C Al Dott. Marco Cipolli

AI Direttore
del Centro Fibrosi Cistica Prof Baroukh M Assael

AI Responsabile
del Laboratorio di Patologia Molecolare Dott. Giulio
Cabrinì

Egregio Sig. A. Lococo,

Le inviamo il progetto di ricerca per il biennio 2005 – 2006, con il preventivo di spesa che sottoponiamo all'AISS per un finanziamento.

I responsabili
Dott.ssa Elena Nicolis

Dott. Alberto Bonizzato

Visto:
Il Direttore del Centro Fibrosi Cistica
Prof. Baroukh M. Assael

Titolo: Analisi genetica della sindrome di Shwachman

Responsabili del progetto: dott.ssa Elena Nicolis e dott. Alberto Bonizzato.
Istituzione: Azienda Ospedaliera ‘Istituti Ospitalieri di Verona’, Centro Regionale Fibrosi Cistica (Direttore Prof. B.M. Assael); Laboratorio di Patologia Molecolare (Responsabile Dott. Giulio Cabrini).

Collaborazioni: Dott. Marco Cipolli e Dott.ssa Antonella Delmarco (Azienda Ospedaliera di Verona, Centro Fibrosi Cistica); Prof Andrea Biondi e Dott.ssa Daniela Longoni (Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Milano Bicocca, Ospedale San Gerardo, Monza); Sig. Paolo Faggionato (Laboratorio di Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica)

Razionale del Progetto

La sindrome di Shwachman (SDS) è una malattia genetica rara, a trasmissione autosomica recessiva, descritta per la prima volta nel '64 da Shwachman, Bodian e Diamond (Shwachman et al., 1964; Bodian et al., 1964). La SDS è caratterizzata principalmente da ipoplasia del pancreas esocrino: i sintomi legati all'insufficienza pancreatica possono regredire con l'età e dopo i 7 anni possono, in alcuni casi, non essere più manifesti. Le alterazioni ematologiche interessano, con varie caratteristiche, quasi il 100% dei pazienti: predomina la neutropenia intermittente o persistente, l'anemia e la trombocitopenia. La scarsità e ipomobilità dei neutrofilii favoriscono infezioni, specialmente nel bambino: le principali conseguenze sono otite, broncopneumite, osteomielite, infezioni della cute e setticemie. Nel neonato si osserva un alto livello di emoglobina fetale; inoltre è stato stimato un rischio del 15-25% (Dror et al., 2002) di sviluppare degenerazioni midollari, in particolare sindromi mielodisplasiche (MDS) e leucemia mieloide acuta (AML). La bassa statura è molto frequente, probabilmente legata ad anomalie nella strutturazione delle ossa lunghe. La gran parte dei pazienti SDS raggiunge l'età adulta in ragionevoli condizioni di salute. Il problema più serio rimane quello della trasformazione midollare maligna.

Nel dicembre del 2002 il gruppo di ricerca della professoressa Rommens del Sick Children Hospital di Toronto ha pubblicato, su Nature Genetics, il lavoro (Boocock GRB et al., 2002) in cui sono descritte alcune mutazioni associate alla malattia SDS, localizzate in un gene fino a quel momento non caratterizzato e nominato gene della sindrome di Shwachman Bodian Diamond (*SBDS*).

Il gene è composto di 5 esoni, ha un trascritto di 1.6 kb e codifica per una proteina di 250 amino acidi la cui funzione non è nota, le ragioni per cui la sua mancanza o alterazione producano la complessità e la multiformità di manifestazioni non sono note.

L'incidenza della SDS, prima della scoperta del gene *SBDS*, era di circa 1 affetto ogni 100.000 bambini nati vivi (Cipolli, 2001): non è da escludere però che, con i **nuovi mezzi** diagnostici, tale frequenza sia destinata ad aumentare.

Obiettivi finora raggiunti

Il Centro Fibrosi Cistica da anni è un punto di riferimento importante per la diagnosi e cura della SDS. Il Laboratorio di Patologia Molecolare del Centro è da tempo impegnato nello studio della genetica molecolare della fibrosi cistica e dispone pertanto di esperienza e strumentazione adatte per studiare il gene *SBDS*.

