



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA,
UNITA' OPERATIVA DI GENETICA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : MEDICINA DELLO SVILUPPO E
SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO: GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE
CICLO: XX

NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1 E GENI MODIFICATORI PREDISPONENTI
L'INSORGENZA DI TUMORI
(GLIOMA DELLE VIE OTTICHE)

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore di indirizzo: Ch.mo Dott. Maurizio Scarpa

Supervisore : Ch.mo Prof. Maurizio Clementi

Dottorando : Sara Tartaglia

INDICE

	Pag
RIASSUNTO-ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	9
1.1 NEUROFIBROMATOSI: GENERALITA'	9
1.2 NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1 (NF1)	10
1.2.1 QUADRO CLINICO	11
1.2.2 GLIOMI	13
1.3 IL GENE NF1	15
1.4 LA NEUROFIBROMINA	17
1.5 LE MUTAZIONI NEL GENE NF1	18
1.6 CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	21
1.6.1 IL GENE CDKN2A	21
1.6.2 LA PROTEINA p16	22
1.6.3 LA PROTEINA p14	24
1.7 TP53	25
1.7.1 IL GENE TP53	26
1.7.2 LA PROTEINA P53	27
1.8 GENI MODIFICATORI	29
1.8.1 NF1 E GLIOMI DEL NERVO OTTICO	30
2. SCOPO DELLA RICERCA	31
3. MATERIALI E METODI	33
3.1 CAMPIONI IN STUDIO	33
3.2 ANALISI DEL GENE NF1	33
3.2.1 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR	33
3.2.2 ANALISI MEDIANTE DHPLC	36
3.2.3 SEQUENZIAMENTO	38

3.3 ANALISI DEL GENE CDKN2A	40
3.3.1 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR	40
3.3.2 ANALISI MEDIANTE DHPLC	43
3.3.3 SEQUENZIAMENTO	44
3.3.4 ANALISI RFLP DEI POLIMORFISMI	
C500G E C540T in 3' UTR DEL GENE CDKN2A	44
3.4 ANALISI DEL GENE TP53	45
3.4.1 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR	45
3.4.2 ANALISI DEI POLIMORFISMI IVS 6+62 G/A E 12256	
G/C NELLA REGIONE DEL PROMOTORE DEL	
GENE TP53 MEDIANTE HRM	47
4. RISULTATI	49
4.1 RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE NF1 MEDIANTE DHPLC	49
4.2 RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE CDKN2A	
MEDIANTE DHPLC	51
4.3 ANALISI RFLP DEI POLIMORFISMI C500G e C540T in 3'	
UTR DEL GENE CDKN2A	53
4.4 ANALISI HRM DEI POLIMORFISMI IVS 6+62 G/A E 12256 G/C	
NELLA REGIONE DEL PROMOTORE DEL GENE TP53	55
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	59
6. BIBLIOGRAFIA	63
7. ALLEGATI	71

RIASSUNTO

Introduzione. La Neurofibromatosi di tipo I, la più comune forma di neurofibromatosi, presenta un'estrema variabilità fenotipica sia inter- che intra-familiare; l'analisi comparativa tra tipo/sede di mutazione e fenotipo non consente di individuare una precisa correlazione tra genotipo e quadro clinico nei pazienti affetti. L'astrocitoma pilocitico del nervo ottico, glioma, è il tumore che insorge più frequentemente in pazienti affetti da NF1. La crescita di questi tumori è di solito lenta e può anche andare incontro a regressione spontanea, tuttavia in un certo numero di casi può continuare a crescere e provocare lesioni a carico delle strutture nervose come cecità o disfunzioni ipotalamiche. Non è ancora chiaro quali cambiamenti molecolari portino all'insorgenza di un glioma delle vie ottiche nei pazienti NF1 né cosa faccia sì che un astrocitoma pilocitico rimanga stabile o progredisca nel tempo danneggiando il tessuto nervoso: alterazioni genetiche associate con la patogenesi e la progressione di tali tumori non sono state infatti ancora caratterizzate.

Scopo della tesi. Questo studio si propone di analizzare un gruppo di pazienti NF1 tutti presentanti glioma delle vie ottiche e un gruppo di soggetti con glioma delle vie ottiche senza diagnosi clinica di NF1 per valutare la presenza di particolari mutazioni a carico del gene NF1, la presenza di mutazioni nel gene onco-soppressore CDKN2A; di analizzare nei campioni in studio e in un campione di controlli sani alcuni polimorfismi noti dalla letteratura nei geni onco-soppressori CDKN2A e TP53, che vengono associati a insorgenza o progressione tumorale; infine valutare i risultati con metodi statistici per stabilire se lo sviluppo del tumore (glioma del nervo ottico) in questo tipo di pazienti possa essere associato alla presenza di determinate mutazioni e/o polimorfismi nei geni analizzati.

Materiali e metodi. Si è effettuato uno screening di mutazioni e/o polimorfismi nei geni NF1, CDKN2A e TP53 in un gruppo di 25 soggetti con diagnosi clinica di NF1, tutti presentanti glioma delle vie ottiche e 21 soggetti con presenza di glioma ipotalamo-chiasmatico delle vie ottiche. Ognuno dei pazienti arruolati per lo studio ha dato il consenso informato per il prelievo di sangue periferico in EDTA e per la successiva analisi molecolare. L'analisi di mutazioni si è effettuata per tutti i pazienti con la tecnica DHPLC e successivo sequenziamento diretto delle alterazioni riscontrate; i polimorfismi nei geni CDKN2A e TP53 si sono invece analizzati nei pazienti e in un campione di 50 controlli sani con le metodiche RFLP e HRMA, rispettivamente.

Risultati. La ricerca di mutazioni nel gene NF1 tramite DHPLC e sequenziamento ha permesso di identificare mutazioni nel 60% dei pazienti con glioma delle vie ottiche e

diagnosi di NF1. Dai risultati osservati sembrerebbe non esserci una tipologia preferenziale di alterazione nucleotidica anche se la maggior parte (67%) delle mutazioni sono alterazioni che provocano la formazione di una proteina tronca. Non si sono evidenziate invece mutazioni nei soggetti con glioma senza diagnosi di NF1. I risultati dell'analisi mutazionale nel gene NF1 confermano quindi la mancanza di una correlazione genotipo (presenza di un certo tipo di mutazioni nel gene) -fenotipo (insorgenza del glioma delle vie ottiche) per i pazienti affetti da NF1.

La ricerca di mutazioni nel gene CDKN2A tramite DHPLC ha permesso di identificare due alterazioni nei soggetti NF1 in analisi, il polimorfismo G442A nell'esone 2, riportato in letteratura ed una sostituzione, non riportata, al 3' UTR del gene (C520G) che potrebbe rappresentare un nuovo polimorfismo.

