



LA GENETICA MEDICA DI SAN GIOVANNI ROTONDO AL SERVIZIO DELL'ASSOCIAZIONE A.C.A.R. ONLUS

Dott. Leonardo D'Agruma

Servizio di Genetica Medica - Dipartimento dell'Età Evolutiva

I.R.C.C.S. "Casa Sollievo della Sofferenza"

San Giovanni Rotondo (FG)

13 Aprile 2013

INTRODUZIONE

Le esostosi multiple ereditarie (HME) rappresentano una malattia a trasmissione autosomica-dominante caratterizzata dallo sviluppo di tumori benigni delle ossa, chiamati esostosi o osteocondromi multipli. Essi riguardano soprattutto le metafisi delle ossa lunga. La prevalenza alla nascita è stimata intorno a 1:50.000 e la severità della malattia presenta una discreta variabilità interfamiliare e intrafamiliare. Le esostosi possono causare varie complicazioni cliniche (dolori articolari, deformità ossee ed accorciamento delle ossa lunghe, ridotta mobilità articolare e compressioni di nervi e vasi sanguigni). Sul piano clinico la conseguenza piu' importante delle esostosi multiple ereditarie è la trasformazione maligna negli adulti (0,5 - 5 % dei casi).

FORME DI PRESENTAZIONE CLINICA DELLE ESOSTOSI

- **OSTEOCONDROMA (85% dei casi in forma sporadica)**
- **ESOSTOSI MULTIPLE EREDITARIE (HME) (15% dei casi)**



Figure 1. Radiographic aspect of osteochondromas. The lower part of the femur and the upper part of the tibia of an 11-year-old girl affected with hereditary multiple exostoses (sessile exostoses).

Figure 1 X-ray appearance of different exostoses. (a) Solitary exostosis in a femur. (b) Multiple exostoses in the knee joint, antero-posterior view. (c) Multiple exostoses in the knee joint, lateral view. (d) Multiple exostoses in the upper hip and trochanter (arrows indicate the exostoses sites).



GENETICA DELLE ESOSTOSI MULTIPLE EREDITARIE (HME)

Le esostosi multiple ereditarie costituiscono un disordine eterogeneo dal punto di vista genetico. Esse sono associate a mutazioni nei geni EXT1 ed EXT2 che sono considerati essere “tumour suppressor genes”. Tali geni codificano due proteine chiamate esostosina 1 ed esostosina 2. Si tratta di proteine ad attività glicosiltransferasica coinvolte nella biosintesi dell’eparan-solfato. Molte mutazioni (frameshift o nonsense) in questi due geni causano la produzione di proteine tronche e non funzionanti, mentre le mutazioni missense (cambio amminoacidico) sono rare e meno deleterie.

GENI EXT e LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA

- **Gene EXT1 localizzato sul cromosoma 8q23-q24**
- **Gene EXT2 localizzato sul cromosoma 11p11-p12**
- **Gene EXT3 localizzato sul braccio corto del cromosoma 19 ?**

Famiglia di geni EXT-like:

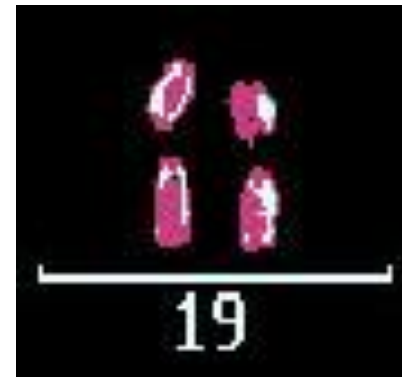
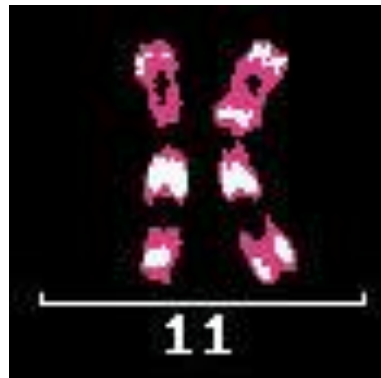
EXTL1 (cromosoma 1p36)

EXTL2 (cromosoma 1p11-p12)

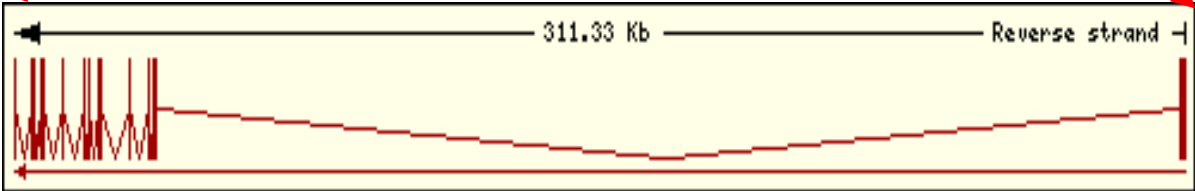
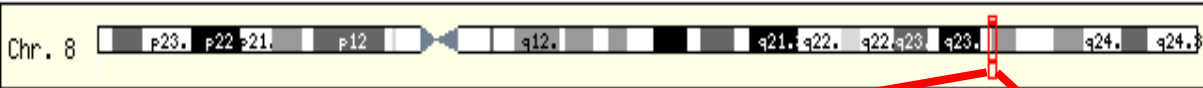
EXTL3 (cromosoma 8p12-p22)

Espressione ubiquitaria, alta omologia di sequenza tra di loro nella regione carbossiterminale.

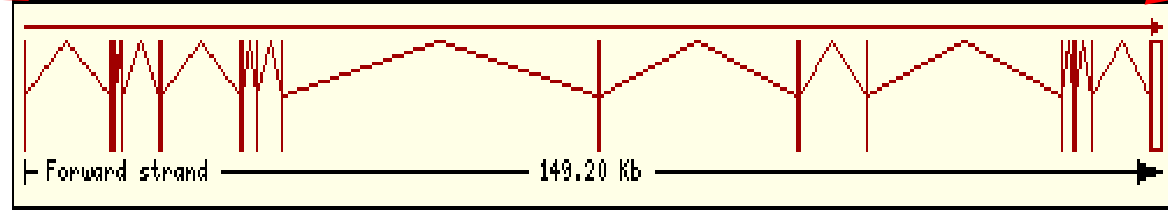
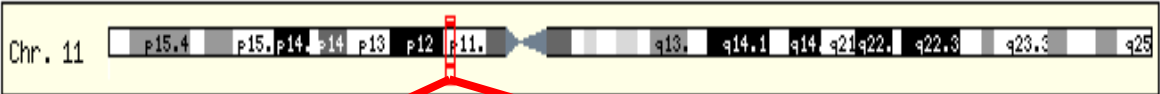
E' stato dimostrato che i geni in cui sono localizzate le alterazioni che determinano l'insorgenza dell'EME chiamati EXT1, EXT2 ed EXT3 sono localizzati rispettivamente sui cromosomi 8, 11 e 19. Le mutazioni sono più frequentemente riscontrabili in EXT1 localizzato sul cromosoma 8.

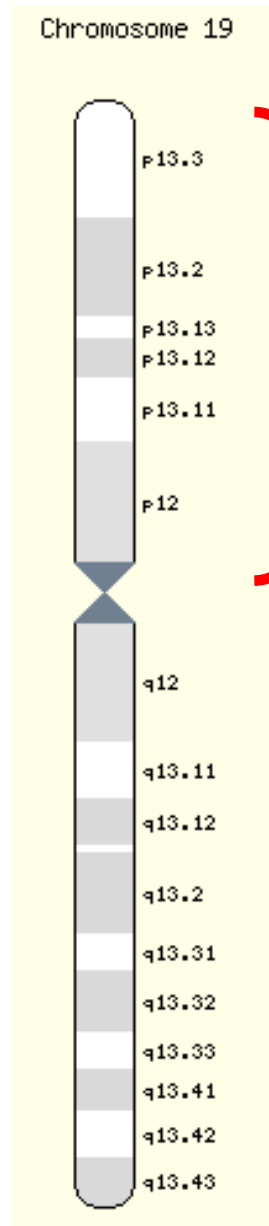


EXT1...



