

La diagnostica molecolare della fibrosi cistica e delle malattie correlate a mutazioni del gene CFTR

Alberto Bonizzato¹, Carlo Castellani²

¹Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche e ²Centro Regionale Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera di Verona

ABSTRACT

The molecular diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Cystic fibrosis is the most frequent severe autosomal recessive disorder in Caucasian populations. There is great heterogeneity in the clinical manifestations of cystic fibrosis. Some patients may have a severe course with rapid progression of symptoms, while others have much milder or even atypical disease manifestations and still carry gene mutations. The gene responsible for the disease encodes for a chloride channel in the apical membrane of secretory epithelial cells. More than 1500 mutations have been identified in the cystic fibrosis gene, varying in their frequency and distribution. Very few mutations have a worldwide frequency above 0.1%, but some can reach high frequencies in selected populations. Current mutation screening tests range from the most commonly adopted mutation screening panels to extensive scanning protocols encompassing the whole coding region and exon-intron splice junctions. However, even the most extensive mutation screening tests fail to detect mutations in all cystic fibrosis alleles. Unidentified defects may lie in introns or in regulatory regions, which are not routinely investigated, or can be due to complex rearrangements difficult to detect at DNA level. Rearrangements can be optimally examined either by multiplex ligation-dependent probe amplification or quantitative multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. The analysis of transcripts from nasal brushing is utilized to detect intronic mutations affecting RNA splicing.

INTRODUZIONE

La fibrosi cistica è la malattia genetica grave ad ereditarietà autosomica recessiva più comune nelle popolazioni di origine europea. In Italia, la prevalenza alla nascita è verosimilmente compresa tra 1/2500 e 1/3000, con una frequenza dei portatori compresa tra 1/26 e 1/30 (1).

Le manifestazioni cliniche della malattia fanno seguito alla presenza di secrezioni esocrine mucose dense, che portano a malattia polmonare cronica ostruttiva e ad aumento della concentrazione di sodio cloruro nel sudore. Nella maggior parte dei casi sono presenti insufficienza pancreatica esocrina con maldigestione e deficit di crescita e, nella quasi totalità dei maschi affetti, azoospermia da atresia bilaterale congenita dei dotti deferenti. Complicanze meno frequenti ma non eccezionali sono l'epatopatia cronica e, a partire dall'adolescenza, diabete ed osteoporosi (Tabella 1) (2). Le modalità di comparsa, l'entità dei sintomi ed il decorso sono estremamente variabili. Alcuni malati possono presentare precocemente sintomi respiratori e manifestazioni gastrointestinali, quali ileo da meconio alla nascita e sindrome da malassorbimento secondaria ad insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori più contenuti e funzione pancreatica, se non normale, almeno sufficiente a consentire digestione ed assorbimento adeguati.

La variabilità fenotipica è determinata dalla grande eterogeneità delle mutazioni del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), ma anche da numerosi altri fattori, come geni modificatori, regolazione epigenetica, ambiente, terapia (3).

Nel corso degli anni '90, la ricerca genetica ha dimo-

strato che le mutazioni del gene CFTR sono all'origine di un ampio spettro di manifestazioni fenotipiche, in cui la forma classica di fibrosi cistica rappresenta solamente l'estremo con gli aspetti clinici più gravi. Mutazioni del gene CFTR sono state identificate in forme dall'espressione clinica respiratoria anche molto lieve e con concentrazioni di elettroliti sudorali fisiologiche o comunque non francamente patologiche. Analoghi risultati sono stati ottenuti anche nei soggetti affetti da azoospermia ostruttiva dovuta ad atresia bilaterale congenita dei vasi deferenti (4-7) e nei pazienti affetti da pancreatite cronica o acuta ricorrente (8-10). A tutt'oggi manca ancora un consenso generalizzato sulla precisa definizione nosologica di tali forme, chiamate nella pratica corrente e con una certa disomogeneità "fibrosi cistica non classica" o "fibrosi cistica atipica" od anche "CFTR-related disorders". E' comunque aperto il dibattito sull'opportunità di definirle "fibrosi cistica" o piuttosto di considerarle un'entità distinta.