L'analisi dei polimorfismi C500G e C540T in 3' UTR del gene CDKN2A e IVS 6+62 G/A e 12256 G/C, nella regione del promotore, del gene TP53 è stata effettuata con due diverse metodiche (HRMA e DHPLC)); questo ha consentito di confrontare i risultati ottenuti con le due tecniche rispetto alla RFLP e stabilire che la HRMA può essere considerata un valido strumento per l'analisi degli *SNPs* tale da essere preferibile alla DHPLC per studi futuri. I risultati dell'analisi, valutati statisticamente con il test X^2 applicato alle frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi noti del gene CDKN2A e del gene TP53, analizzati nei pazienti e nel campione di controllo, sembrano escludere un'associazione tra la presenza dei polimorfismi e una predisposizione genetica allo sviluppo dei gliomi del nervo ottico ($P > 0,05$). Tuttavia per la numerosità dei campioni in esame i risultati non si possono considerare definitivi. Sarà dunque importante rivalutare i dati ampliando il campione in studio e il numero di polimorfismi da analizzare.

ABSTRACT

Introduction. Neurofibromatosis type I, the most common form of Neurofibromatosis, presents with a wide phenotypic variability, both inter- and intra-familial; a comparative analysis between type/site of mutation and phenotype cannot identify a correlation between genotype and clinical features in affected patients. Pilocytic astrocytomas (PAs) are the tumors that occur most often in NF1 patients; they affect children and young adults and occur preferentially along the optic pathway. These tumors are defined as Grade I gliomas (low-grade) and their growth is slow, but a small number of these tumors continue to grow, behave in an aggressive fashion and cause loss of vision or hypothalamic dysfunction. It is not known which changes determine whether an NF1-associated pilocytic astrocytoma will remain stable or exhibit a clinical progression: genetic alterations associated with NF1-associated optic glioma pathogenesis have not been well characterized.

Aim of the study. The aim of the study was to analyze a group of NF1 patients affected with optic glioma and a group of patients affected with optic glioma in which the diagnosis of NF1 was excluded, in order to evaluate the presence of specific mutations in the NF1 gene and in the tumor-suppressor gene CDKN2A; to analyze polymorphisms in the tumor-suppressor genes CDKN2A and TP53, that are reported in the literature to be associated with risk and tumor progression, in the study patients and in a healthy control group; to evaluate results with statistical methods; to establish if the glioma formation is associated with some specific mutations or polymorphisms in the studied genes.

Materials and methods. A mutation/SNP screening in NF1, CDKN2A and TP53 genes was performed in 25 NF1 patients affected with optic glioma diagnosis and 21 non-NF1 patients affected with optic glioma. Blood samples were obtained after informed consent from all of the patients and a control group of 50 unrelated adult healthy individuals from the Padova Clinical Genetic Service database. Mutation analysis was done by DHPLC after amplification by PCR of all the exons of NF1 and CDKN2A genes, in all of the patients, and direct sequencing of the samples showing some alteration at the DHPLC analysis. The SNPs analysis was done in CDKN2A and TP53 genes in all the patients and in the control group by RFLP and HRMA, respectively, after amplification by PCR of the target sequences.

Results. Mutation scanning in the NF1 gene by DHPLC analysis has identified mutations in 60% of the NF1 patients with optic glioma diagnosis. A preferential type of nucleotidic alteration was not observed but the majority (67%) of them causes the formation of a

truncated protein. No mutations were found in the non-NF1 patients with optic glioma diagnosis. These results confirm the lack of a genotype–phenotype (optic glioma) correlation in patients affected with NF1. Mutation scanning in the CDKN2A gene by DHPLC analysis has identified two nucleotidic alterations in three NF1 patients: the G442A polymorphism in exon 2, known in the literature, and a new substitution in 3' UTR of the gene (C520G) that could represent a new polymorphism. SNPs analysis (C500G and C540T in 3' UTR of CDKN2A gene and IVS 6+62 G/A and 12256 G/C, in the promoter region of the TP53 gene) was done by two different techniques: RFLP and HRMA, respectively. We have compared the two methods and define that HRMA is a better instrument for SNPs analysis because of its sensitivity and specificity and because it is a cost-effective and simple post-PCR technique. A statistical analysis of allelic and genotypic frequencies of the CDKN2A and TP53 genes polymorphisms in patients and control groups was done using the χ^2 test. The results seem to suggest a non-association between the presence of these SNPs and an increased risk of optic glioma growth in the studied population ($P>0,05$). However the number of individuals analyzed is not sufficient for exhaustive conclusions. Future studies should be done with more polymorphisms and a larger patients group.

1. INTRODUZIONE

1.1 NEUROFIBROMATOSI: GENERALITA'

Il termine “**neurofibromatosi**” si riferisce ad un gruppo di affezioni aventi in comune alcune caratteristiche ma rappresentanti tuttavia delle entità cliniche del tutto distinte.

Sino agli anni '70 spesso non si distinguevano le varie forme e termini quali “*malattia di von Recklinghausen*” o “*neurofibromatosi multipla*” o “*Facomatosi*” venivano usati indifferentemente per descrivere qualsiasi paziente con svariate associazioni di macchie caffelatte e tumori del sistema nervoso centrale e/o periferico.

Le ultime due decadi sono state però fondamentali per la caratterizzazione clinica e molecolare di queste affezioni che si è dimostrato differenziarsi tra loro per decorso, complicanze e geni coinvolti.

Secondo i criteri attuali del “*National Institute of Health*”, si riconoscono due principali forme di NF: la neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) e la neurofibromatosi di tipo 2 (NF2).

NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1 (NF1) (MIM*162200): è la forma più frequente di neurofibromatosi; è caratterizzata da un interessamento cutaneo (presenza di numerose macchie caffelatte, lentiginosi in aree ben determinate del corpo), noduli di Lisch e tumori dei nervi periferici (neurofibromi). E' causata dall'alterazione del gene NF1 presente nel cromosoma 17.

NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 2 (NF2) (MIM*101000): è una forma piuttosto rara di malattia autosomica dominante (con una frequenza di 1 su 33 000 nati), clinicamente e geneticamente distinta dalla NF1; molto raramente infatti si ha la presenza di macchie caffelatte in numero maggiore di 6, non si riscontrano noduli di Lisch ed è caratterizzata da tumori bilaterali del nervo acustico, chiamati “schwannomi vestibolari”, piuttosto che da neurofibromi. Anch'essa è causata dall'alterazione di un gene (il gene NF2) localizzato sul cromosoma 22.

Altre varianti cliniche che sicuramente sono forme alleliche della NF1 sono:

sindrome di Watson (MIM*193520)

macchie caffelatte a trasmissione autosomica dominante (MIM*114030)

neurofibromatosi - sindrome di Noonan (MIM*601321)

neurofibromatosi familiare spinale (MIM*162210).

Esistono altre forme di neurofibromatosi localizzate che sono però piuttosto rare e che necessitano ancora di un ulteriore inquadramento:

neurofibromatosi familiare intestinale (manifestazione di neurofibromi solo a livello intestinale);

neurofibromatosi segmentale (macchie caffelatte e neurofibromi solo in limitate aree del corpo).

1.2 NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1 (NF1)

La NF1 (anche chiamata “*malattia di von Recklinghausen*” o “*neurofibromatosi periferica*” o “*multipla*”), è la più comune forma di neurofibromatosi con un’incidenza in tutte le popolazioni testate, inclusa quella italiana, di 1 su 2 500 - 3 500 nati.