...ed EXT2





...ed EXT3 ?

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

Struttura del gene EXT1

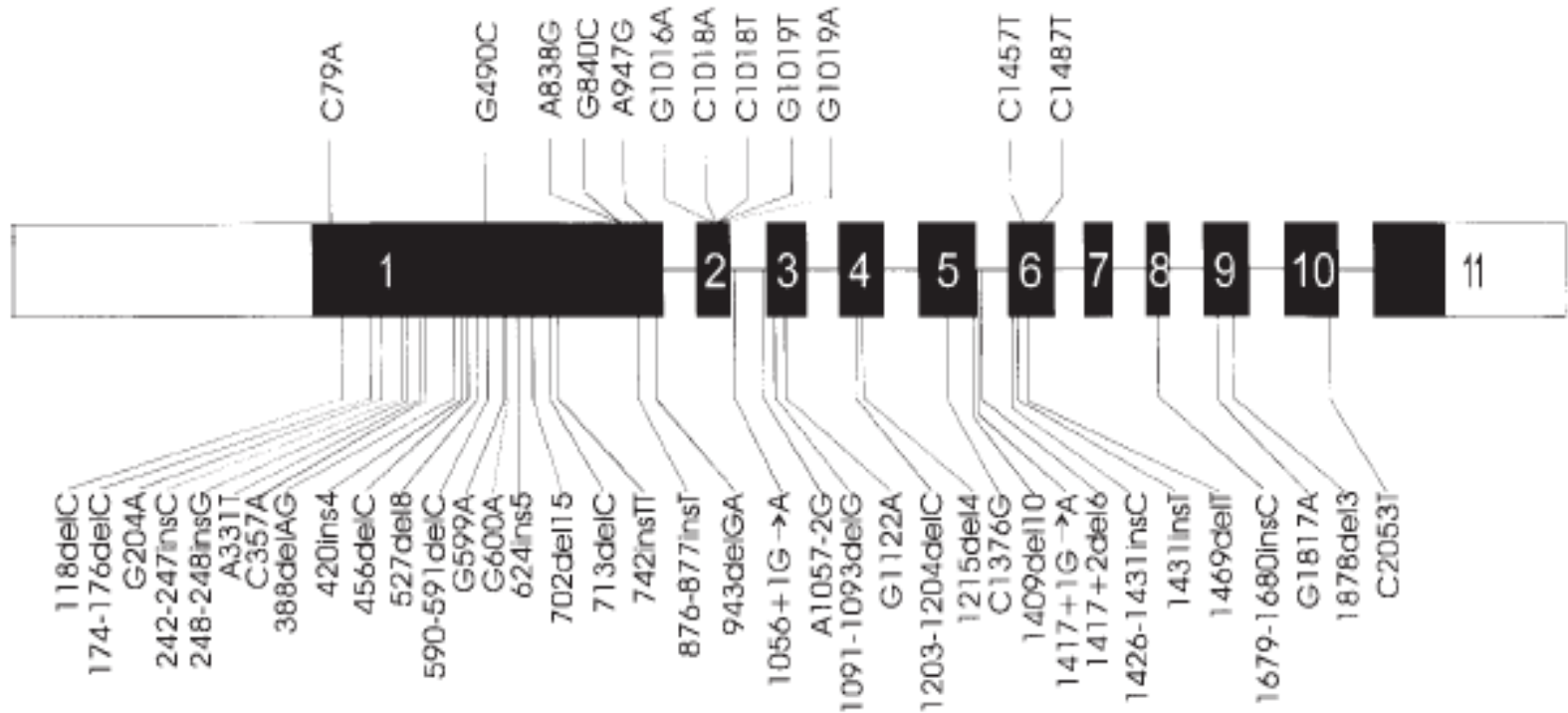


FIGURE 1. Mutation spectrum of the EXT1 gene. Missense mutations are drawn above the schematic representation of the EXT1 gene, and inactivating mutations are drawn below.

Struttura del gene EXT2

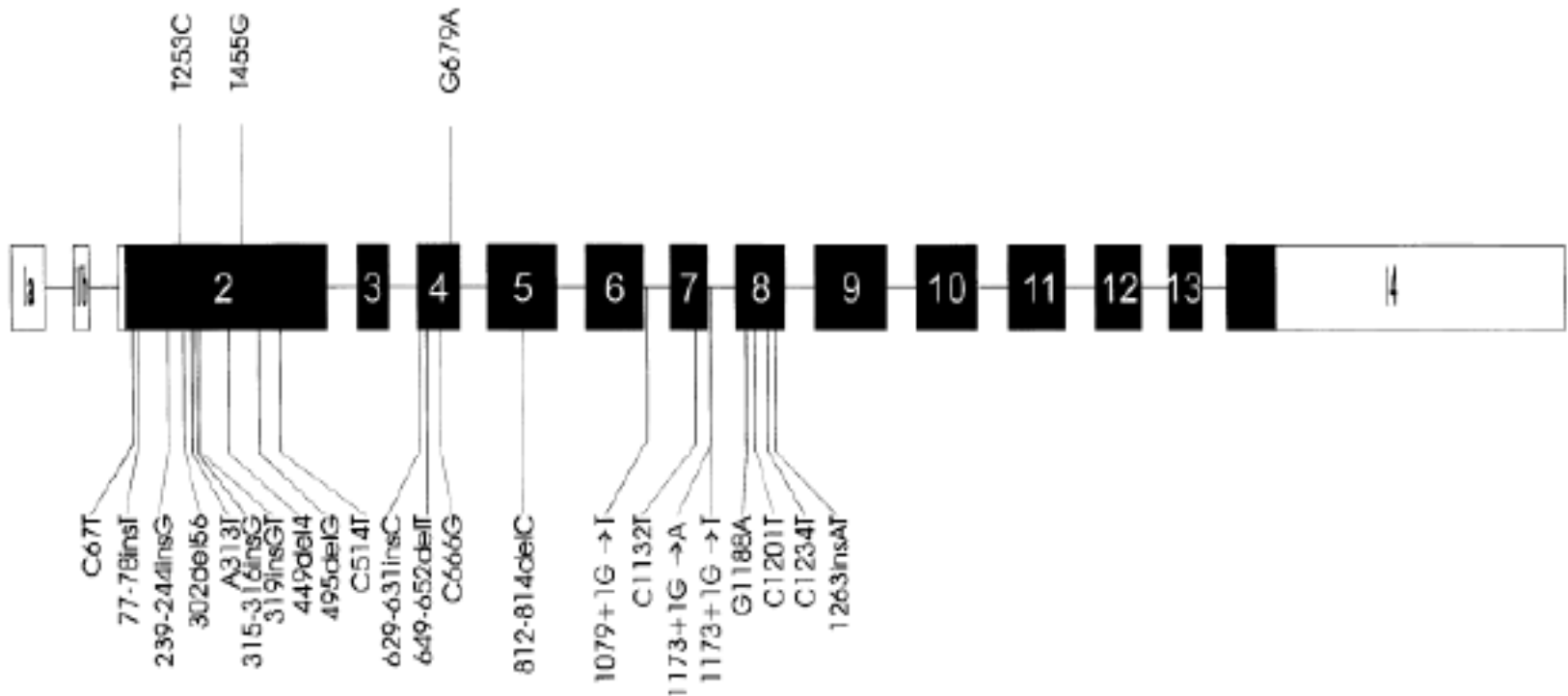


FIGURE 2. Mutation spectrum of the EXT2 gene. Missense mutations are drawn above the schematic representation of the EXT2 gene, and inactivating mutations are drawn below.