LA DIAGNOSI DI FIBROSI CISTICA OGGI

Un recente consenso europeo, opera dell'"European Cystic Fibrosis Diagnostic Network" (2), propone di definire fibrosi cistica classica o tipica quella in cui vi siano almeno una caratteristica fenotipica compatibile ed un esame del sudore positivo. Viceversa, si definisce fibrosi cistica non classica o atipica quella in cui vi siano almeno una caratteristica fenotipica compatibile, esame del sudore non alterato o borderline ed una mutazione che causi malattia in entrambi gli alleli (od, in alternativa, una misura della differenza di potenziale nasale compatibile

Tabella 1*Manifestazioni cliniche di fibrosi cistica (mod. da rif. 2)**Fortemente indicative della presenza di fibrosi cistica*

1. Respiratorie
 - Infezione respiratoria cronica da pseudomonas aeruginosa mucolde o burkholderia cepacia
 - Bronchiectasie bilaterali ai lobi superiori
 - Polipi nasali in età pediatrica
2. Gastrointestinali
 - Ileo da meconio
 - Insufficienza pancreatica esocrina in età pediatrica
3. Altre
 - Alcalosi ipocloremica in assenza di vomito
 - Assenza bilaterale congenita dei dotti deferenti

Indicative della presenza di fibrosi cistica, ma meno specifiche

1. Respiratorie
 - Infezione respiratoria cronica da stafilococco aureo, pseudomonas aeruginosa, acinetobacter xylosoxidans o haemophilus influenzae.
 - Quadro radiologico con bronchiectasie, atelettasie, iperinflazione o addensamenti persistenti
 - Emottisi con malattia polmonare (escluse tubercolosi e vasculite)
 - Tosse cronica e/o produttiva
 - Aspergillosi broncopolmonare allergica
 - Polipi nasali in età adulta
 - Pansinusite cronica
2. Gastrointestinali
 - Deficit staturale-ponderale
 - Iipoproteinemia
 - Deficit di vitamine liposolubili
 - Ostruzione fecale recidivante del colon
 - Prolasso rettale
 - Cirrosi biliare
 - Ipertensione portale
 - Colelitiasi in età pediatrica in assenza di malattia emolitica
 - Colangite sclerosante
 - Insufficienza pancreatica esocrina in età adulta
 - Pancreatite ricorrente
3. Altre
 - Ippocratismo digitale
 - Osteopenia/osteoporosi sotto i 40 anni
 - Diabete atipico

con fibrosi cistica). Nei soggetti con esame del sudore borderline, una sola mutazione identificata e una misura della differenza di potenziale nasale dubbia, una fibrosi cistica non classica non può venire né confermata né smentita (Figura 1).

Il complesso iter diagnostico si basa su criteri ampiamente riconosciuti, secondo i quali per diagnosticare la malattia sono necessari: la presenza di almeno una caratteristica fenotipica compatibile e/o di un fratello/sorella affetti e/o di un esame di screening neonatale positivo, più un esame del sudore positivo e/o l'identificazione di due mutazioni note per causare fibrosi cistica e/o una misurazione di differenza di potenziale elettrico transepiteliale nasale compatibile (11). Purtroppo né l'esame del sudore, né l'analisi genetica e tanto meno la misurazione della differenza di potenziale

transepiteliale sono privi di limiti.

L'esame del sudore è la prova più utilizzata e rimane a tutt'oggi il "gold standard" per la diagnosi di fibrosi cistica. Si basa sulla stimolazione della cute dell'avambraccio con iontoforesi pilocarpinica, raccolta del sudore su carta da filtro o garza o con capillare e analisi chimica della concentrazione di cloruro. I livelli decisionali sono: positivo per >60 mmol/L, negativo per <40 mmol/L, dubbio nella fascia compresa tra i due valori. Nel lattante la soglia di negatività è inferiore (30 mmol/L), ma mancano in generale chiare indicazioni sul variare delle concentrazioni di cloruri nel sudore in rapporto all'età. L'esame è molto valido quando usato per la diagnosi di una forma classica di fibrosi cistica, ma la sua sensibilità si riduce considerevolmente nelle forme non classiche, dove spesso le concentrazioni di cloruro si situano nella fascia dubbia od addirittura negativa. Inoltre l'esame del sudore offre sul piano tecnico non poche occasioni di errore, poiché richiede buona manualità ed è poco automatizzabile (2).

