

# Malattie genetiche: dalla diagnosi alla terapia

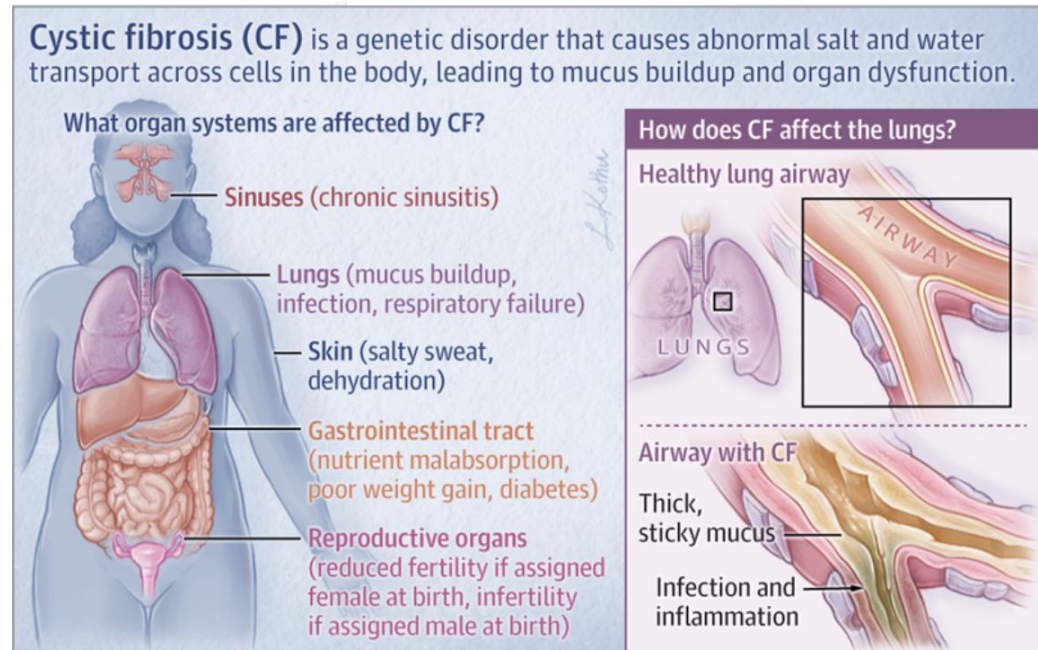
## LA FIBROSI CISTICA

*Modelli epiteliali umani per lo  
studio della fibrosi cistica*

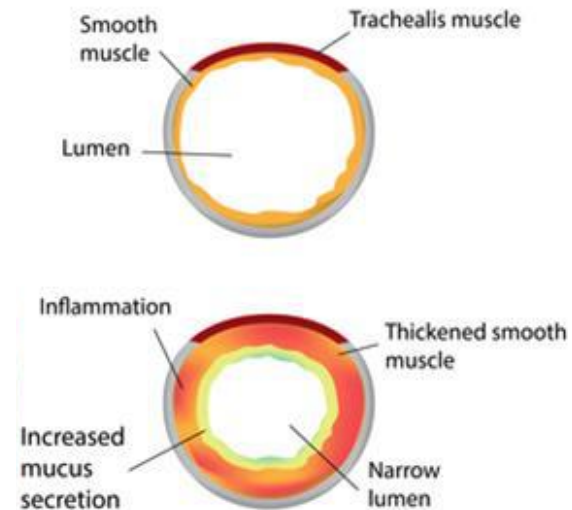
**Debora Baroni**  
Istituto di biofisica – CNR  
Genova, 27/05/2024

# FIBROSI CISTICA: GENERALITA'

- La fibrosi cistica (o mucoviscidosi) è una malattia genetica che colpisce i sistemi respiratorio, digestivo e riproduttivo
- È causata dalla produzione di muco anormalmente denso
- La malattia può portare a infezioni polmonari fatali
- Può anche provocare disfunzione del pancreas e ostruzione ai dotti biliari, ostacolando la digestione