FUNZIONE DEI GENI EXT1 ed EXT2

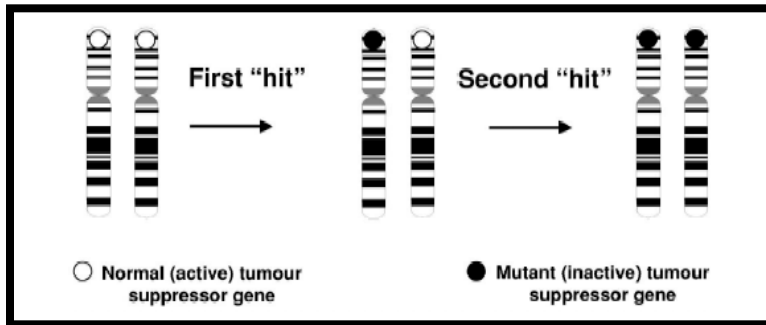
EXT1 ed EXT2 svolgono un ruolo importante in un complesso enzimatico coinvolto nella biosintesi dell'eparansolfato (HS), complesso polisaccaridico lineare composto da acido hexuronico e residui di glucosammina. Esso è un costituente fondamentale della matrice cartilaginea e delle epifisi ossee.

Mutazioni in questi due geni portano ad un ridotto contenuto di HS e ad una difettiva polimerizzazione della catena polisaccaridica. Tutto ciò si traduce in un'alterata espressione del *signalling* che regola l'ossificazione endocondrale.

L'eparansolfato è coinvolto in diverse funzioni: attivazione di fattori di crescita; signalling recettoriale, proliferazione e differenziazione cellulare.

ALTERAZIONI DEI GENI EXT1 ed EXT2

Double somatic inactivation

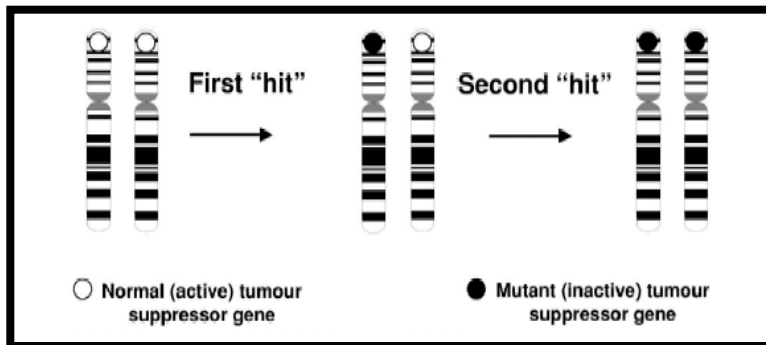


Forme sporadiche di:

OSTEOCONDROMA

ESOSTOSI ISOLATE NON FAMILIARI

Germline+Somatic inactivation

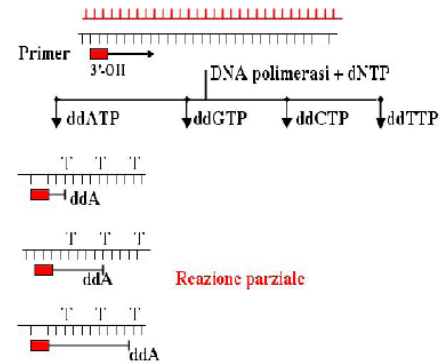
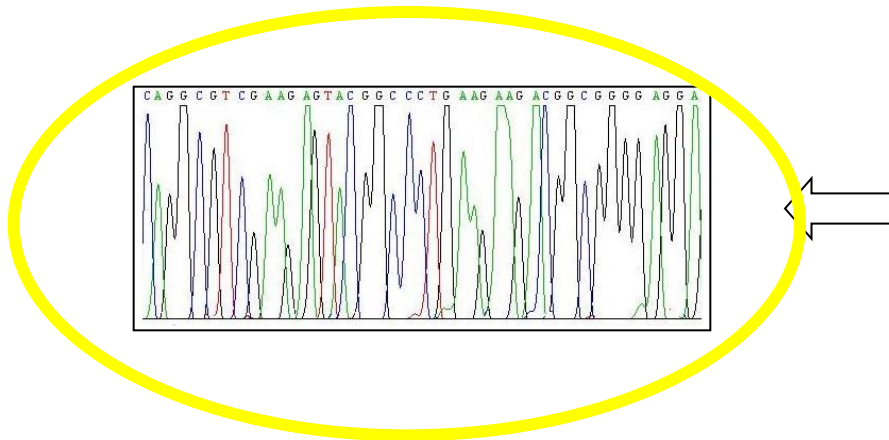
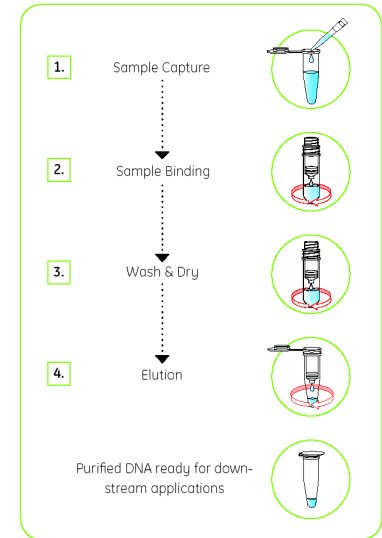
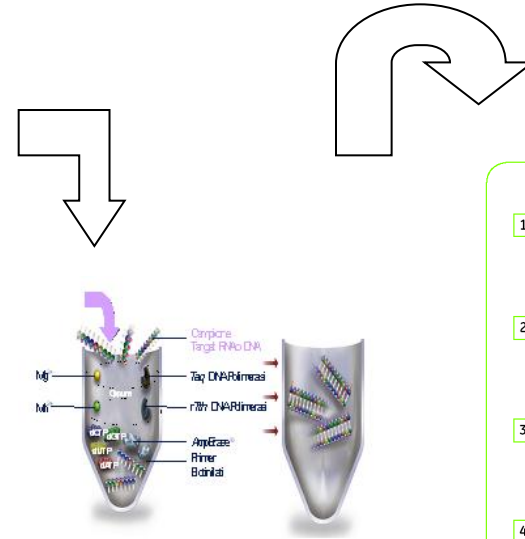
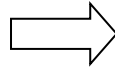
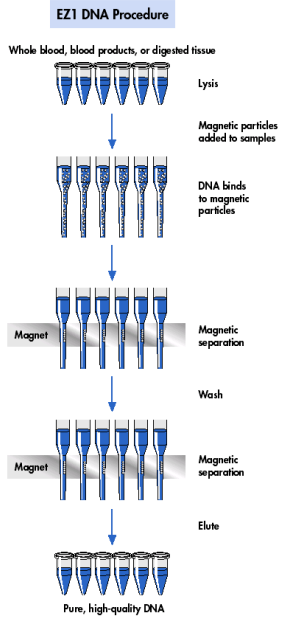


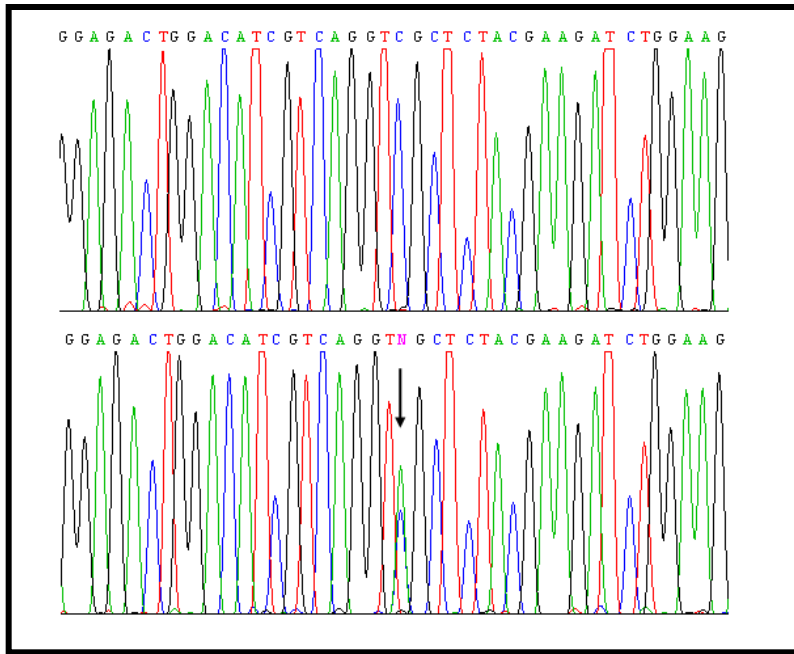
ESOSTOSI MULTIPLE EREDITARIE (HME)