In caso di impossibilità ad eseguire l'esame del sudore, o quando essa risulti di dubbia interpretazione od anche negativa, ma in presenza di un forte sospetto clinico, è indicato eseguire un'analisi genetica per fibrosi cistica. L'analisi genetica presenta, in relazione al grande numero di mutazioni, una sensibilità parziale, con notevoli variazioni regionali. Se ipotizziamo per l'Italia una "detection rate" media del 75% per un gruppo standard di mutazioni CFTR, entrambe le mutazioni possono essere identificate, e quindi consentire la diagnosi, solo in poco più della metà degli affetti; nel 37% dei casi verrà individuato un solo allele malato, addirittura nessuno in 6 affetti su 100. In nazioni favorite da una distribuzione allelica più omogenea, e dove si possa giungere con un'analisi genetica standard ad una copertura del 90%, nel 18% dei pazienti verrebbe comunque identificata una sola mutazione, nessuna in un malato su 100.

Queste considerazioni sull'uso dell'analisi genetica per la diagnosi di fibrosi cistica si applicano alle forme classiche di malattia. Nella forme non classiche le mutazioni sono spesso molto eterogenee e pertanto le analisi genetiche standard risultano ancora meno sensibili, non potendo identificare mutazioni o varianti polimorfiche spesso poco note o non ancora individuate. In questo contesto, può rivelarsi utile un approfondimento con sistemi di "scanning" od anche sequenziamento dell'intera regione codificante del gene. La sensibilità di queste tecniche è migliore rispetto all'analisi standard; tuttavia, non di rado il risultato ottenuto può essere di difficile interpretazione, in quanto si possono individuare non solo mutazioni causanti malattia, ma anche variazioni di sequenza fenotipicamente non rilevanti (incapacità di precisare se si tratti di una mutazione o di una variante normale).

Lo studio della differenza di potenziale elettrico transepiteliale a livello delle mucose respiratorie o intestinali valuta in vivo la funzione della proteina CFTR tramite la misurazione dello scambio ionico di membrana. Si tratta di tecniche poco diffuse, che richiedono lo specifico addestramento di personale in grado di interpretare la

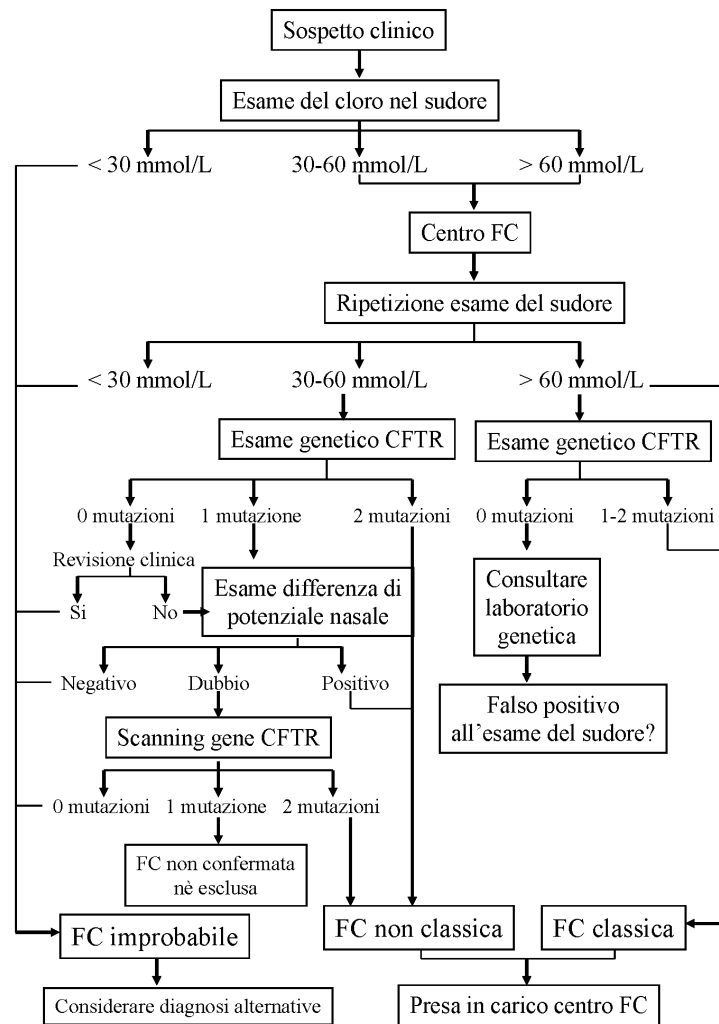


Figura 1
 Algoritmo per la diagnosi di fibrosi cistica (FC) (mod. da rif. 2).