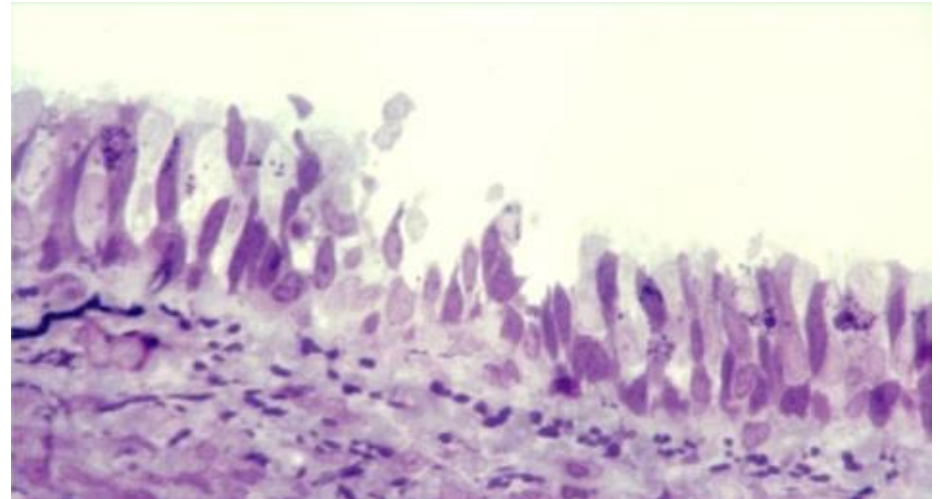
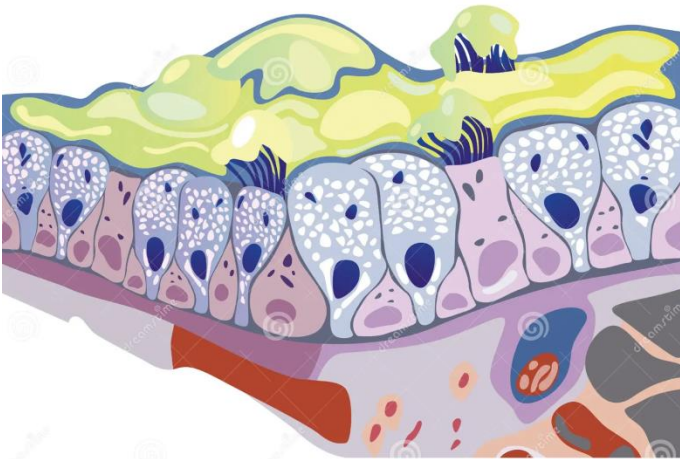
Endres, T., M. e Konstan, M., W. JAMA. 2022;327(2):191. doi:10.1001/jama.2021.23280



# FIBROSI CISTICA: SINTOMATOLOGIA

## Il muco:

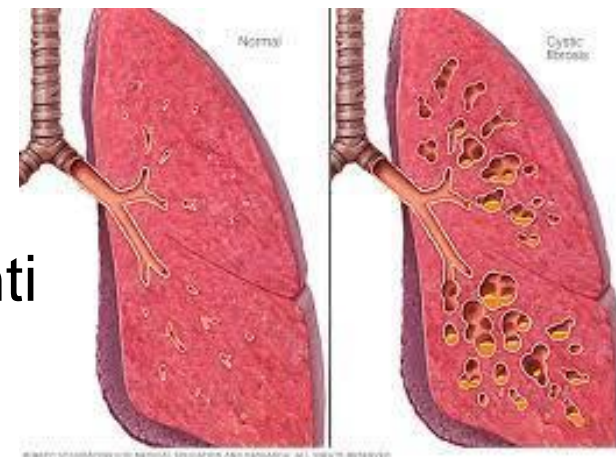
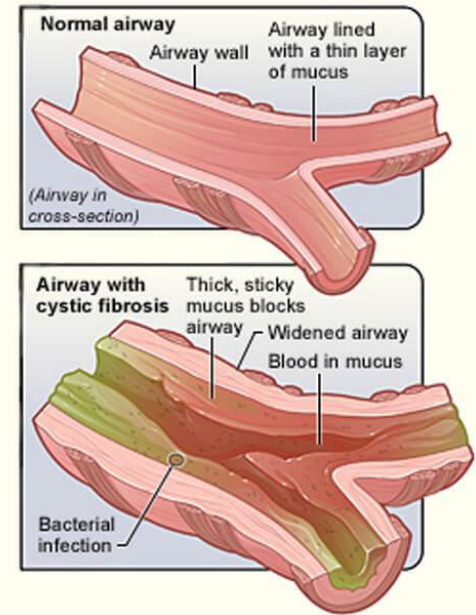
- è prodotto dalle cellule mucipare degli epitelii secernenti (come quelli che rivestono l'apparato respiratorio, digerente e riproduttivo)
- Ha azione lubrificante e protettiva delle mucose



# FIBROSI CISTICA: SINTOMATOLOGIA

Nelle persone affette da fibrosi cistica:

- il muco prodotto è anormalmente denso e appiccicoso.
- Anziché proteggere, ostruisce le vie respiratorie, causando gravi problemi respiratori
- è sede infezioni batteriche e infiammazione.
- Accumulandosi provoca danni permanenti al polmone, inclusa la formazione di tessuto cicatriziale (fibrosi) e cisti.