Tecniche di studio di Biologia Molecolare utilizzate per le indagini genetiche

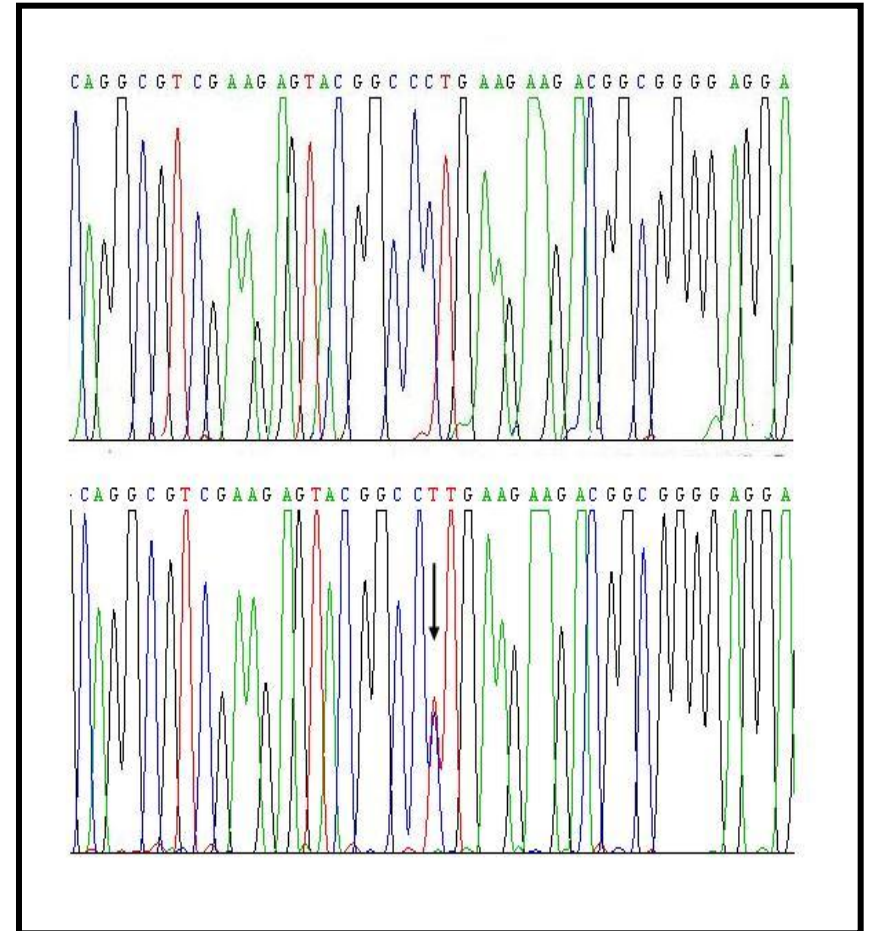
- **ESTRAZIONE e DOSAGGIO DNA**
- **AMPLIFICAZIONE IN VITRO (PCR) DELLE REGIONI CODIFICANTI DEI GENI EXT1 ED EXT2.**
- **PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE**
- **SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO**
- **MLPA**

Processo di analisi molecolare



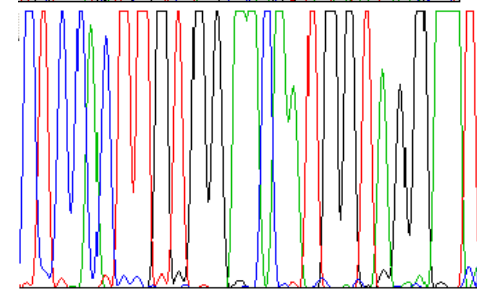
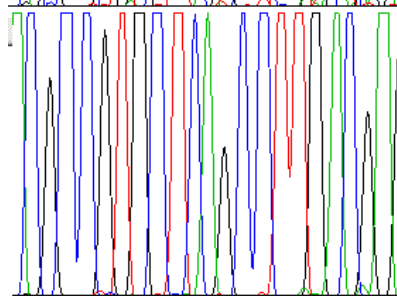
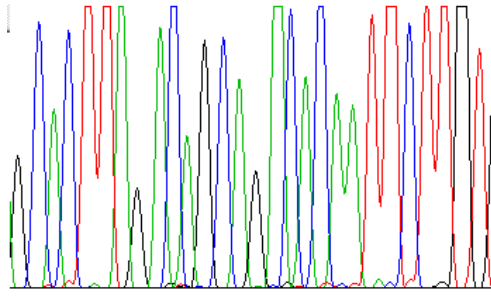
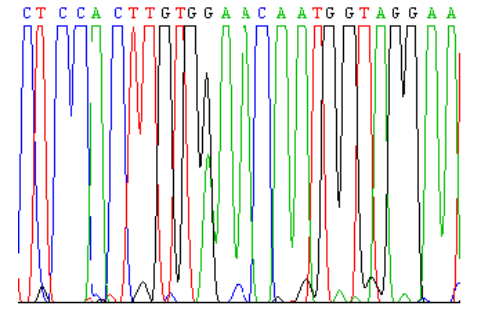
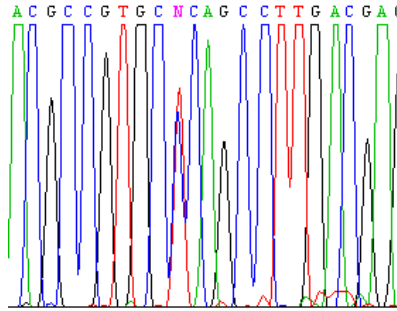
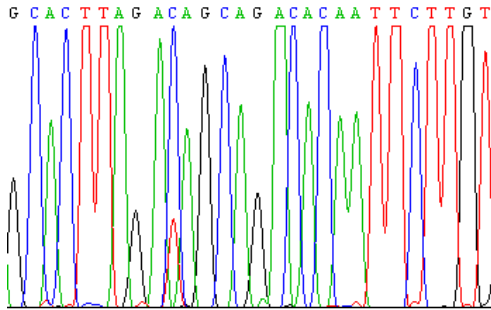


Elettogrammi relativi alla identificazione della mutazione p.S220N riscontrata nell'esone 1 del gene EXT1 allo stato eterozigote in un paziente con esostosi multiple a livello dell'articolazione del ginocchio. Nella parte superiore è illustrata la sequenza wild-type mentre nella parte inferiore la sequenza mutata.

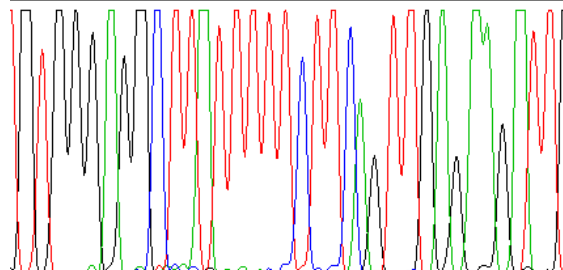
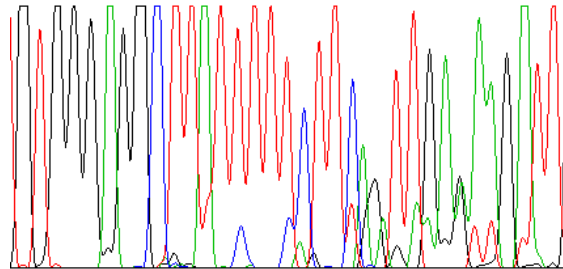


Elettogrammi relativi alla identificazione della mutazione p.R340S riscontrata nell'esone 2 del gene EXT1 allo stato eterozigote in un paziente con esostosi multiple a livello del radio e ulna. Nella parte superiore è illustrata la sequenza wild-type mentre nella parte inferiore la sequenza mutata.