E’ una malattia a trasmissione autosomica dominante a penetranza età-dipendente completa (i segni clinici compaiono progressivamente fino a diventare del 100% all’età di 6-8 anni); l’espressività è anch’essa età dipendente ed è estremamente variabile, anche all’interno della stessa famiglia. Le cause di tale variabilità sono in ordine di importanza:

- il background genetico (polimorfismi che modulano l’entità delle manifestazioni)
- tipo di mutazione-malattia
- fattori ambientali
- presenza di mosaicismi

Il tasso di mutazione spontanea è uno dei più elevati per quanto concerne i disordini genetici umani, ed è stimato tra $1 \cdot 10^{-4}$ e $3,1 \cdot 10^{-5}$ gameti per generazione (Clementi et al., 1990); da 10 a 100 volte maggiore del tasso abituale per un singolo locus.

Inoltre in circa il 50% degli affetti da NF1 non si tratta di una forma familiare della malattia: la frequenza di mutazioni de novo è infatti una delle più elevate tra le patologie genetiche.

La NF1 è una condizione multisistemica che coinvolge una varietà di tessuti e tipi cellulari; le caratteristiche cliniche maggiori riguardano anomalie della pigmentazione cutanea e una vasta varietà di anomalie a livello del sistema nervoso centrale e/o periferico che possono evolvere in tumori benigni o maligni.

La maggior parte delle persone affette da NF1 (circa il 60%) presenta forme lievi della malattia, circa il 20% ha problemi correggibili e il restante 20% complicazioni gravi e persistenti.

1.2.1 QUADRO CLINICO

Clinicamente la NF1 è caratterizzata da tre tipi di manifestazioni cliniche:

1) Segni clinici principali, che si manifestano nella grande maggioranza degli individui e fanno parte dei criteri diagnostici:

- *macchie caffelatte (Cafè au lait spot, CLS)*: chiazze piatte, maculari, a margini netti e forma variabile di colore marroncino chiaro. La diagnosi si effettua con un minimo di 6 chiazze di dimensioni superiori a circa 5 mm di diametro in epoca prepuberale, a 15 mm in epoca postpuberale. Aumentano di numero e grandezza sino ai 5-6 anni ma tendono a scomparire dopo i 20-30;
- *lentiginosi o efelidi*: lesioni simili alle precedenti ma di dimensioni minori (dell'ordine del mm) localizzate a "spruzzo" su ascelle, inguine o alla base del collo o del tronco. Le efelidi ascellari, quando presenti sono considerate diagnostiche;
- *noduli di Lisch*: piccoli amartomi, cioè noduli asintomatici rotondeggianti, di colore giallo- marrone che compaiono poco prima della pubertà nell'iride. Se ne devono individuare almeno due all'esame con lampada a fessura.
- *neurofibromi*: distinti in cutanei e nodulari. I neurofibromi cutanei sono dei noduli rilevati o talvolta peduncolati, di consistenza molle, non più grandi di qualche cm e di colore marrone o violaceo. Istologicamente sono tumori benigni delle estremità terminali dei piccoli nervi cutanei composti da cellule di Schwann, fibroblasti, cellule perineurali, mastociti e cellule endoteliali. Compaiono alla pubertà e si riscontrano in quasi tutti i soggetti adulti affetti dalla NF1. I neurofibromi nodulari o sottocutanei sono molto più rari, interessano i tronchi nervosi periferici o le radici dei nervi e hanno una consistenza duro-elastica palpabile nel tessuto sottocutaneo.

2) Segni clinici minori, presenti in una piccola percentuale di pazienti, tale da non poterli far rientrare tra i criteri diagnostici.

- *macrocefalia*
- *bassa statura*
- *malformazioni toraciche*

- *ipertelorismo*
- *piccoli angiomi localizzati nel tronco o nella coscia*

3) Complicanze, sono rare ma invalidanti e spesso responsabili della gravità della patologia.

- *disturbi cognitivi e dell'apprendimento*: un ritardo mentale vero e proprio è presente solo nel 3-5% dei casi, spesso associato a caratteristiche dismorfiche; si riscontrano disturbi dell'apprendimento con deficit visivo-spaziali, dell'attenzione e della memoria a breve termine che nel 40% dei casi si associano anche a deficit della coordinazione motoria fine e grossolana.

- *neurofibroma plessiforme*: è la lesione più frequente dopo i disturbi dell'apprendimento (nel 25-30% dei casi) e la più grave dal punto di vista clinico. Anatomicamente le lesioni più gravi molto estese, che si localizzano nel volto e nel collo, compaiono entro i primi due anni di vita, mentre in altre sedi possono apparire verso i 20-25 anni di età, causando danni minori. Molto spesso le lesioni a comparsa in età infantile possono estendersi verso l'interno coinvolgendo tronchi nervosi, vasi venosi, arteriosi o linfatici e provocando stasi con edema ed ipertrofia dei tessuti.

Nel 10-15% dei pazienti il neurofibroma plessiforme può evolvere in un tumore maligno della guaina dei nervi periferici ("*malignant peripheral nerve sheath tumor*", MPNST) (Ferner and Gutmann, 2002);

- *neurofibroma diffuso*: è tipico dell'età infantile o dell'adolescenza ed ha un aspetto di una placca di consistenza molliccia, presente nella regione del cuoio capelluto o degli arti, con decorso benigno;

- *complicanze ortopediche*: scoliosi, cifoscoliosi, lordoscoliosi, displasia congenita della tibia, incurvamento posteromediale, fibromi non ossificanti, displasia dello sfenoide, spondilolistesi, ginocchio valgo o varo, difetti della corticale ossea e ipertrofia ossea focale.

- *complicanze neurologiche*: lesioni iperintense nelle immagini alla risonanza magnetica cerebrale (anche dette UBO, *unidentified bright objects*), tumori cerebrali (più frequentemente gliomi, in particolare del nervo ottico, gliomi pontini e cerebellari) e spinali, convulsioni, cefalea, stenosi dell'acquedotto di Silvio, malattia cerebrovascolare, meningocele spinale, neuropatia da NF1.

- *altre complicanze:* ipertensione arteriosa, feocromocitoma, malformazioni cardiache congenite.

(Ruggieri e Tenconi, 2001)

1.2.2 GLIOMI

In generale, i soggetti affetti da NF1 hanno un rischio da tre a quattro volte maggiore di un individuo sano di sviluppare, oltre ai neurofibromi, altri tipi di tumore, come meningiomi o gliomi. Il glioma è la neoplasia del sistema nervoso centrale che si manifesta più frequentemente, in particolare a livello delle vie ottiche, del tronco encefalico e del cervelletto. I gliomi delle vie ottiche si presentano nel 15% dei bambini affetti da NF1 (Listernick et al, 1997) e sono classificati come astrocitomi di grado 1 (raramente di grado 2).

Astrocitomi

Vengono riconosciute diverse categorie di tumori di origine astrocitaria, tra cui l'astrocitoma fibrillare, il glioblastoma multiforme e l'astrocitoma pilocitico.

Astrocitomi fibrillari e glioblastomi multiformi rappresentano circa l'80% dei tumori cerebrali dell'adulto. Hanno solitamente localizzazione emisferica, ma possono insorgere anche nel cervelletto, nel bulbo o nel midollo spinale. I sintomi di esordio sono generalmente cefalee, convulsioni e deficit neurologici.