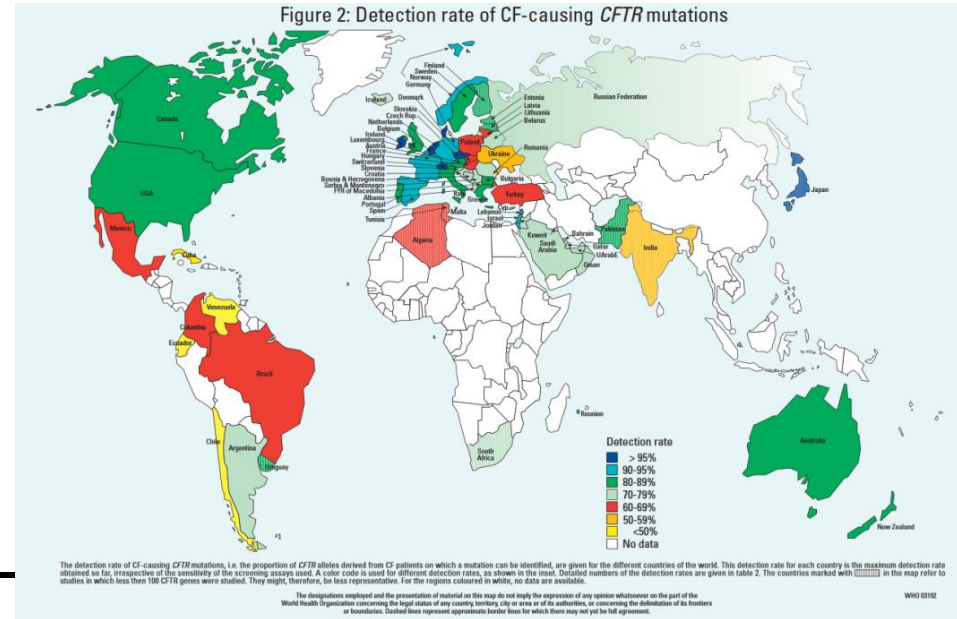
# FIBROSI CISTICA: SINTOMATOLOGIA

- La maggior parte delle persone con fibrosi cistica ha anche problemi digestivi.
- Il **pancreas esocrino** produce insulina e glucagone (ormoni che aiutano a controllare i livelli di glucosio nel sangue).
- Il **pancreas esocrino** produce enzimi digestivi.
- Nelle persone con fibrosi cistica, l'accumulo di muco denso danneggia il pancreas, compromettendone la capacità di produrre sia insulina che enzimi digestivi.
- Nell'adolescenza o nell'età adulta, una carenza di insulina può causare una forma di diabete nota come diabete mellito correlato alla fibrosi cistica (CFRDM).



