



RICERCA DI NUOVI GENI CAUSATIVI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE E ANALISI DI INTERAZIONE PROTEICA IN SOGGETTI CON QUADRO CLINICO RICONDUCEBILE A SINDROME DI PITT-HOPKINS.

Coordinatore: Prof.ssa Marcella Zollino, Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma

Informazioni generali sulla sindrome di Pitt-Hopkins

La sindrome di Pitt-Hopkins, descritta clinicamente per la prima volta nel 1978, è caratterizzata da disabilità intellettiva, aspetto facciale caratteristico ed una serie di segni accessori, fra cui epilessia, anomalie della respirazione ed atassia. La causa è stata identificata nel 2007 e risiede nell'aploinsufficienza del gene *TCF4*, che codifica per un fattore di trascrizione contenente un dominio funzionale bHLH (basic helix-loop-helix). Le mutazioni di *TCF4* finora identificate, responsabili di sindrome di Pitt-Hopkins, includono: delezioni complete e parziali del gene, mutazioni con slittamento della cornice di lettura (frameshift), mutazioni di stop, mutazioni dei siti di splicing, mutazioni missenso coinvolgenti nella maggior parte dei casi il dominio bHLH e traslocazioni bilanciate che interrompono la sequenza codificante del gene.

Diversi aspetti devono ancora essere precisati, in particolare 1) il livello di eterogeneità genetica del fenotipo "sindrome di Pitt-Hopkins" (quanti possono essere i geni causativi?); 2) correlazioni genotipo-fenotipo intrageniche (il tipo e il livello della mutazione nel contesto del gene può modificare sensibilmente il fenotipo?); 3) le interazioni di *TCF4* con altre proteine (è definibile un *pathway* molecolare suscettibile di modulazione con farmaci?). L'implementazione della ricerca può tentativamente dare delle risposte a tutti questi quesiti.

Premessa dello studio

Una parte dei soggetti con quadro clinico "sindrome di Pitt-Hopkins" o con quadro clinico molto simile non presenta alcuna alterazione identificabile con le tradizionali metodiche diagnostiche (array-CGH; sequenziamento diretto del gene *TCF4*; analisi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) con pannello genico comprendente i geni noti responsabili di sindrome di Pitt-Hopkins/Angelman/Retts).

Un approccio di analisi NGS pan genomica (sequenziamento esomico) può implementare la diagnosi genetica di causa.

La proteina *TCF4* ha effetti sistemici in quanto regola la trascrizione di numerosi altri geni. Ma gli interattori molecolari di *TCF4* sono in larga misura sconosciuti.

La proteina *TCF4* ha diversi domini funzionali; c'è evidenza preliminare che la disfunzione di singoli domini può generare quadri clinici di diversa gravità, ma l'osservazione necessita di ampliamento, così come di accurata valutazione del fenotipo connessa al genotipo.



Il presente gruppo di ricerca è attivo da diversi anni nello studio della sindrome di Pitt-Hopkins, e rappresenta un centro di riferimento per molte strutture di genetica nazionali.

La casistica già osservata è una delle più ampie descritte nella letteratura scientifica, e ha come valore ulteriore l'analisi simultanea dei diversi individui condotta con tecniche standardizzate.

Scopo dello studio

Lo studio ha sinteticamente 3 scopi maggiori:

- 1) si propone di sviluppare un iter diagnostico più efficiente che permetta di ottenere una diagnosi molecolare nei casi con fenotipo clinico che cade nell'ambito della sindrome di Pitt-Hopkins. Metodiche di sequenziamento di nuova generazione possono ridurre il vuoto diagnostico illustrato sopra. Il raggiungimento della diagnosi genetica ha un duplice scopo di fornire lo strumento analitico per valutare il rischio di ricorrenza familiare; e di verificare se geni diversi possono agire in una rete molecolare comune, per creare le premesse per approcci terapeutici nuovi e personalizzati;
- 2) è pianificata una accurata correlazione genotipo-fenotipo nei casi con mutazione accertata nel gene *TCF4* ;
- 3) tramite analisi del trascrittoma (RNA seq) è programmata lo studio dei livelli trascrizionali di tutti i geni umani, che possono introdurre suggerimenti sulle interazioni geniche di *TCF4*.