Dalla scoperta del gene abbiamo iniziato l'analisi genetica in un gruppo di 15 pazienti SDS e loro genitori. Abbiamo individuato le mutazioni c.258+1T>C e c.183_184TA>CT, precedentemente scoperte e caratterizzate dal gruppo di ricercatori di Toronto: i nostri dati concordano con quelli canadesi, in cui tali mutazione sono le più frequenti. Entrambe sono dovute all'inclusione, nel gene attivo *SBDS*, di "pezzi" di uno pseudogene vicino, quasi del tutto simile al primo, ma inattivo: il meccanismo prende il nome di conversione genica. Il risultato finale, per entrambe le mutazioni, è la sintesi di una proteina *SBDS* troncata e quindi presumibilmente inattiva.

Allo scopo di completare l'analisi genetica nei pazienti non del tutto caratterizzati, ne abbiamo sequenziato i 5 esoni e le loro regioni fiancheggianti; ciò ha reso possibile l'individuazione di 4 mutazioni, 3 delle quali mai descritte precedentemente e non dovute a conversione genica: una mutazione "missense" nell'esone 1 (c.95A>G), una mutazione di "frameshift" nell'esone 3 (c.307_308delCA) e una mutazione "nonsense" nell'esone 5 (c.652C>T). La quarta mutazione ("missense" e. 101 A>T) era stata scoperta dal gruppo di Toronto.

I 30 cromosomi analizzati sono stati quindi completamente caratterizzati; lo studio è attualmente in revisione presso l'Editore di Human Mutation.

Obiettivi futuri

1 - Ci proponiamo di proseguire l'analisi genetica su altri pazienti SDS allo scopo di definire ulteriormente lo spettro di mutazioni associate alla sindrome.

2 .Allo scopo di indagare, in parte, sul meccanismo patogenetico delle diverse mutazioni, abbiamo intenzione di studiare l'RNA messaggero (mRNA) del gene *SBDS*. Per ciascuna mutazione e' possibile stabilirne gli effetti a livello di quantita e qualita' dell'mRNA rispetto alla forma normale.

3 .Si ritiene che tra i pazienti affetti da sindrome mielodisplasica (MDS), possibile complicanza della SDS, vi possano essere dei casi indagnosticati di SDS. Pertanto, ricercare nei pazienti MSD mutazioni SDS, aprirebbe una interessante strada verso la scoperta e caratterizzazione di forme atipiche di SDS.

4 .Per ciascun paziente è possibile raccogliere i **dati** cimici e confrontarli con quelli genetici: lo studio permetterebbe di verificare se esiste una correlazione genotipo-fenotipo, di cui attualmente si conosce ben poco.

Il progetto si articola in varie fasi sequenziali:

.estrazione del DNA genomico e RNA totale: si prevede la raccolta del sangue periferico dei pazienti e loro genitori, dopo consenso informato. Il sangue viene utilizzato per l'estrazione di DNA genomico e dell'RNA totale.

.Amplificazione del DNA e dell'RNA (RT-PCR): vengono utilizzati opportuni kit per l'amplificazione del DNA e dell'RNA allo scopo di analizzare le diverse regioni del gene.

.Analisi degli RFLP: gli RFLP sono i frammenti ottenuti dalla digestione enzimatica dei prodotti di PCR. L'analisi consente di individuare alcune delle mutazioni nel gene *SBDS*.

.Sequenziamento del gene *SBDS*: il Laboratorio dispone dello strumento per il sequenziamento del DNA (ABI Prism 310 Genetic Analyzer). L'analisi si rende necessaria per lo studio genetico di tutti i pazienti e genitori, allo scopo di caratterizzare con precisione il gene mutato, sia a livello di DNA genomico che di mRNA.

.Quantificazione dell'mRNA: il Laboratorio dispone dello strumento per la quantificazione dell'mRNA (GeneAmp 5700 Sequence Detection System).

Spese previste

Per la realizzazione di questo progetto si prevede, per gli anni 2005 e 2006, una spesa di 10.100 euro per:

reagenti e accessori per l'analisi PCR/RFLP: 3500 euro

reagenti e accessori per il sequenziamento: 4000 euro

reagenti e accessori per la quantificazione: 1000 euro

congressi: 1500 euro

varie: 100 euro

Bibliografia

Cipolli M. 2001. Shwachman-Diamond syndrome: clinical phenotypes. *Pancreatology* 1:543-548

Bodian M, Sheldon W, Lightwood R. 1964. Congenital hypoplasia of the exocrine pancreas. *Acta Paediat* 53:282-293

Boocock GRB, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Dune PR, Rommens JM. 2003. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 33:97-101

Dror Y, Dune P, Ginzberg H, Herman R, Banerjee R, Champagne M, Shannon K, Maikin D, Freedman MH. 2002. Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 118:701-713

Shwachman H, Diamond LK, Oski FA, Khaw KT. 1964. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *Pediatr* 65:645-663