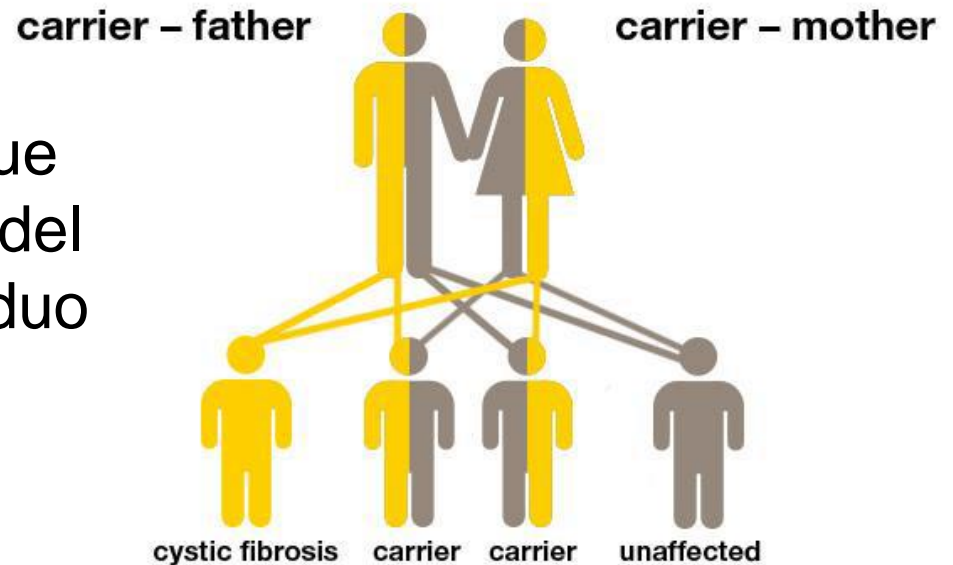
# FIBROSI CISTICA: EPIDEMIOLOGIA

- La fibrosi cistica (CF) è uno dei più comuni disordini genetici
- Colpisce circa 1 su 2500 individui di origine caucasica europea
- Tuttavia, l'incidenza è variabile nelle diverse popolazioni mondiali:
  - Nell'Unione europea 1 su 2000-3000 neonati sono affetti da CF.
  - Negli USA, l'incidenza di FC è 1 ogni 3500 nati
  - In Asia, la FC è invece più rara.



# FIBROSI CISTICA: GENETICA

- La fibrosi cistica è trasmessa come carattere autosomico recessivo (AR)
- Cioè solo dall'incrocio di due portatori vi è la probabilità del 25% di nascita di un individuo omozigote affetto.
- In Europa, circa 1 su 25 individui è portatore della mutazione



# FIBROSI CISTICA: DIAGNOSI

➤ I pazienti affetti da CF hanno una pelle molto salata: il **test del sudore** è il saggio diagnostico standard. Misura la quantità di sali nel sudore.

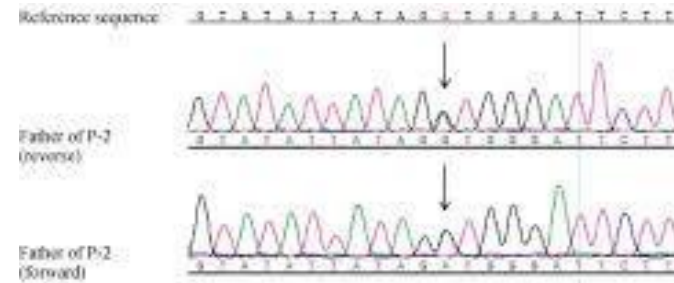
Livelli alti sono indicativi di CF.

➤ **Test genetici** su sangue determinano chi ha un gene CFTR mutato

Test genetici possono essere usati anche per diagnosticare la condizione di portatore



Chloride Concentration	Result
< 40 mmol/L	Normal
40-60 mmol/L	Borderline or indeterminate
> 60 mmol/L	Abnormal



## Test aggiuntivi:

- Test funzionali del fegato e del pancreas.
- Radiografia di torace e addome
- Ridotta secrezione di insulina tramite il monitoraggio dei livelli di glucosio nel sangue.



# FIBROSI CISTICA: DIAGNOSI MOLECOLARE

Pannello di 23 mutazioni da analizzare suggerito da ACOG (American Congress of Obstreticians and Gynecologists) e ACMG (American College of Medical Genetics)

**Table 2** CFTR Mutation Frequency in CF Patients by Ethnic Group and in a Panethnic US Population

Legacy/cDNA name/HGVS protein	Non-Hispanic white	Hispanic white	African American	Asian American	Ashkenazi Jewish	Panethnic
DelF508/c.1521_1523delCTT/p.Phe508del	72.42	54.38	44.07	38.95	31.41	66.31
G542X/c.1624G>T/p.Gly542*	2.28	5.10	1.45	0.00	7.55	2.64
G551D/c.1652G>A/p.Gly551Asp	2.25	0.56	1.21	3.15	0.22	1.93
621+1G>T/c.489+1G>T/-	1.57	0.26	1.11	0.00	0.00	1.30
W1282X/c.3846G>A/p.Trp1282*	1.50	0.63	0.24	0.00	45.92	2.20
N1303K/c.3909C>G/p.Asn1303Lys	1.27	1.66	0.35	0.76	2.78	1.27
DelI507/c.1519_1521delATC/p.Ile507del	0.88	0.68	1.87	0.00	0.22	0.90
R553X/c.1657C>T/p.Arg553*	0.87	2.81	2.32	0.76	0.00	1.21
R117H/c.350G>A/p.Arg117His	0.70	0.11	0.06	0.00	0.00	0.54
3849+10kbC>T/c.3718-2477C>T/-	0.58	1.57	0.17	5.31	4.77	0.85
1717-1G>A/c.1585-1G>A/-	0.48	0.27	0.37	0.00	0.67	0.44
2789+5G>A/c.2657+5G>A/-	0.48	0.16	0.00	0.00	0.10	0.38
R347P/c.1040G>C/p.Arg347Pro	0.45	0.16	0.06	0.00	0.00	0.36
711+1G>T/c.579+1G>T/-	0.43	0.23	0.00	0.00	0.10	0.35
R560T/c.1679G>C/p.Arg560Thr	0.38	0.00	0.17	0.00	0.00	0.30
3659delC/c.3528delC/p.Lys1177Serfs	0.34	0.13	0.06	0.00	0.00	0.28
A455E/c.1364C>A/p.Ala455Glu	0.34	0.05	0.00	0.00	0.00	0.26
G85E/c.254G>A/p.Gly85Glu	0.29	0.23	0.12	0.00	0.00	0.26
R1162X/c.3484C>T/p.Arg1162*	0.23	0.58	0.66	0.00	0.00	0.30
2184delA/c.2052delA/p.Lys684Asnfs	0.17	0.16	0.05	0.00	0.10	0.15
1898+1G>A/c.1766+1G>A/-	0.16	0.05	0.06	0.00	0.10	0.13
R334W/c.1000C>T/p.Arg334Trp	0.14	1.78	0.49	0.00	0.00	0.37
3120+1G>A/c.2988+1G>A/-	0.08	0.16	9.57	0.00	0.10	0.86
Total	88.40	71.90	64.51	48.93	94.14	84.00