E' stata riscontrata la correlazione di alterazioni genetiche con la progressione delle neoplasie astrocitarie da basso ad alto grado (generalmente si classificano in tre gradi: astrocitomi ben differenziati, anaplastici e glioblastomi multiformi). Tra le alterazioni genetiche di riscontro più comune nelle forme a basso grado si ha l'inattivazione di p53; la transizione a tumori di grado più alto è associata ad ulteriore danneggiamento dei geni oncosoppressori RB e CDKN2A.

Gli Astrocitomi pilocitici si distinguono dagli altri per le caratteristiche morfologiche e per il comportamento generalmente benigno. Si verificano tipicamente in giovane età con localizzazione cerebellare, nei nervi ottici e, raramente, negli emisferi cerebrali.

Tali tumori sono tipicamente cistici e ben circoscritti, l'accrescimento è molto lento e si può avere una sopravvivenza di oltre 40 anni. (Robbins, Basi patologiche delle malattie, 2000)

Il glioma delle vie ottiche, frequente in pazienti NF1 (il 50-70% dei pazienti con glioma del nervo ottico sono affetti da NF1), può causare rigonfiamento o tortuosità a carico del nervo ottico, può estendersi al chiasma ottico o coinvolgere il nervo controlaterale. L'età di insorgenza in pazienti affetti da NF1 è tra i 5 e i 10 anni e circa il 20% dei soggetti con NF1 che esegue risonanza magnetica (RM) cerebrale può presentare tale tipo di lesione (Figura 1.4); il 75% dei gliomi del solo nervo ottico tende ad essere diagnosticato nella prima decade di vita.

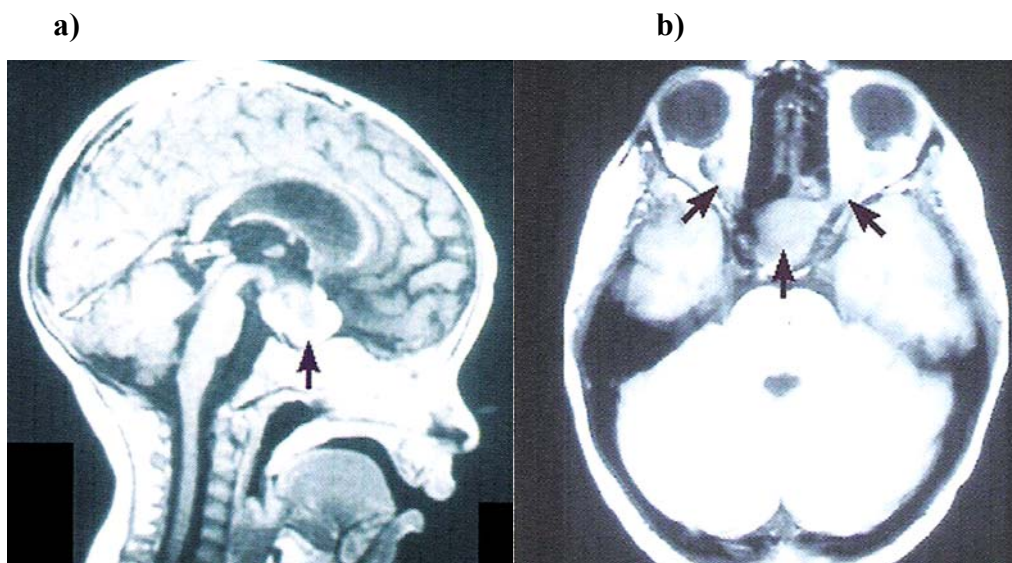


Figura 1: a) Glioma del chiasma ottico. b) Glioma del chiasma e nervi ottici.
(Ruggieri e Tenconi, 2001)

La crescita di questi tumori è lenta, e può in alcuni casi andare incontro a regressione spontanea in pazienti affetti da NF1. Nei rari casi più aggressivi questi gliomi si accompagnano a deficit visivo o di percezione dei colori, strabismo o anomalie della pupilla, perdita della vista e, se a localizzazione ipotalamo-chiasmatica, pubertà precoce. Il glioma delle vie ottiche in un soggetto affetto da NF1 si comporta quindi in modo molto diverso dal glioma isolato: in soggetti non NF1, infatti, il glioma è più aggressivo e progredisce più frequentemente estendendosi verso il chiasma.

Nella maggioranza dei casi la prognosi dei bambini con NF1 affetti da glioma è ottima, e non si ha perdita della vista o altri gravi problemi neurologici.

Uno studio recente riporta che in un campione di 100 pazienti pediatrici osservato per un periodo di 4 anni, la percentuale di insorgenza del glioma delle vie ottiche è pari al 5% e che in tutti i casi è risultato sintomatico (Bonnemaison et al, 2006). Pertanto ipotizza che i

dati riportati comunemente in letteratura riguardo i glomi della NF1 (15-20%) includono probabilmente casi di ispessimento del nervo ottico senza un vero e proprio carattere patologico.

1.3 IL GENE NF1

Il gene NF1 fu isolato tramite clonaggio posizionale. Seizinger et al (1987) riportarono per primi un linkage del gene NF1 con il gene NGFR (“nerve growth factor receptor”), localizzato in posizione 17q22; successivamente White et al (1987) osservarono che un nuovo marcatore (pHHH202), che mappa in 17q11.2, era molto vicino al gene NF1. Altre analisi di linkage effettuate da otto diversi teams di ricerca con 31 marcatori localizzarono chiaramente il gene in posizione prossimale sul braccio lungo del cromosoma 17.

Tuttavia la prova dell’esatta localizzazione genica si ebbe grazie agli studi riportati da Schmidt (1987) e Ledbetter (1989) su due pazienti NF1 portatori di due traslocazioni bilanciate: $t(1;17)(p34.3;q11.2)$ e $t(17;22)(q11.2;q11.2)$. Entrambi i pazienti infatti presentavano i punti di rottura delle traslocazioni in 17q11.2, proprio nella posizione in cui il gene NF1 era stato mappato, e perciò si ritenne che fossero queste interruzioni nel gene a causare la patologia per perdita della funzione genica (Cawthon et al, 1990).

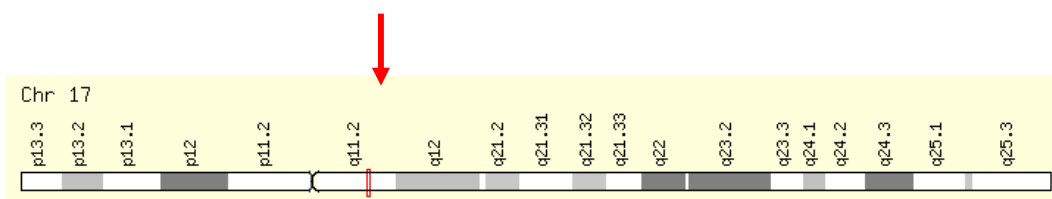


Figura 2. Localizzazione del gene *NF1* sul cromosoma 17 (17q11.2).

Il gene NF1 è lungo circa 350 kilobasi, comprende in tutto 60 esoni, con introni che hanno dimensioni variabili da 60 pb a più di 40 kb.