Sequenze di pazienti con esostosi multiple

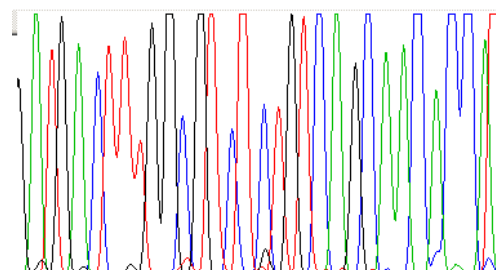
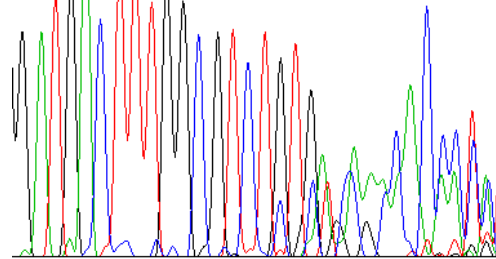


p.Q406X *G T G G G A G G C T T A T T T T C T T C A G T T G A G A A G A T T *



p.L562P

G A T G A C T T T G G C G T C T G T G N G A A N C A C C C N N *

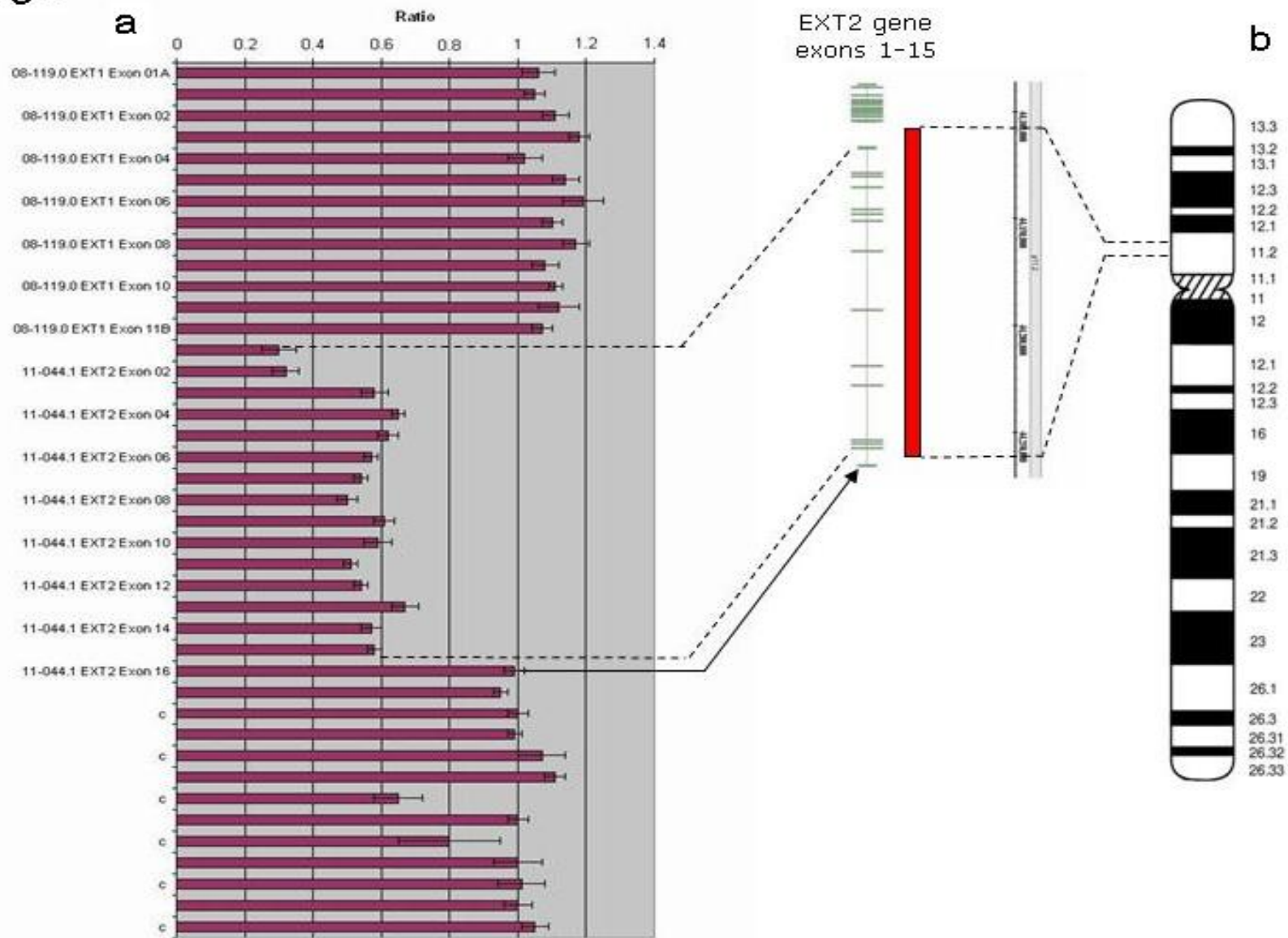


p.W184Y

c.1244_1247delATTT

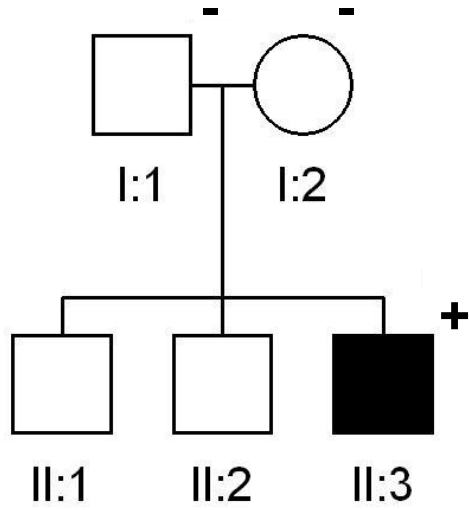
c.362_363delTC

Fig 2

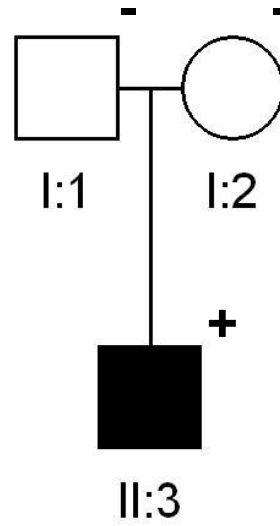


MUTAZIONE	ESONE	GENE	TIPO DI MUTAZIONE
Q700X	11	EXT1	<i>nonsense mutation</i>
L562P	8	EXT1	<i>missense mutation</i>
Y629X	10	EXT1	<i>nonsense mutation</i>
C.913 del.G	5	EXT2	<i>frameshift mutation</i>
c.1244_1247del ATTT	4	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
c.546 del. C	1	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
R340S	2	EXT1	<i>missense mutation</i>
c.369_370 del. AG	1	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
R340C	2	EXT1	<i>missense mutation</i>
C339T	6	EXT2	<i>missense mutation</i>
Q406X	4	EXT1	<i>nonsense mutation</i>
C339Y	6	EXT2	<i>missense mutation</i>
c.968_974 del.7	2	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
Y117X	1	EXT1	<i>nonsense mutation</i>
W184Y	1	EXT1	<i>missense mutation</i>
c.362 del. TC	1	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
S220N	1	EXT1	<i>missense mutation</i>
c.1163_1164 del.AG	1	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
c. 1940_1967del.28 ins CC	10	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
c. 1146_ 1153 del. CAGTTGTC	1	EXT1	<i>frameshift mutation</i>
c. 678 del. C	1	EXT1	<i>frameshift mutation</i>