Adapted and modified from Watson et al,<sup>11</sup> with permission from Nature Publishing Group (*Genetics in Medicine*, copyright 2004). CF, cystic fibrosis; CFTR, CF transmembrane conductance regulator; HGVS, Human Gene Variation Society; -, not applicable.

# FIBROSI CISTICA: DIAGNOSI MOLECOLARE

Esistono vari metodi di analisi di genetica molecolare per evidenziare la presenza di mutazioni nel gene CFTR

Table 4 Examples of Common Mutation Molecular Testing Methods for CF

Method	Advantages and limitations
Allele-specific PCR	Testing for known single-nucleotide variants. Initial setup/design must be performed carefully because mutation detection is on the basis of absence of PCR products.
Array-based testing Invader chemistry	Rapid, scalable testing for known single-nucleotide variants. Invader and primary nucleotide probe hybridize to target region, and fluorescent signal is generated in second reaction. Suitable for known single-nucleotide variants and small insertions and deletions.
Oligonucleotide ligation assay	Testing for known single-nucleotide variants. On the basis of differentially modified oligonucleotides for wild-type and variant alleles.
Mass spectrometry	Testing for unknown variants on the basis of mass size differences. Relatively expensive setup.
Sequencing	Gold standard for detection of unknown variants. Sequence variants are verified by sequencing of the opposite strand.
Multiplex ligation-dependent probe amplification	Forward and reverse probes must ligate for subsequent amplification. Used for identification of deletions and duplications of one or multiple exons, missed by most other approaches, including sequencing.
Next-generation sequencing	High output and economical on a per-base basis. Shorter reads and complex interpretation. Relatively expensive setup.

CF, cystic fibrosis.

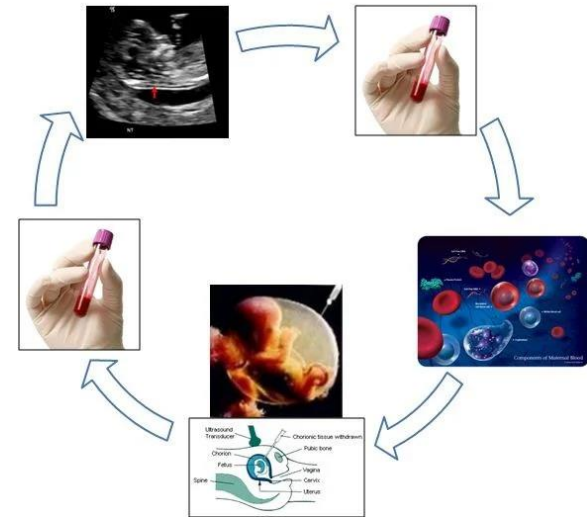
**Next generation sequencing (NGS)** si sta affermando come il metodo che meglio consente la più completa e precisa analisi delle mutazioni sia note che *de novo*

Un pannello NGS per uso diagnostico (Illumina) consente l'analisi di 139 diverse mutazioni

# FIBROSI CISTICA: DIAGNOSI PRENATALE

Durante la gravidanza, di solito è possibile una diagnosi accurata di fibrosi cistica nel feto.