Il trascritto è di 11-13 kb ed è espresso un po’ ovunque sebbene i tessuti predominanti siano quelli che originano dalla cresta neurale. Il trascritto codifica per una proteina di 2818 amminoacidi chiamata **neurofibromina**, con una massa molecolare di 327 kDa. La proteina presenta una regione di 360 amminoacidi, denominata **NF1-GRD** (*GAP related domain*), che mostra un’omologia con il dominio catalitico delle “*GTPase activating*

protein” (GAP) dei mammiferi. Il dominio NF1-GRD è codificato dalla porzione centrale del gene, compresa tra gli esoni 21 e 27a, costituisce il 13% dell’intera sequenza codificante e svolge una regolazione negativa sull’attivazione di *ras* e quindi sulla crescita cellulare. (Hattori et al, 1992).

All’interno dell’introne 27 del gene NF1 si trovano tre piccoli geni (ciascuno di due esoni) che vengono trascritti in direzione opposta a NF1: **EVI2A** ed **EVI2B** (omologhi umani di geni che si pensa vengano attivati da inserzione retrovirale in leucemie murine) e **OMGP** che codifica per una glicoproteina mielinica oligodendrocitica espressa in cellule di Schwann e oligodendrociti (Upadhyaya et al, 1994).

Il gene NF1 presenta inoltre quattro trascritti, che originano da tre siti di splicing alternativo e che danno luogo a quattro diverse isoforme della neurofibromina. La più importante viene chiamata **GRDII**, poiché ha un’inserzione di 63 pb nel dominio GRD del gene (esone 23a); la neurofibromina di tipo III presenta invece un’inserzione di 54 bp (esone 48a) e la tipo IV un’inserzione di 30 bp (esone 9a). L’espressione delle due isoforme principali, GRDI e II, sembra essere associata con lo stato di differenziazione di un particolare tessuto: GRDI si è trovata in predominanza nel cervello fetale e in tumori primitivi neuroectodermici non differenziati, mentre GRDII in cervello adulto e cellule differenziate (Shen et al, 1996). Le forme III e IV possiedono invece un’espressione ristretta alla muscolatura cardiaca e scheletrica (Gutmann et al, 1995).

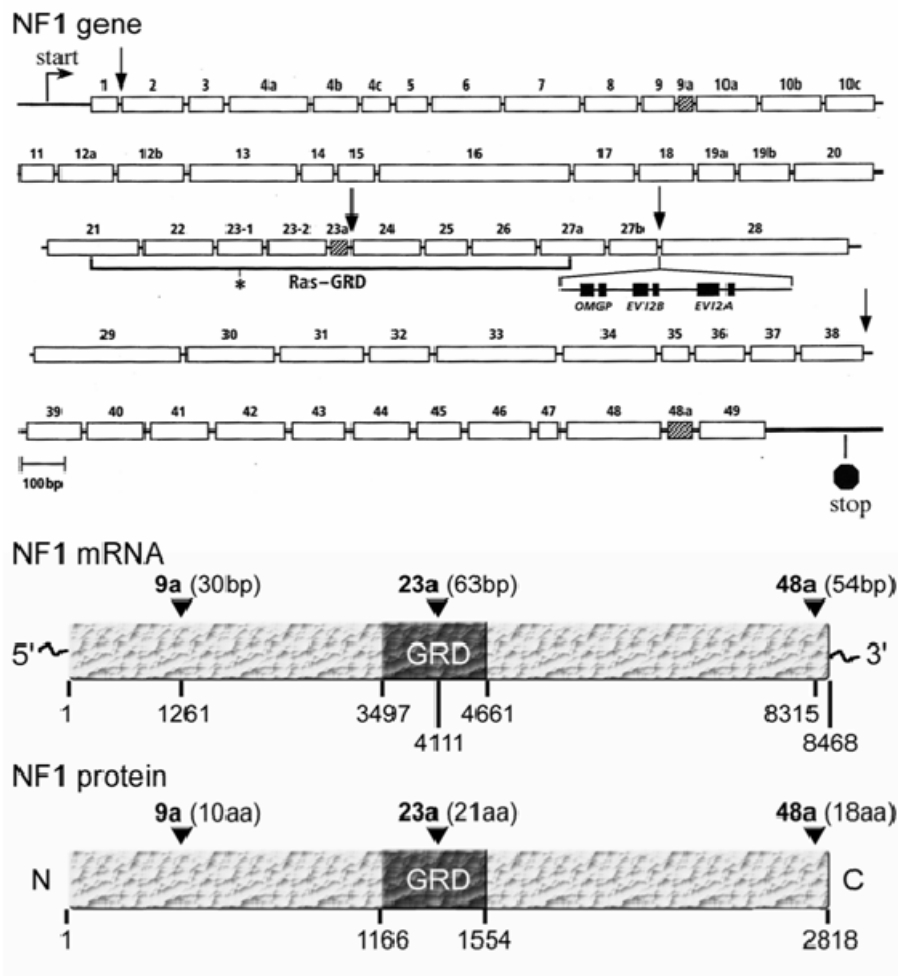


Figura 3. Organizzazione del gene *NF1* in esoni. 9a, 23a e 48a sono gli esoni aggiuntivi osservati nelle diverse isoforme del trascritto, dovute a *splicing* alternativo nel gene.

1.4 LA NEUROFIBROMINA

Il prodotto proteico del gene NF1 è la neurofibromina, una proteina espressa in abbondanza in neuroni, oligodendrociti e cellule di Schwann, mentre in minor misura in milza, fegato, timo, muscoli scheletrici, polmoni e pelle (Daston et al, 1992).

La massa molecolare osservata della neurofibromina è di 220-230 kDa, più piccola di quella predetta in base all'open reading frame del gene NF1 (di 327 kDa): questa discrepanza sembra però essere dovuta a fenomeni di "protein-folding" durante l'elettroforesi, dato che non ci sono evidenze di fenomeni di glicosilazione post-traduzionale o processazione della proteina stessa (Shen et al, 1996). La neurofibromina mostra un'omologia di 360 residui aminoacidici con il dominio catalitico delle "GTPase activating protein" (GAP) dei mammiferi. Tutte le GAP interagiscono con l'attività delle

proteine codificate dai geni *ras* fungendo da loro inibitrici o effettrici nei processi di trasduzione del segnale cellulare. I geni che codificano queste proteine sono più di 30 e vengono classificati tra i proto-oncogeni. I tre geni *ras* più importanti e strettamente legati tra loro (*H-ras*, *K-ras* e *N-ras*) codificano una proteina di 21 kDa, chiamata p21^{ras} che lega i nucleotidi guanidinici con alta affinità e possiede una intrinseca attività GTPasica: è attiva nello stato legato a GTP, spenta nello stato legato a GDP. Questa sorta di interruttore molecolare gioca un ruolo critico nel controllo della crescita e della differenziazione cellulare; mutazioni attivanti in *ras* portano a un segnale aberrante di proliferazione cellulare e sono coinvolte nella genesi di molti tumori maligni umani. (Shen et al, 1996)

Analisi biochimiche hanno dimostrato che il dominio GRD della neurofibromina (NF1-GRD) ha la capacità di accelerare la conversione della p21^{ras} attiva alla forma inattiva, stimolando un aumento nel tasso di idrolisi del GTP, e in questo modo riducendone l'attività.