variabilità intrinseca della prova. In particolare la misurazione a livello della mucosa nasale richiede un buon livello di collaborazione da parte del paziente ed è quindi di non semplice esecuzione nei bambini. Questo tipo di prova distingue adeguatamente gli individui con fibrosi cistica classica e può talvolta consentire di giungere a diagnosi in forme non classiche nelle quali l'esame del sudore e l'analisi genetica non siano stati risolutivi. Tuttavia, anche queste misurazioni specialistiche possono non essere in grado di risolvere il dubbio diagnostico (12).

LE MUTAZIONI DEL GENE CFTR

Il gene CFTR è stato identificato nel 1989 (13-15). Si tratta di un gene grande e complesso, costituito da 27 esoni, che si estende nel genoma umano per circa 250.000 paia di basi. Il RNA messaggero corrispondente è espresso nei tessuti epiteliali secernenti di vari organi, tra cui le vie aeree, il pancreas, il fegato, l'intestino, il testicolo, le ghiandole sudoripare e le ghiandole salivari.

Il prodotto del gene CFTR è un canale del cloruro appartenente alla superfamiglia delle ATPasi di traffico o trasportatori ABC. La proteina CFTR è costituita da due motivi ripetuti, ognuno dei quali è composto da un dominio transmembrana e da un dominio che lega l'ATP. I due motivi sono uniti da un dominio regolatore localizzato nel citoplasma e contenente numerosi siti di fosforilazione per le proteinchinasi.

Il trasporto del cloruro attraverso la membrana cellulare effettuato dalla proteina CFTR determina lo stato di idratazione delle secrezioni. Quando la proteina non c'è o non è funzionante, le secrezioni risultano eccessivamente povere d'acqua e viscosi.

Fino ad ora sono state descritte 1546 diverse mutazioni nel gene CFTR. L'elenco completo è disponibile in internet nel sito "Cystic Fibrosis Mutation Database" <http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>. La distribuzione geografica delle mutazioni può variare, anche in modo rilevante, da regione a regione e la sensibilità delle prove diagnostiche dipende dall'origine geografica dei soggetti esaminati (16). Ci sono mutazioni

che sono diffuse in tutta Europa, altre che interessano solo alcune regioni ed altre che colpiscono solamente pochi individui strettamente imparentati. Le frequenze delle mutazioni nelle diverse regioni italiane sono riportate nel sito internet dei laboratori italiani che si occupano di fibrosi cistica (<http://spazioinwind.libero.it/laboratorio/cf/frequenze.htm>).

La mutazione più frequente è la F508del, una delezione di 3 paia di basi nell'esone 10 che determina la perdita della fenilalanina in posizione 508, chiamata comunemente "Delta F508". Non è ancora del tutto chiaro quale sia il fattore che ha determinato il vantaggio selettivo di questa mutazione che, pur essendo letale in omozigosi e pur essendo comparsa una sola volta nella storia dell'uomo, interessa circa 10 milioni di persone in Europa (17). La sua distribuzione continentale segue un gradiente crescente da sud-est verso nord-ovest che, probabilmente, è stato determinato da eventi avvenuti durante la preistoria, quando l'Europa è stata popolata al termine dell'ultima era glaciale e durante la diffusione dell'agricoltura nel neolitico.

Dal punto di vista degli effetti sul fenotipo, le mutazioni che colpiscono il gene CFTR possono essere suddivise in 3 gruppi, anche se non sono rare le eccezioni e le situazioni in cui l'effetto a livello clinico di una mutazione non è noto. Esistono mutazioni che causano la fibrosi cistica classica, quelle associabili a patologie CFTR-correlate e le mutazioni che non causano alcun effetto sul fenotipo (Tabella 2).