**Test diagnostici prenatali** (amniocentesi, villocentesi o Non Invasive Prenatal Test, NIPT) sono fattibili in presenza di una storia familiare positiva per CF o per coppie in cui uno o entrambi i partner hanno una mutazione CF



Nel corso di fecondazione assistita, **Test genetici pre-impianto** sono praticabili, consentendo di ridurre significativamente la possibilità di trasmissione del carattere CF

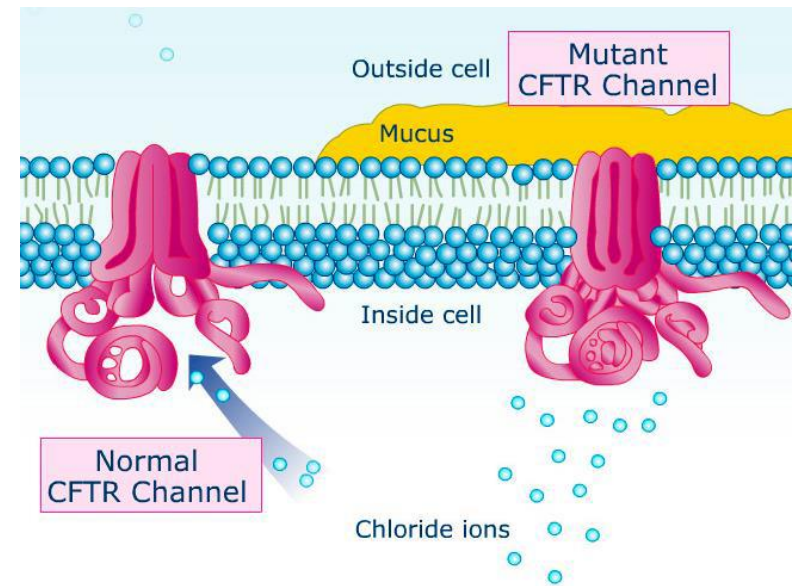
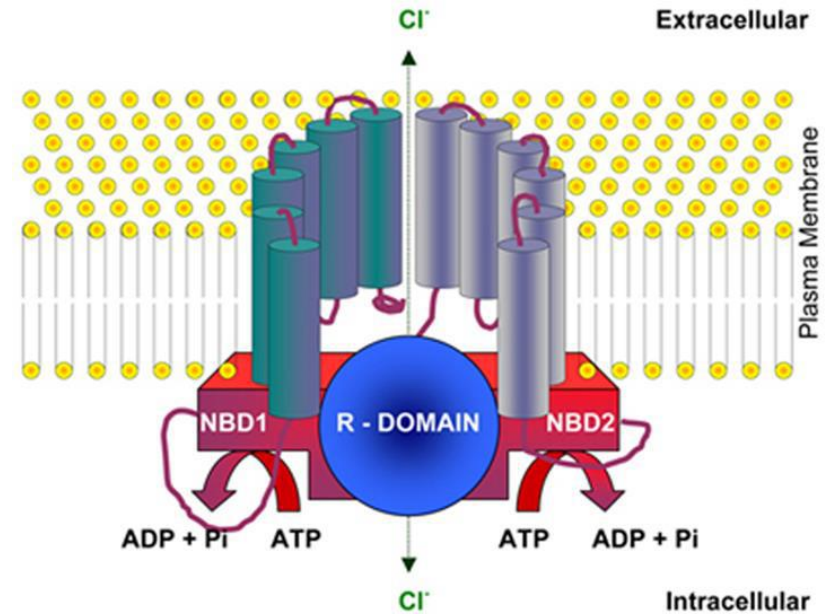
# FIBROSI CISTICA: PROGNOSI

La gravità della fibrosi cistica varia notevolmente da persona a persona

- La gravità della malattia è determinata in gran parte da **quanto i polmoni sono interessati.**
- Un tempo considerata malattia letale dell'infanzia, le prospettive sono tuttavia migliorate costantemente negli ultimi 25 anni, principalmente perché i trattamenti possono ora ritardare le patologie che colpiscono i polmoni. Tuttavia, il deterioramento è inevitabile e porta a disabilità e morte.
- Sebbene non siano note cure risolutive, i diversi trattamenti sono in grado di prolungare e migliorare la vita significativamente.
- Il numero di adulti con CF è in crescita costante nella popolazione.
- Oggi, l'età mediana in Italia è di 41,7 anni. Alcuni pazienti superano i 50/60 anni.