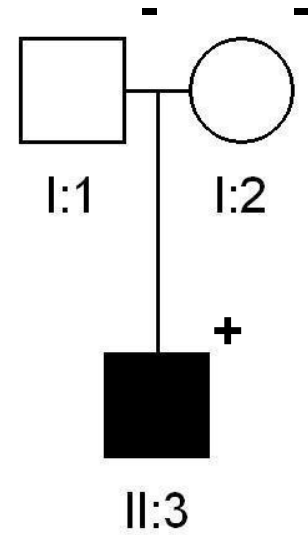
EXT1



L562P

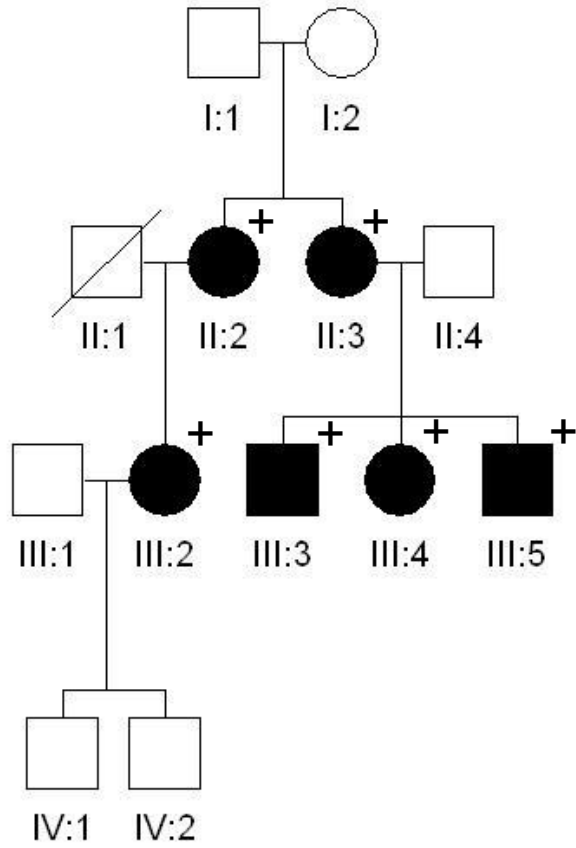


c.1644delC



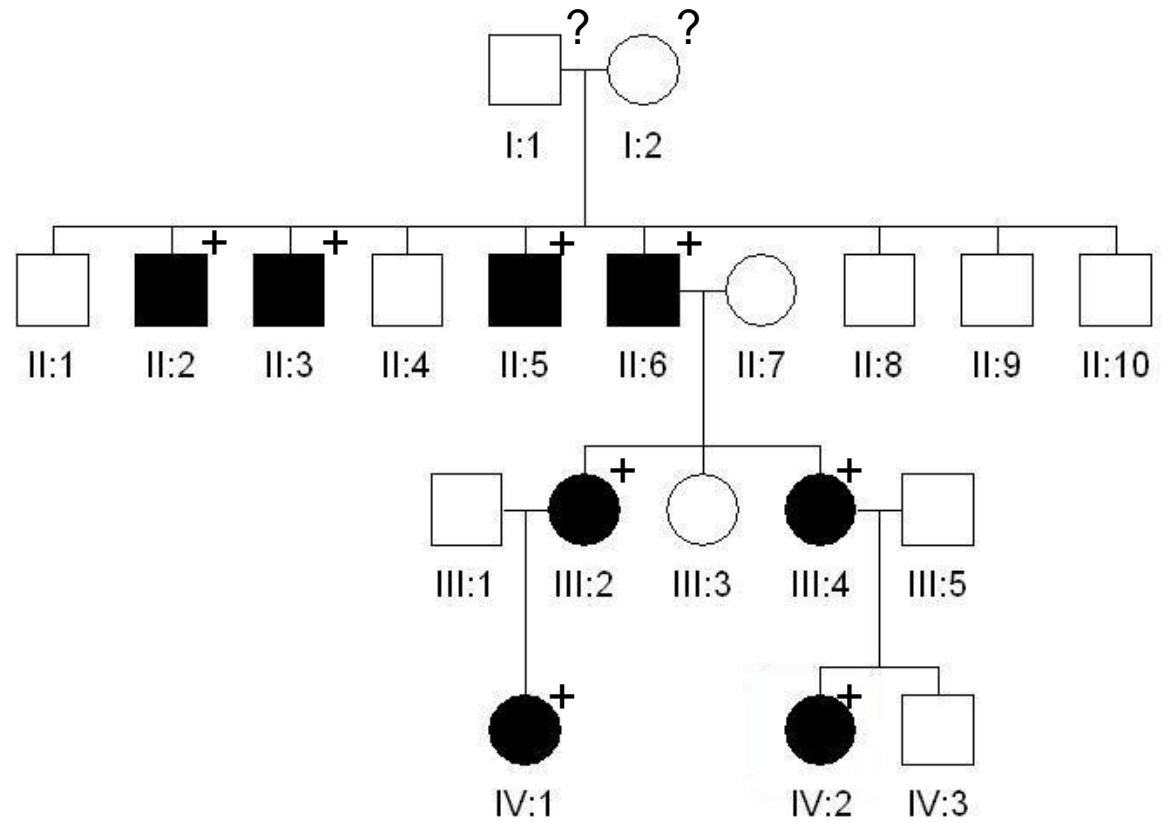
c.369_370delAG

EXT1

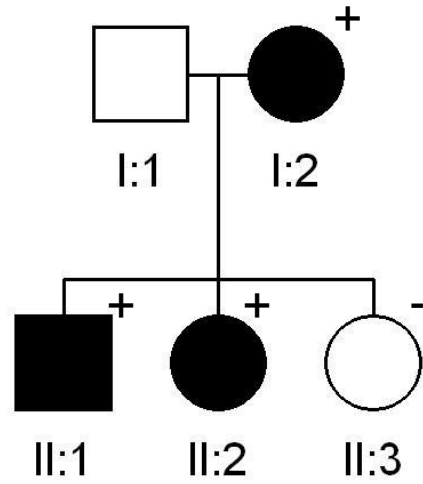


c.1468_1469insG

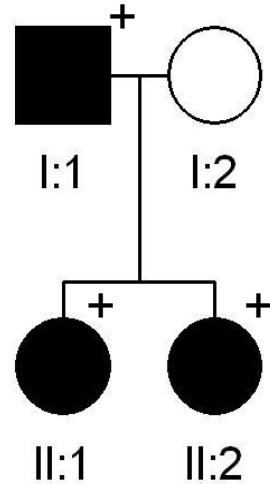
c.1723-1G>T



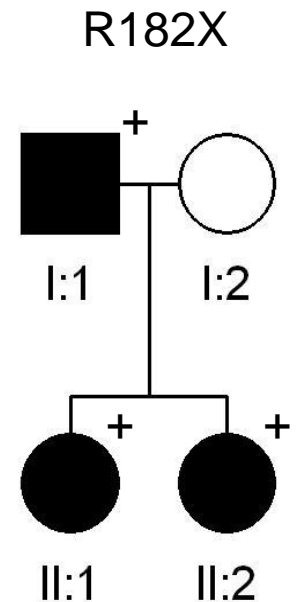
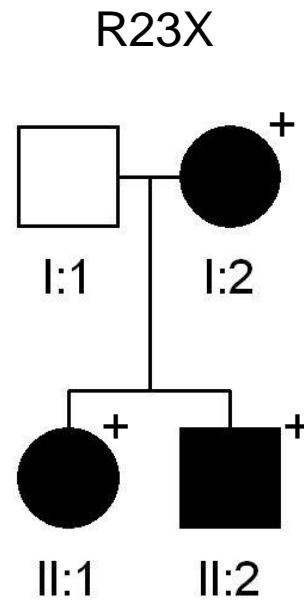
EXT2