In genere, le mutazioni causanti fibrosi cistica determinano la completa assenza di funzione. Questa può essere dovuta: alla mancata formazione della proteina (mutazioni di classe I), alla mancata localizzazione della proteina sulla membrana cellulare (mutazioni di classe II) o alla formazione di una proteina non funzionante (mutazioni di classe III e IV). A questo gruppo di mutazioni appartengono tutte le mutazioni che determinano uno stop o un "frameshift" (lo slittamento della lettura dei codoni), le mutazioni di "splicing" causanti la perdita completa di uno o più esoni e i riarrangiamenti genici. Inoltre, esistono svariati casi di mutazioni missenso o piccole delezioni "in frame" (es. F508del), che possono causare la formazione di una proteina non funzionante o la mancata localizzazione della proteina sulla membrana cellulare, andando ad interferire con il processamento della CFTR all'interno della cellula. Per avere la forma classica della fibrosi cistica bisogna che entrambi i geni

ereditati dai genitori presentino una mutazione causante fibrosi cistica.

Lo sviluppo di un quadro clinico meno severo viene causato da altre mutazioni che provocano danni più limitati, come una parziale riduzione della funzione (mutazioni di classe III e IV) o una produzione di proteina funzionante, ma in quantità molto limitata (mutazioni di classe V). Se una di queste mutazioni è presente nel genotipo avremo un fenotipo meno severo, anche se la seconda mutazione appartiene alla classe I e II.

Infine, ci possono essere mutazioni che non causano alcun effetto sul fenotipo anche se, in alcuni casi, modificano la sequenza aminoacidica della proteina CFTR. Tali mutazioni vengono definite "varianti alleliche" oppure "polimorfismi" se hanno una frequenza nella popolazione generale >1%.

Quando in sede diagnostica si identifica una mutazione mai descritta in precedenza o una mutazione molto rara, sulla quale non ci sono informazioni sufficienti, può risultare molto difficile poter prevedere quali saranno gli effetti sul quadro clinico.

LE ANALISI MOLECOLARI

Le analisi molecolari del gene CFTR sono numerose ed il loro utilizzo si può articolare in modo diverso in funzione delle caratteristiche del caso in esame e dei risultati che si ottengono (Tabella 3).

Prima della identificazione del gene, era possibile stabilire se un parente di un paziente era portatore o se un feto era affetto, utilizzando marcatori genetici (polimorfismi di restrizione o RFLP) localizzati in prossimità del gene, che consentivano di seguire come i singoli cromosomi venivano trasmessi di generazione in generazione. La principale causa di errore in questo tipo di analisi era la ricombinazione genica, che ad ogni generazione comporta scambi di ampie regioni tra i cromosomi omologhi. La probabilità con cui tali marcatori ricombinano rispetto al gene è sostanzialmente legata alla loro distanza.

Quando il gene è stato clonato e sono state identificate le prime mutazioni, è divenuto possibile studiare in modo specifico le mutazioni: in tal modo il rischio di errore legato alla ricombinazione genica è stato escluso. Anche oggi, sebbene in un numero di casi molto ridotto, le analisi con i polimorfismi sono l'unica possibilità di effettuare una diagnosi quando la mutazione familiare non viene determinata. I polimorfismi di cui disponiamo

Tabella 2

Mutazioni del gene CFTR e fenotipo

Mutazioni causanti la fibrosi cistica	F508del; N1303K; G542X; R1162X; 2183AA>G; 1717-1G>A; R553X; 711+5G>A; G85E; I507del; W1282X; 621+1G>T; CFTRdele17a-18; G551D; Q552X; R347P; 2789+5G>A; G1244E; 3849+10kbC>T; 1898+3A>G; T338I; 3272-26A>G; R334W; R1158X; R1066H; 1898+1G>A
Mutazioni causanti le patologie CFTR-correlate	R117H; IVS8-(TG)12T5; D1152H; L997F; D110H
Polimorfismi e varianti alleliche senza conseguenze cliniche	M470V; I148T; 125G/C; R31C; R75Q; R1162L; S1235R; 4002A/G; 4521G/A; 2694T/G; 4404C/T; 2752-15G/C; 875+40A>G

attualmente sono spesso altamente polimorfici e intragenici, quindi molto informativi e a bassissimo rischio di ricombinazione.