Per il raggiungimento di questi obiettivi, è richiesto l'allestimento di linee linfoblastoidi e, dove possibile, di linee di fibroblasti cutanei ottenuti tramite biopsia.

Metodi di analisi

Lo studio si avvarrà di

- 1) tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), per l'analisi dell'intero esoma (WES, Whole Exome Sequencing). Tale metodica è già applicata presso nell'istituto di Medicina Genomica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, in accordo a protocolli standard.
- 2) analisi dell'intero trascrittoma (**RNA-seq**). Lo studio del trascrittoma sarà effettuato utilizzando la piattaforma ION TORRENT, presente nell'istituto di Medicina Genomica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, mediante il kit "Ion Total RNA-seq kit v2" della Life Technologies. L'analisi dei dati verrà effettuata mediante i software "Kallisto", per la stima delle TPM dei trascritti, "Sleuth", per l'interpretazione dei risultati e per l'analisi delle differenze di espressione dei trascritti. I risultati ottenuti saranno validati mediante RT-qPCR.

Costi

I costi del progetto di ricerca sono relativi a

- 1) Borsa di studio per biologo o biotecnologo, a tempo pieno, per 12 mesi: **13.000 Euro (lordi)**;



- 2) Materiali consumabili per tutte le tecniche sopraelencate, incluso l'allestimento di colture cellulari: **5.000 Euro. (lordi).**

Nell'ambito di spesa, il sequenziamento NGS dell'intero esoma riguarderà un numero di casi sensibilmente superiore a quelli arruolati nell'analisi di RNA Seq .

In base ai risultati preliminari, sarà oggetto di una ricerca successiva l'analisi di interazioni geniche di TCF4 tramite tecnica ChIP Seq. In particolare, mediante immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), seguita da sequenziamento NGS, si studieranno le interazioni tra la proteina TCF4 e le regioni genomiche su cui potrebbe avere alcuni effetti regolatori della trascrizione.

Modalità di finanziamento

L' Associazione Italiana Sindrome di Pitt-Hopkins effettuerà una donazione :

- All'Università Cattolica Del Sacro Cuore;
- Per "RICERCA DI NUOVI GENI CAUSATIVI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE E ANALISI DI INTERAZIONE PROTEICA IN SOGGETTI CON QUADRO CLINICO RICONDUCEBILE A SINDROME DI PITT-HOPKINS";
- Del valore dir 18.000,00 euro.

Riferimenti bibliografici

Marangi G, Ricciardi S, Orteschi D, Lattante S, Murdolo M, Dallapiccola B, Biscione C, Lecce R, Chiurazzi P, Romano C, Greco D, Pettinato R, Sorge G, Pantaleoni C, Alfei E, Toldo I, Magnani C, Bonanni P, Martinez F, Serra G, Battaglia D, Lettori D, Vasco G, Baroncini A, Daolio C, Zollino M. The Pitt-Hopkins syndrome: report of 16 new patients and clinical diagnostic criteria. *Am J Med Genet.* **2011; 155A:1536-1545.**

Marangi G, Ricciardi S, Orteschi D, Tenconi R, Monica MD, Scarano G, Battaglia D, Lettori D, Vasco G, Zollino M. Proposal of a clinical score for the molecular test for Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet.* **2012; 158A:1604-1611.**

Zweier C, de Jong EK, Zweier M, Orrico A, Ousager LB, Collins AL, Bijlsma EK, Oortveld MA, Ekici AB, Reis A, Schenck A, Rauch A. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. *Am J Hum Genet.* **2009; 85:655-666.**

Bedeschi MF, Marangi G, Calvello MR, Ricciardi S, Leone FPC, Baccarin M, Gueneri S, Orteschi D, Murdolo M, Lattante S, Frangella S, Keena B, Harr MH, Zackai E, Zollino M. Impairment of different protein domains causes variable clinical presentation within Pitt-Hopkins syndrome and suggests intragenic molecular syndromology of TCF4. *Eur J Med Genet.* **2017;60(11):565-571.**