K285X



c.913delG

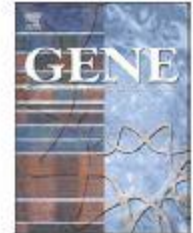




Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene



20 novel point mutations and one large deletion in *EXT1* and *EXT2* genes: Report of diagnostic screening in a large Italian cohort of patients affected by hereditary multiple exostosis

Michele Ciavarella ^{a,1}, Michelina Coco ^{a,1,2}, Filomena Baorda ^a, Pietro Stanziale ^a, Massimiliano Chetta ^b, Luigi Bisceglia ^a, Pietro Palumbo ^{a,c}, Mario Bengala ^d, Paola Raiteri ^e, Margherita Silengo ^f, Camilla Caldarini ^g, Renato Facchini ^g, Roberto Lala ^h, Maria Luigia Cavaliere ⁱ, Davide De Brasi ⁱ, Barbara Pasini ^j, Leopoldo Zelante ^a, Vito Guarnieri ^{a,*}, Leonardo D'Agruma ^a

^a Medical Genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

^b Molecular Stamping (FBK), Department of Molecular Biology, Povo (TN), Italy

^c Dipartimento di Biologia, University of Bari, Bari, Italy

^d Laboratory of Medicine, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Tor Vergata, Rome, Italy

^e ACAR "Associazione Conto alla Rovescia", Rome, Italy

^f Department of Pediatrics, University of Turin Medical School, Turin, Italy

^g Clinica Ortopedica, Presidio Centro Traumatologico Ospedaliero, Milan, Italy

^h Department of Pediatric Endocrinology and Diabetology, University of Turin, Regina Margherita Children's Hospital, Italy

ⁱ Medical Genetics, Azienda Ospedaliera "A. Cardarelli", Naples, Italy

^j Medical Genetics, University of Turin, Turin, Italy

RISULTATI DELLO STUDIO GENETICO SULLE HME (SAN GIOVANNI ROTONDO 2006-2011)

Pazienti esaminati: 90

Famiglie: 30

Mutazioni identificate in 67 pazienti (74,4%)

Mutazioni identificate:67

27 frameshift (40,2%)

16 missense, (23,9%)

17 nonsense(25,4%)

6 mutazioni di splicing (9%)

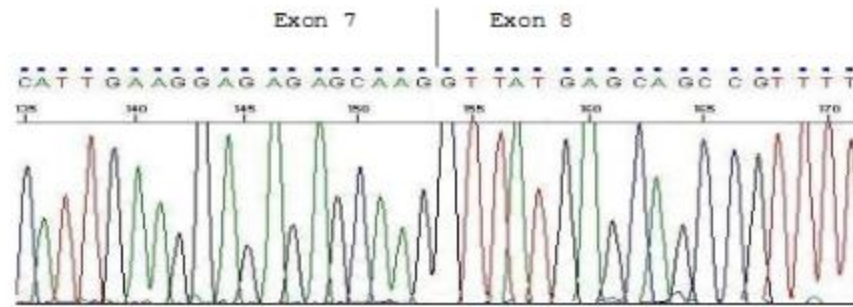
1 delezione del gene EXT2 (1,5%)

21 nuove mutazioni identificate: 20 puntiformi + 1 delezione

Mutazioni in EXT1: 79,2%

Mutazioni in EXT2: 20,8%

c.963-1G>T



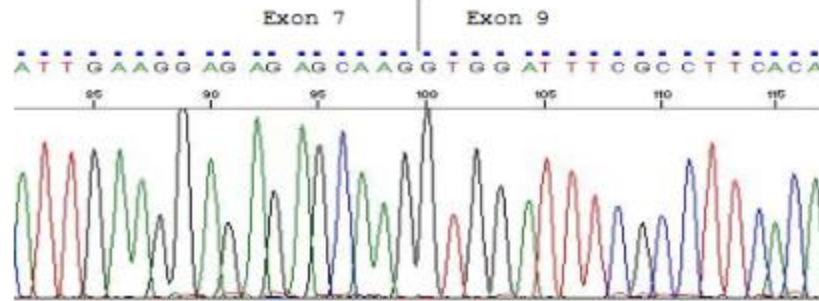
GAAGGAGAGAGCAAGGTTATGAGCAGCCGT [] CTTCAACAACAGAGTGGATTTCGCCTTC

Exon 7 | Intron 7 | Exon 8 | Intron 8 | Exon 9

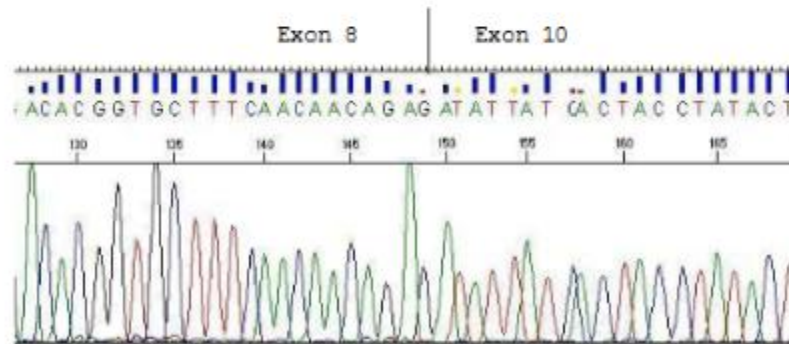
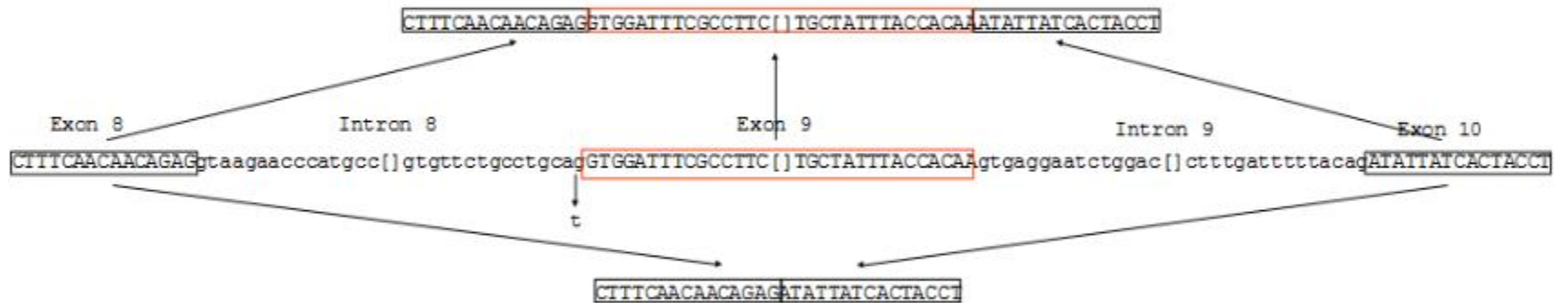
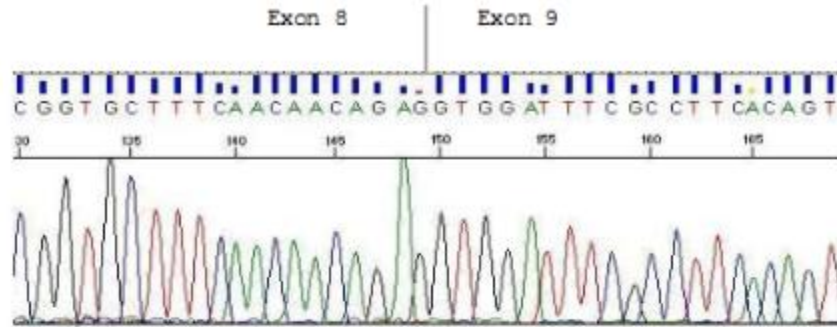
GAAGGAGAGAGCAAGGtaagactcgaaggg [] tctacttctctcccaGTTATGAGCAGCCGT [] CTTCAACAACAGAGgtaagaacctatgcc [] gtgttctgcctgcadTGGATTTCGCCTTC

a

GAAGGAGAGAGCAAGTGGATTTCGCCTTC



c.1722+1G>T



DATI EPIDEMIOLOGICI-GENETICI DELLE HME

- **Mutazioni del gene EXT1 sono più frequenti nei pazienti europei o nord-Americani di origine Caucasica, mentre pazienti cinesi o di origine orientale presentano mutazioni più frequenti in EXT2.**
- **Pazienti con mutazioni del gene EXT1 tendono ad essere colpiti più severamente rispetto a pazienti con mutazioni in EXT2 (altezza, numero di esostosi e ridotta mobilità).**
- **La possibilità di trasformazione maligna dell'esostosi (sarcoma) sembra essere più alta nelle famiglie con mutazioni in EXT1 rispetto a quelle con mutazioni in EXT2.**
- **Pazienti con mutazioni in EXT2 presentano un fenotipo clinico moderato.**