Le analisi tese all'identificazione delle mutazioni possono essere divise in tre categorie: quelle di I° livello, volte alla ricerca diretta di una o molte mutazioni in modo specifico, quelle di II° livello, che permettono di esaminare ampie porzioni del gene alla ricerca di qualunque tipo di mutazione in esse eventualmente presente, e quelle di III° livello che permettono di studiare le mutazioni che sfuggono al I° e II° livello ossia i riarrangiamenti genici rari e le mutazioni introniche non adiacenti agli esoni e causanti alterazioni dello "splicing".

Le analisi mutazione-specifiche si basano su svariate metodiche, tra di esse hanno avuto più successo le tecniche che consentono l'analisi simultanea di molte mutazioni come il "reverse dot blot" (RDB), l'"oligo ligation assay" (OLA) e l'"allele specific polymerase chain reaction" (PCR)". Nel nostro laboratorio utilizziamo kit basati sul RDB, che non necessitano di apparecchiature costose e sono di facile esecuzione ed interpretazione. Nel RDB le sonde allele-specifiche sono fissate ad un supporto, la striscia, e vengono fatte ibridare con i prodotti PCR amplificati in una reazione multipla (18,19). Al termine, una reazione colorimetrica permette di visualizzare il risultato.

Negli anni '90, non essendo disponibili kit commerciali, vari laboratori utilizzavano sistemi messi a punto in proprio che comprendevano le mutazioni più frequenti nella propria regione di riferimento (20). Con un costo

contenuto era possibile disporre di un metodo con una "detection rate" relativamente elevata. Per contro, tali metodi presentavano i difetti degli esami non commerciali (problemi di riproducibilità) e richiedevano un impegno ed un'abilità notevoli da parte degli operatori.

Attualmente si utilizzano kit commerciali decisamente più affidabili ma anche più costosi, che permettono di analizzare simultaneamente diverse decine di mutazioni. Tali kit, oltre alle mutazioni più frequenti in Europa, analizzano numerose mutazioni specifiche della popolazione italiana. La loro "detection rate" varia da regione a regione e, generalmente, è compresa tra 70 e 90%.

Come per le analisi mutazione-specifiche, anche le metodiche di II° livello che permettono di effettuare lo "scanning" dell'intero gene, alla ricerca di eventuali mutazioni, sono piuttosto numerose. Inizialmente si procedeva sequenziando il gene esone per esone, avendo cura di includere anche le regioni introniche circostanti, per individuare eventuali difetti che potessero influenzare lo "splicing". In passato il sequenziamento dell'intero gene CFTR veniva considerato complesso e costoso e quindi applicabile solo a casi molto limitati. Per questo, nel corso degli anni '90, sono nate e si sono diffuse tecniche, che permettono di identificare quali esoni contengono le mutazioni, per ridurre al minimo le analisi di sequenziamento. Tra queste metodiche ricordiamo quelle che hanno dato i risultati migliori: lo SSCP (single strand conformation polymorphism), la DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) e la D-HPLC (denaturing HPLC). Le prime due sono tecniche elettroforetiche che si realizzano in gel di poliacrilamide, la terza prevede di far eluire il DNA amplificato attraverso una colonna cromatografica in condizioni di semidenaturazione (21,22).

In questi ultimi anni, la D-HPLC si è affermata in quasi tutti i laboratori che progressivamente hanno abbandonato le altre metodiche. La D-HPLC, pur richiedendo un'apparecchiatura più costosa, è risultata avere, rispetto alle altre metodiche, una sensibilità più elevata ed una notevole praticità e sicurezza d'uso. Nella D-HPLC, si sfrutta la maggiore instabilità delle molecole di DNA "heteroduplex" che si formano dalla rinaturazione di filamenti di DNA non completamente omologhi, quando un soggetto è eterozigote per una mutazione. Se un filamento senso "wild type" si rinatura con un filamento anti-senso mutato, o viceversa, avremo una molecola di DNA "heteroduplex" contenente un "mismatch" che abbasserà in modo sensibile la temperatura di denaturazione della molecola, alterando il comportamento migratorio del DNA nel caso in cui la cromatografia sia effettuata alla temperatura di denaturazione parziale di quella specifica sequenza.

In questi ultimi anni, visti i progressi della tecnologia legata al sequenziamento del DNA, alcuni laboratori, dotati di strumentazioni adeguate, preferiscono procedere al sequenziamento completo del gene CFTR, anziché effettuare l'analisi D-HPLC (o DGGE) (23).