Il dominio GRD della neurofibromina rappresenta però solo circa il 10% dell'intera molecola. Altri domini riconosciuti sono il CSRD, "cysteine/serine rich domain" (che è codificato dagli esoni 11-17 e che sembra essere fosforilato dalla PKA a livello di tre residui oltre che avere tre cisteine suggestive di legame con ATP [Mattocks et al, 2004]) il dominio "Sec14p homology" (negli esoni 27b-28, che è un dominio di omologia con domini di legame con lipidi quali fosfatidil-inositolo e fosfatidil-colina [Aravind et al, 1999]) e il "nuclear localization signal" (esone 43) (Vandenbroucke et al, 2004).

1.5 LE MUTAZIONI NEL GENE NF1

Le analisi del gene *NF1* per la ricerca di mutazioni sono ostacolate da molti fattori (Lakkis et al., 2000):

- a) le grandi dimensioni del gene rendono difficile la scansione dell'intera sequenza;
- b) la presenza dell'allele normale e l'esistenza nel genoma di molti pseudogeni *NF1* interferiscono nelle analisi con PCR e *Southern blot*, a causa della co-amplificazione delle sequenze omologhe dei *loci* pseudo-*NF1*;
- c) la mancanza di *hot spots* mutazionali ben definiti, dato che le mutazioni insorgono abbastanza casualmente lungo tutto il gene *NF1*;
- d) l'ampia variazione nel tipo e nelle dimensioni delle mutazioni richiede l'utilizzo di molti metodi di indagine diversi e complementari.

Le mutazioni a carico del gene NF1 risultano essere molteplici e di diversa tipologia, tra le quali estese delezioni genomiche che rimuovono l'intero gene e le sue regioni fiancheggianti (più di 1,5 Mb, responsabili di meno del 5% dei casi di NF1) oppure sostituzioni di singole basi (circa il 67% delle variazioni riscontrate) (Mattocks et al., 2004).

E' possibile escludere che la causa principale dell'alto tasso di mutazioni misurato sia la presenza dei numerosi pseudogeni; la responsabilità maggiore si può imputare alle grandi dimensioni del gene: il tasso di mutazioni, infatti, è paragonabile, anche se più elevato, a quello di altri geni di dimensioni simili (Fashold et al., 2000).

In generale, lo spettro di mutazioni del gene *NF1* sembra molto simile a quello di altri oncosoppressori, caratterizzati da una proporzione rilevante di mutazioni troncanti.

Le mutazioni missenso sembrano raggrupparsi in due regioni: nel dominio GRD e in quello CSRD. Buona parte delle mutazioni riscontrate sono puntiformi, oppure altri tipi di piccole lesioni accomunati dalla caratteristica di introdurre codoni di terminazione (PTCs) della sintesi proteica prematuri (Fashold et al., 2000).

La quota di mutazioni *frameshift* e non senso che ci si aspetta interrompano il codice di lettura, si aggira attorno al 49% delle mutazioni totali e sembrano essere omogeneamente distribuite lungo tutta la sequenza di *NF1*, fatta eccezione per i tre esoni originati dallo *splicing* alternativo, 9a, 23a, e 48a, finora apparentemente privi di mutazioni (Fashold et al., 2000; Messiaen et al., 2000; Han et al., 2001; Ars et al., 2003).

Rilevante è l'effetto che le mutazioni comportano a livello dell'mRNA: circa la metà delle mutazioni causano alterazioni nello *splicing*; i difetti di processamento del messaggero si propongono come il difetto molecolare più comune nella NF1 (Mattocks et al., 2004).

Le alterazioni possono interessare sia i canonici siti donatori (GT) e accettori (AG), sia posizioni meno conservate, oppure possono creare nuovi siti di *splicing* (ss). Inoltre, circa la metà delle mutazioni a carico dello *splicing* dell'mRNA indurrebbero la formazione di trascritti *in frame* che risulterebbero in una proteina presunta leggermente più corta o più lunga dell'autentica neurofibromina, ma non troncata (Ars et al., 2003).

Appare probabile che tutte le regioni del gene *NF1* siano soggette a mutazioni allo stesso modo, ma, se i dati relativi alla presenza di alterazioni in un determinato esone vengono pesati rispetto alla percentuale di sequenza codificante che occupa, alcune regioni risulteranno siti a notevole densità di mutazione, ad esempio gli esoni 4b e 37 (Fashold et

al., 2000) e 10a, 10b e 10c (Messiaen *et al.*, 2000). Il test χ^2 , applicato per comparare la frequenza osservata di mutazioni rispetto a quella attesa per ogni esone, ha dimostrato che, effettivamente, ci sono aree del gene *NF1* che hanno una maggiore tendenza ad accumulare alterazioni (Ars *et al.*, 2003). Una spiegazione potrebbe trovarsi nella presenza in tali esoni di alcuni elementi strutturali inclini alla mutazione, come brevi sequenze ripetute in tandem (esone 4b) o elementi quasi simmetrici (esone 37). Pertanto, data la ricorrenza di mutazioni missenso e delezioni *in frame*, le regioni GRD e CSRD rappresenterebbero degli *hot spot* mutazionali, coerentemente con il loro importante ruolo funzionale (Mattocks *et al.*, 2004).

Uno studio eseguito da De Luca *et al.* (2004) ha previsto l'analisi molecolare di 110 pazienti non correlati. Sono state evidenziate mutazioni nel 68% dei pazienti analizzati, di cui 22 *de novo* e 23 ricorrenti (a conferma dell'ipotesi che la presenza di mutazioni ricorrenti non è poi così inusuale in affetti da NF1). Il 53% di queste mutazioni ricorrenti è dovuto a transizioni C>T o G>A in dinucleotidi CpG. Dai risultati ottenuti si ricava che nonostante le mutazioni siano distribuite lungo tutta la sequenza genica, si possono comunque evidenziare dei *cluster* di mutazioni: il 68% delle mutazioni osservate infatti sono risultate localizzate in 12 esoni e/o introni fiancheggiati: 4b, 7, 10a, 11, 15, 16, 23-1, 29, 31, 36, 37, e 45.

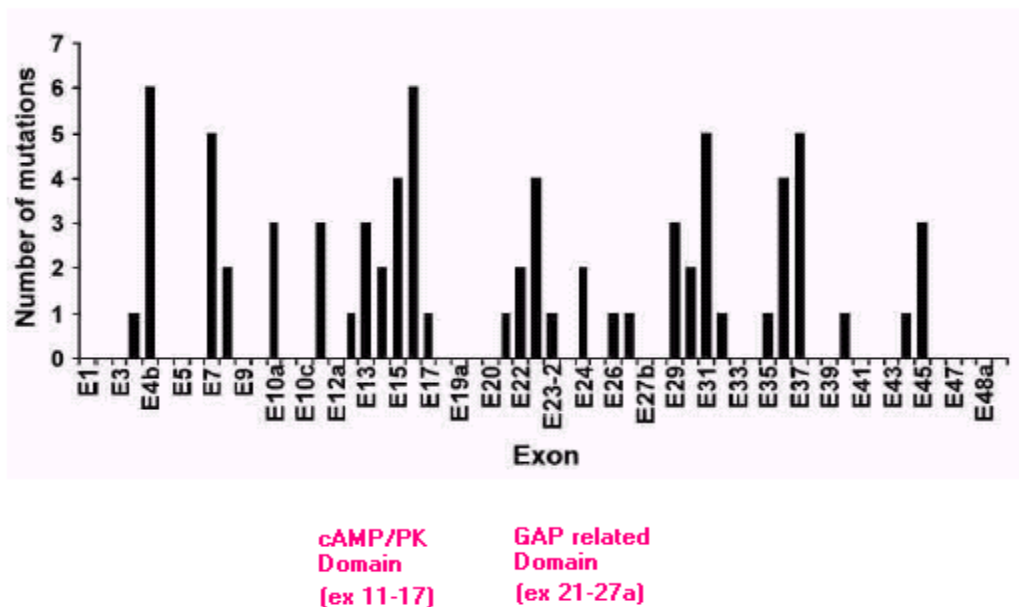


Figura 4: Distribuzione di mutazioni nel gene *NF1* in 75 pazienti affetti da Neurofibromatosi tipo 1 (tratto da De Luca *et al.*, 2004).