CONSULENZA GENETICA I

- **La diagnosi di HME è basata su dati clinici e/o radiografici che evidenziano esostosi multiple in uno o più membri della famiglia.**
- **Nei bambini e negli adulti affetti è previsto un protocollo clinico annuale di sorveglianza dei siti assiali delle esostosi.**
- **Negli individui adulti è importante il monitoraggio delle dimensioni delle esostosi ed i vari segni di sofferenza articolare o di mobilità ossea. Questo aspetto è da tenere in particolare considerazione per il rischio del 0,5-5 % di sviluppare osteocondrosarcomi.**

CONSULENZA GENETICA II

- **L'analisi molecolare dei geni EXT1 ed EXT2 è possibile nei casi di HME diagnosticata a livello clinico o radiografico.**
- **Un individuo affetto ha una probabilità del 50% di trasmettere la malattia alla discendenza.**
- **Sono descritti casi di HME insorti *de novo*.**
- **La diagnosi prenatale è possibile solo nel caso di mutazione nota nella famiglia e va discussa dal punto di vista etico con il genetista.**

DIAGNOSI PRENATALE

- **VILLOCENTESI (11^a settimana di gestazione)**
- **AMNIOCENTESI (16^a-18^a settimana di gestazione)**

ATTIVITA' PRESENTI E PROSPETTIVE FUTURE

- **Identificazione del terzo gene malattia nelle famiglie senza mutazioni nei geni EXT1 ed EXT2 (10-15 % circa dei casi familiari sono non risolti).**
- **Studio funzionale di mutazioni nei geni EXT1 ed EXT2 per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari alla base del difetto.**
- **Studio della Loss of Heterozigosity (LOH)**
- **Next Generation Sequencing**
- **Migliore comprensione dei processi della crescita ossea: differenziazione prematura dei condrociti che porta alla formazione delle esostosi.**

Servizi offerti dalla Genetica Medica dell'I.R.C.C.S. «Casa Sollievo della Sofferenza» di San Giovanni Rotondo

- Accettazione dei pazienti e delle famiglie
- Consulenza genetica pre-test
- Esame molecolare geni EXT1 ed EXT2
- Consulenza genetica post-test
- Diagnosi prenatale
- Consulenza multispecialistica (pediatra, radiologo, chirurgo ortopedico, fisiatra)

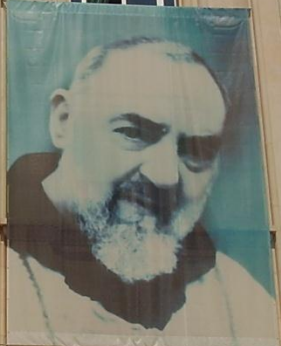




CASA SOLLIEVO DELLA SOFFERENZA

LABORE ET BENEDICTIO
ET MI SODALE
PER SORRELLA CARITATE

ET BONDAGIO ET SERVITIO
ET
CON GRANDE PAVORE





CASA SOLLIEVO DELLA SOFFERENZA
OPERA DI PADRE PIO DA PIETRELCINA
POLIAMBULATORIO GIOVANNI PAOLO II







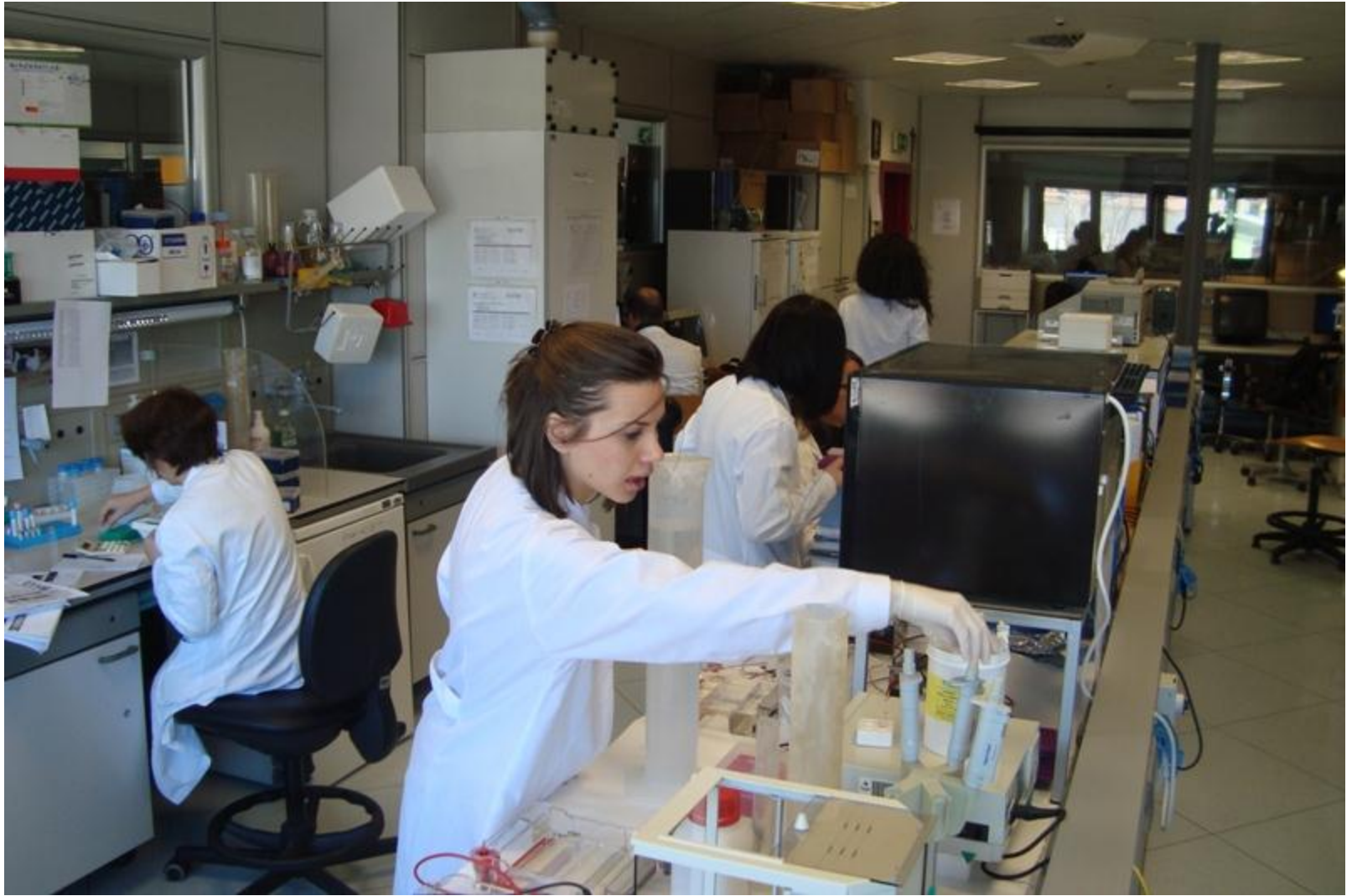




















GRAZIE PER L'ATTENZIONE