# FIBROSI CISTICA: FISIOPATOLOGIA

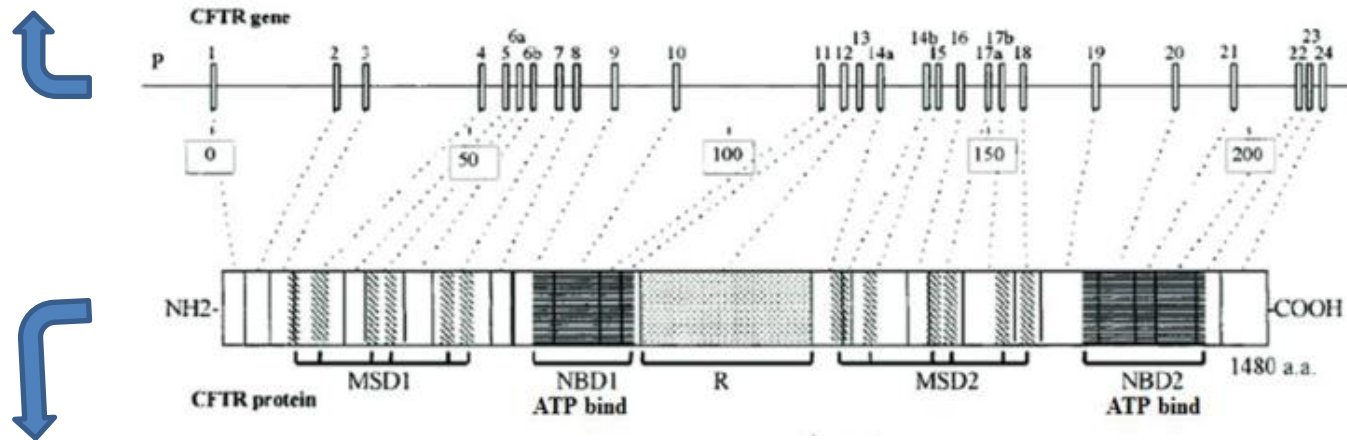
- La proteina CFTR funziona è un canale sito sulla membrana cellulare che trasporta ioni cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) fuori dalle cellule epiteliali.
- Grazie al trasporto di cloro mediato dalla CFTR si viene a creare un gradiente osmotico capace di muovere molecole di acqua.
- Il movimento di acqua fuori dalla cellula è necessario per mantenere il muco fluido e sottile



# CFTR

## IL GENE CFTR

- E' stato identificato nel 1989.
- Si trova nella regione cromosomica 7q31.2
- E' un gene di grandi dimensioni (250 kb) e contiene 27 esoni.



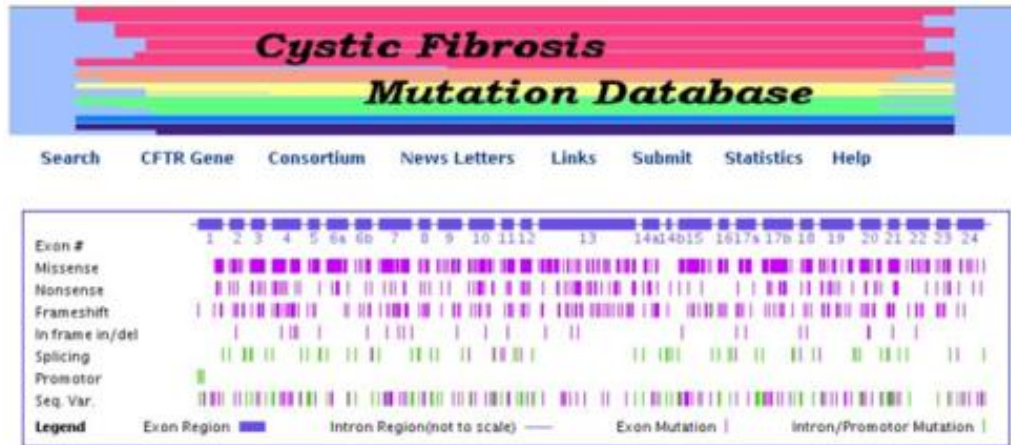
## LA PROTEINA CFTR

- E' una glicoproteina di membrana.
- E' composta da 1480 amminoacidi.
- È costituita da 5 regioni:
  - due domini transmembrana (MSDs),
  - due domini per il legame con i nucleotidi (NBDs )
  - Una regione regolatrice (Rd)

# CFTR : LE MUTAZIONI

- Oltre 2000 mutazioni ad oggi catalogate (CFTR2 database)
- La mutazione del gene CFTR più comune, p.Phe508del (storicamente chiamata **ΔF508**), rappresenta oltre il 70% delle mutazioni CF nella popolazione europea.