1.6 CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

1.6.1 IL GENE CDKN2A

I ricercatori Cannon e Albright, all'inizio degli anni '90, grazie a studi di linkage, identificarono la regione cromosomica 9p13-p22 come sede di un locus, situato tra il marcatore D9S126 e il gene per IFN- α (Interferone alfa), che controllava la predisposizione al melanoma familiare e probabilmente conteneva un gene oncosoppressore; in seguito il locus fu ristretto alla regione contenuta tra i due marcatori D9S171 e D9S736, all'interno della regione precedentemente individuata (Cannon-Albright et al. 1992, 1994).

L'identificazione del gene oncosoppressore in 9p avvenne successivamente, grazie allo sviluppo della strategia di analisi genetica nota come "positional cloning", modificata per la ricerca di delezioni omozigoti in cellule neoplastiche.

Questa complessa procedura permise di isolare un frammento di DNA che conteneva due sequenze correlate definite *multiple tumor suppressor 1* e 2 (MTS1 e MTS2). Una di queste conteneva gli esoni di un gene precedentemente identificato: CDKN2A (a cui sono stati attribuiti vari nomi, come p16, MTS1, INK4A, CDKN2), un *tumor suppressor gene* che risulta frequentemente mutato o deletato in molti carcinomi sia sporadici che familiari (Kamb et al, 1994).

Il gene è localizzato sul cromosoma 9, in posizione 9 p 21.3 (Nobori et al. 1994) ed è lungo 26.739 basi.

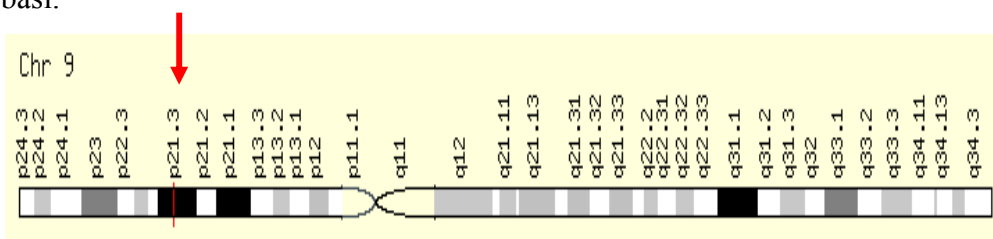


Figura 5: Cromosoma 9 e localizzazione del gene CDKN2A.

Sia il gene umano CDKN2A che gli omologhi in topo (cromosoma 4) e in ratto (Cromosoma 5) codificano per due distinte proteine tradotte da mRNA generati da splicing alternativi.

Dal gene derivano quattro mRNA alternativi: il primo, il secondo e il terzo, rispettivamente di 470, 317, 350 basi, codificano per tre isoforme della proteina p16;

mentre il quarto, di 521 basi, origina da un esone 1 alternativo, codificato da un mRNA che viene trascritto più a monte nel gene e che produce una proteina diversa (p14).

p16 (o INK4a), inibitore delle cicline chinasi dipendenti (CDK), da cui il locus prende il nome, è tradotto da un mRNA contenente gli esoni 1 α , 2 e 3 (detto perciò trascritto α). Il trascritto β , alternativo, produce invece la proteina p14ARF (Alternative Reading Frame), ed è codificato dagli esoni 1 β , e dagli stessi esoni 2 e 3 di p16; gli esoni 1 α e 1 β non mostrano alcuna omologia.

La sequenza primaria delle due proteine è dunque diversa, in quanto esse sono prodotte traducendo il comune esone 2 con un diverso reading frame (Stott et al, 1998).

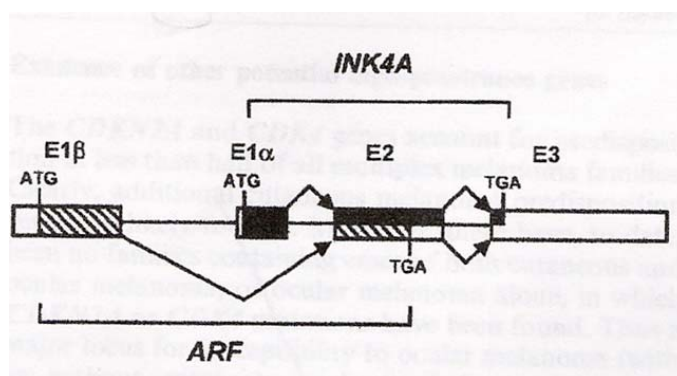


Figura 6: Trascritti alternativi del gene CDKN2A.

1.7.3 LA PROTEINA p16

La proteina p16, scoperta nel 1993 in fibroblasti umani trasformati con il DNA del virus tumorale SV40, è una proteina a localizzazione nucleare espressa quasi ubiquitariamente, soprattutto in fegato, pancreas, prostata, polmoni, reni (Xiong et al, 1993, Serrano et al, 1993).

E' composta da 156 aminoacidi con un peso molecolare di 16,5 KDa (da cui il nome p16).

La sua struttura è principalmente in α elica e forma quattro ripetizioni denominate

“ ANK repeats”, generalmente consistenti come struttura secondaria in beta-alfa-alfa-beta, motivo ricorrente in numerose proteine, principalmente negli eucarioti.

La proteina p16 appartiene alla famiglia degli inibitori di CDK, fu scoperta in un complesso che comprendeva PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), ciclina D e la chinasi ciclina-dipendente CDK4. Successivamente si è chiarito che p16 è una subunità regolatrice negativa di CDK4 e di CDK6 .

p16 appartiene alla famiglia degli inibitori INK4 (Perrone et al, 2003), che non agiscono sul complesso ciclina-CDK, ma sull'enzima monomeric. L'inibitore si lega a CDK in una zona opposta rispetto al sito di legame per la ciclina, il legame con p16 provoca una distorsione dei vari domini dell'enzima, che non trovandosi più allineati rispetto all'asse di simmetria verticale, non permettono più alla ciclina di interagire con CDK.

Inoltre si è osservato che l'interazione tra gli inibitori e CDK provoca una distorsione del sito catalitico che pur non determinando la perdita di elementi necessari per il legame con l'ATP, ne causa una notevole perdita di affinità per il legame stesso (Russo et al. 1998).

La funzione di p16 come inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti lo configura come prodotto di un gene oncosoppressore in quanto in sua mancanza viene meno un controllo negativo sulla proliferazione cellulare (Rutter et al, 2003). Inibendo il legame ciclina-CDK infatti, p16 impedisce la fosforilazione di pRb, che resta così legato al fattore di trascrizione E2F, bloccando la crescita cellulare. In caso di malfunzionamento o mancanza di p16, pRb sarebbe sempre fosforilata e E2F costitutivamente attiva, portando a proliferazione cellulare incontrollata.