La "detection rate" delle analisi di II° livello può raggiungere il 95-98% e dipende dalla frequenza delle mutazioni che sfuggono all'analisi D-HPLC e al sequen-

Tabella 3

L'analisi genetica del gene CFTR

Analisi di I° livello

- 1- Analisi multiplex RDB o OLA o ARMS delle mutazioni più frequenti (kit commerciali)
- 2- Analisi specifica per la mutazione familiare (nel caso in cui la mutazione familiare sia nota e non compresa tra quelle rilevate nel kit)
- 3- Analisi dei polimorfismi informativi (nel caso in cui la mutazione familiare sia ignota)

Analisi di II° livello

- 4- Analisi D-HPLC o DGGE o sequenziamento dell'intera porzione codificante e delle giunzioni introne-esone del gene CFTR
- 5- Sequenziamento degli esoni positivi all'analisi D-HPLC (o DGGE)

Analisi di III° livello

- 6- Analisi MLPA o QMPSF per l'identificazione dei riarrangiamenti genici
- 7- Studio del mRNA del gene CFTR estratto dall'epitelio nasale

RDB, reverse dot blot; OLA, oligo ligation assay; ARMS, amplification refractory mutation system; D-HPLC, denaturing HPLC; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; QMPSF, quantitative multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments.

ziamento, ossia i riarrangiamenti genici e le mutazioni localizzate nelle regioni introniche.

Tra le metodiche che permettono la quantificazione del DNA per rilevare la presenza di riarrangiamenti genici (analisi di III° livello) ricordiamo l'analisi QMPFSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments) e l'analisi MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).

In un nostro studio (24), utilizzando l'analisi QMPFSF è stato possibile identificare nei pazienti con fibrosi cistica i riarrangiamenti genici più frequenti del nostro territorio, ossia la delezione degli esoni 17a, 17b e 18 (CFTRdele17a-18) e la delezione dell'esone 1 (CFTRdele1). Risultati molto interessanti sono stati ottenuti anche con l'analisi MLPA, per la quale è disponibile un kit commerciale specifico per il gene CFTR. Nell'analisi MLPA non è il DNA target ad essere amplificato ma le sonde che vengono aggiunte al campione. L'amplificazione mediante polymerase chain reaction delle sonde dipende dalla presenza delle sequenze target nel campione. Ogni sonda è costituita da due oligonucleotidi che ibridizzano sequenze adiacenti. I due oligonucleotidi adiacenti vengono "ligati" solo in presenza del DNA target, permettendo la successiva amplificazione dell'intera sonda. Tutte le sonde presentano sequenze terminali che permettono di amplificarle simultaneamente con una sola coppia di primer. I prodotti delle diverse sonde vengono distinti sulla base della lunghezza, ogni target origina frammenti di dimensioni diverse e caratteristiche.

Infine, necessita segnalare che esiste anche la possibilità di studiare il mRNA che, in genere, si ricava dal-

l'epitelio nasale prelevato mediante "brushing" (25). Tale analisi è in grado di identificare le mutazioni introniche che alterano il corretto "splicing" del gene CFTR; inoltre permette di evidenziare i grandi riarrangiamenti genici, a patto che la mutazione non causi la mancata espressione del trascritto CFTR.

Il gene della fibrosi cistica è uno dei più grandi e complessi del genoma umano ed il suo studio si è rivelato, nel corso degli anni, una sfida molto impegnativa. Dall'identificazione del gene CFTR ad oggi, le tecniche che permettono di determinare il genotipo dei pazienti e dei loro familiari sono progressivamente evolute, diventando sempre più sensibili ed efficaci. Solamente oggi, dopo quasi due decenni, è possibile affermare che siamo in grado di identificare quasi tutti gli alleli causanti fibrosi cistica nei pazienti con fenotipo "classico". La Tabella 4 riporta i dati delle frequenze delle mutazioni osservate in un campione di pazienti originari del Veneto e del Trentino Alto Adige, le due regioni di riferimento per il nostro laboratorio. In una coorte di 194 pazienti abbiamo caratterizzato il 98,5% degli alleli, identificando 40 mutazioni diverse. La "detection rate" dei kit commerciali di I° livello è la più alta rilevata in Italia ed è pari al 90%. Questo valore arriva addirittura al 98%, se si considerano i dati relativi alla provincia autonoma di Bolzano, riportati in una precedente pubblicazione (26).