## CFTR mutations



Le mutazioni più comuni:

**ΔF508 70%**

**G542\* 2.4%**

**G551D 1.6%**

**N1303K 1.3%**

**W1282\* 1.2%**

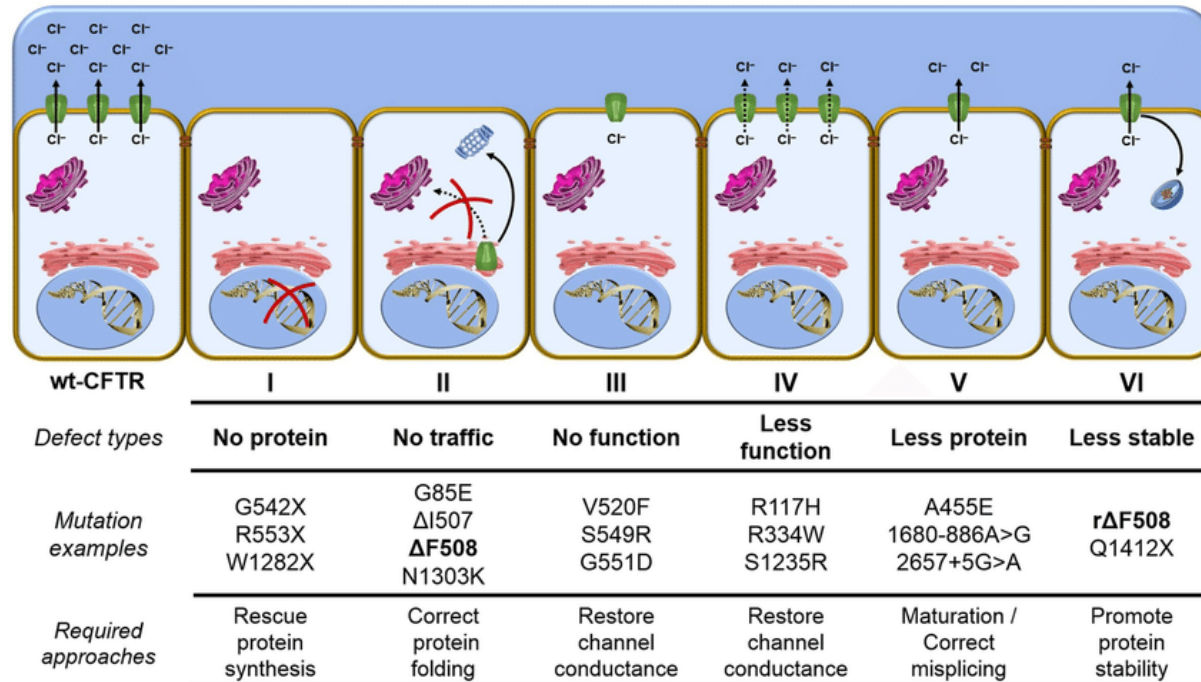
[www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)

- La distribuzione delle mutazioni CFTR note comprende tutti gli esoni, gli introni e le regioni regolatorie del gene.
- Le mutazioni nel gene CFTR possono includere mutazioni missenso, inserzioni / delezioni, nonsense, frame-shift in-frame o out-of-frame, siti di splicing o nel promotore.

# CFTR : LE MUTAZIONI

Le mutazioni sono divise in classi:

- Classe I: causano sintesi proteica difettosa o assente
- Classe II: influenzano il traffico della proteina
- Classe III: compromettono il gating del canale
- Classe IV: causano una diminuzione della conduttanza del canale
- Classe V: causano la riduzione dei livelli di proteina normale
- Classe VI: destabilizzano la proteina





# CFTR : LA TERAPIA

- **Antibiotici:** individui affetti da CF assumono sempre uno o più antibiotici, anche se in salute, per la prevenzione delle infezioni.
- **Potenziatori e correttori di CFTR.** Sono farmaci che mirano a correggere il difetto genetico di base della proteina CFTR. Poiché l'effetto di questi farmaci è specifico per il tipo di mutazione, è necessaria conoscere il genotipo di entrambi gli alleli CFTR del paziente.
  - Ad es. ivacaftor è stato approvato dalla FDA nel 2012, per i pz affetti dalla mutazione CFTR G551D. In questi pazienti migliora la funzione polmonare e riduce i sintomi respiratori
  - Nel 2018, la FDA ha approvato la combinazione ivacaftor / tezacaftor. Tezacaftor (SYMDEKO) per il trattamento dei pz con mutazione  $\Delta F508$ .
  - Nel 2019, la combinazione elexacaftor / ivacaftor / tezacaftor (KAFTRIO/TRIKAFTA) è stata approvata per l'uso nei pazienti che hanno una mutazione  $\Delta F508$ .
- Il **trapianto di polmone**, negli ultimi 10 anni, è divenuta una possibilità in grado di prolungare l'aspettativa di vita anche nelle forme più gravi