La situazione risulta essere più complessa quando si prendono in considerazione le patologie CFTR-correlate. Spesso in questi casi non risulta chiara nemmeno la definizione della diagnosi e quindi non è facile identificare dei campioni sufficientemente rappresentativi. Nel caso dei maschi infertili affetti da atresia dei vasi deferenti, la

Tabella 4

Le mutazioni del gene CFTR nei pazienti fibrosi cistica originari del Veneto e del Trentino Alto Adige

Mutazioni	Frequenza della mutazione	
	Assoluta	Relativa (%)
F508del	188	48,5
R1162X	40	10,3
2183AA>G	27	7,0
711+5G>A	17	4,4
N1303K	16	4,1
1717-1G>A	9	2,3
2789+5G>A; G542X	7	1,8
Q552X; I507del	6	1,6
CFTRdele17a-18; R553X; G85E	5	1,3
1898+3A>G; 3272-26A>G; 621+1G>T; R347P; 1874insT	3	0,8
CFTRdele1; 991del5; 2790-2A>G; Q39X; W1282X; 3132delTG; 1497delGG	2	0,5
G1244E; 541del4; 4382delA; 457TAT>G; K114X; R709X; Q353X; E193K; 3849+10kbC>T; S466X; L732X; R1066H; 1717-8G>A; 4006-8T>A; G551D	1	0,3
Non identificate	6	1,5
Totale alleli	388	100,0
Totale identificate	382	98,5

"detection rate" dei kit commerciali può essere stimata intorno al 50-60%. Nella nostra popolazione, escluse le mutazioni classiche, i difetti genetici più frequenti sono IVS8-(TG)₁₂T5, R117H e D1152H. Con l'analisi di II° livello, entrambi gli alleli vengono identificati in una percentuale molto elevata dei casi anche se, per il momento, i dati a nostra disposizione sono ancora preliminari.

BIBLIOGRAFIA

- Castellani C, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G. Newborn screening strategy for cystic fibrosis: a field study in an area with high allelic heterogeneity. *Acta Paediatr* 1997;86:497-502.
- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61:627-35.
- Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-33.
- Dumur V, Gervais R, Rigot JM, et al. Abnormal distribution of CF DF508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of the epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990;336:512.
- Augarten A, Yahav Y, Kerem B-S, et al. Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *Lancet* 1994;344:1473-4.
- Chillon M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332:1475-80.
- Zielenski J, Patrizio P, Corey M, et al. CFTR gene variant for patients with congenital absence of vas deferens. *Am J Hum Genet* 1995;57:958-60.
- Sharer N, Schwarz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:645-52.
- Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, et al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:653-8.
- Castellani C, Bonizzato A, Rolfini R, et al. Increased prevalence of mutations of cystic fibrosis gene in idiopathic chronic and recurrent pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1993-5.
- Rosenstein BJ, Cutting G. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998;132:589-95.
- Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, et al. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:787-94.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
- Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.
- Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002;19:575-606.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (DF508) in European populations. *Nature Genet* 1994;7:169-75.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6230-4.
- Chehab FF, Wall J. Detection of multiple cystic fibrosis mutations by reverse dot blot hybridization: a technology for carrier screening. *Hum Genet* 1992;89:163-8.
- Bonizzato A, Rolfini R, Cabrini G. Detection of cystic fibrosis mutation by reverse dot-blot hybridization. *Eur J Lab Med* 1999;7:117-22.
- Oefner PJ, Underhill PA. DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC). *Curr Prot Hum Genet* 1998;7:10.1-10.12.
- Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, et al. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet* 2001;108:290-8.
- Lucarelli M, Narzi L, Piergentili R, et al. A 96-well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene. *Annal Biochem* 2006;353:226-35.
- Bombieri C, Bonizzato A, Castellani C, et al. Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients. *Eur J Hum Genet* 2005;13:687-9.
- Ramvalho AS, Beck S, Farinha CM et al. Methods for RNA extraction, cDNA preparation and analysis of CFTR transcripts. *J Cystic Fibrosis* 2004;3:11-15.
- Ciminelli BM, Bonizzato A, Bombieri C, et al. Highly preferential association of the non-F508del CF mutations with the M470 allele. *J Cystic Fibrosis* 2007;6:15-22.