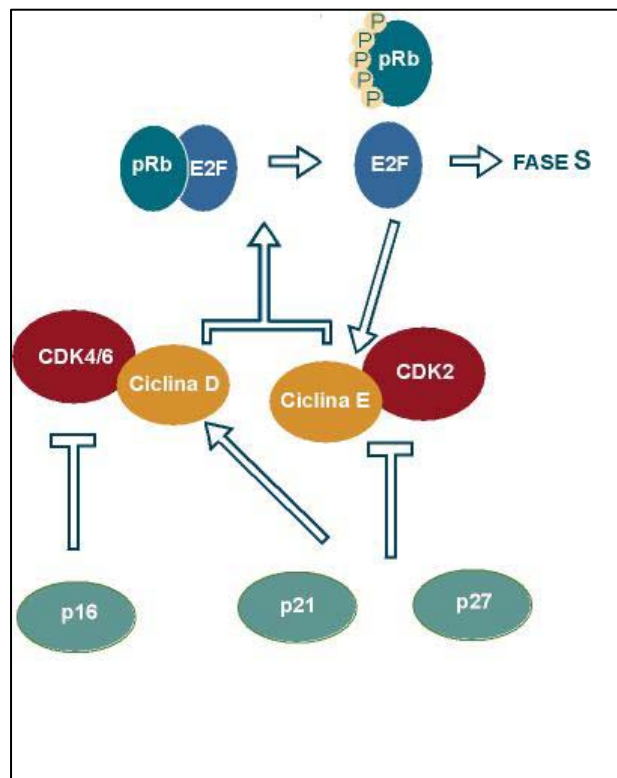


Figura 7: meccanismo di azione della proteina p16 nella regolazione della proliferazione cellulare.

1.7.4 LA PROTEINA p14

La maggior parte delle informazioni su p14ARF sono dovute a studi sull'omologo in topo, che fu scoperto per primo e fu chiamato p19ARF.

La proteina p14ARF, viene trascritta a partire dall'esone 1 β anziché 1 α , i due esoni non presentano alcuna omologia, anzi l'esone 1 β ha le caratteristiche di un gene distinto che sia stato inserito tra il gene di p16 e quello vicino codificante per p15 (Larsen et al, 1996).

Non si hanno molte informazioni su questa proteina, la maggior parte delle informazioni riguardano il suo omologo murino, il cui trascritto β fu scoperto da Quelle et al nel 1995; fu proprio tale ricercatore a dimostrare che questa nuova proteina, pur non interagendo come p16 con le CDK, è comunque in grado di svolgere una funzione di oncosoppressore promuovendo l'arresto del ciclo cellulare.

La sequenza dell'esone umano 1 β fu ottenuta da una combinazione di analisi sul DNA con procedure di clonaggio e approcci che impiegavano PCR, nel 1995 da Mao et al.

La proteina p14 ARF è una proteina nucleare, comprende 132 aminoacidi, con un peso molecolare di 13,9 KDa; il modello di struttura proposto comprende maggiormente ripiegamenti in α elica, in modo simile a p16 (Stott et al. 1998).

La caratterizzazione funzionale di p14ARF è stata influenzata inizialmente dagli studi effettuati su p16 (che si lega direttamente alle CDK), si pensava quindi che anche la funzione della p14 fosse la stessa.

In esperimenti condotti da F.J Stott e collaboratori, nel 1998, tuttavia, nel caso dell'espressione ectopica di p15 o p16, le cellule si accumulavano bloccate in fase G0 o G1, nel caso di p14 invece in G1 o G2/M (Stott et al,1998).

Questo perché il meccanismo d'azione di p14 è diverso da quello di p16: nonostante funga comunque da inibitore, essa infatti agisce a livello di un'altra via di *signalling* in grado di arrestare il ciclo cellulare, quella di p53.

Si è dimostrato che l'arresto del ciclo promosso da p14 è accompagnato da una *up-regulation* di p53 e di MDM2; inoltre cellule tumorali p53 negative sono insensibili agli effetti di p14. Tutte le evidenze sperimentali suggeriscono quindi un legame inibitorio diretto tra p14 e la proteina MDM2 (Stott et al. 1998).

p14 agisce a livello dei nucleoli, legandosi direttamente alla proteina MDM2 e sequestrandola impedendo così il suo legame al complesso p300/p53 che porterebbe alla degradazione ubiquitina mediata di p53 o alla sua inattivazione.

La proteina p14 agisce quindi come *tumor suppressor gene*, impedendo la degradazione dell'oncosoppressore p53 e la crescita incontrollata delle cellule, mantenendo una p53 attiva a livello del nucleoplasma (Perrone et al, 2003).

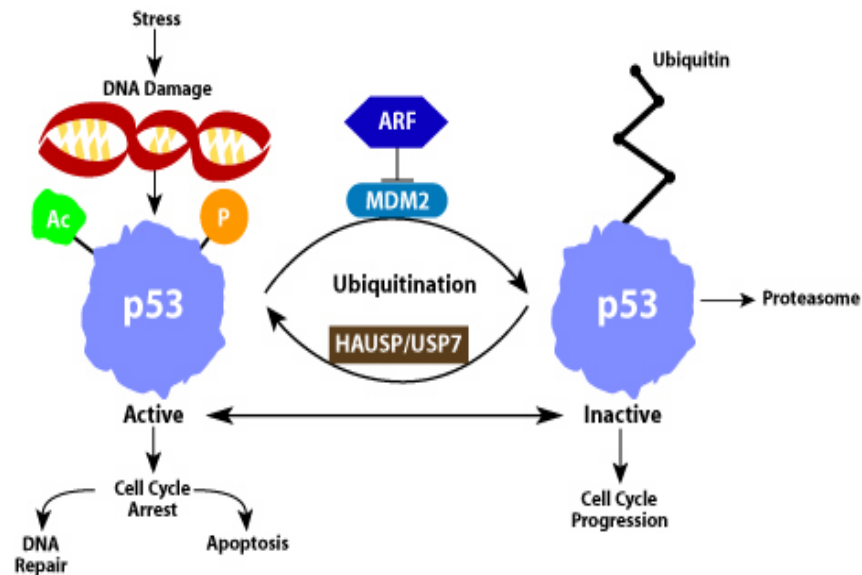


Figura 8: meccanismo di azione della proteina p14ARF nella regolazione della degradazione di p53.

1.8 TP53

Alcuni studi verso la fine degli anni '70 rivelarono che una fosfoproteina con una massa molecolare relativa di circa 53 Kdalton formava un complesso con l'antigene T del virus SV40 di scimmia; da qui fu chiamata proteina p53 (Lane et al, 1979; DeLeo et al, 1979). Lavori successivi stabilirono che p53 formava complessi anche con altri prodotti di virus oncogeni e che p53 risultava essere presente a bassi livelli in cellule normali e ad alti livelli in molti tumori e linee cellulari tumorali (DeLeo et al, 1979; Crawford et al, 1984).

L'osservazione che la LOH del cromosoma 17p era comune in diversi tipi di tumori (incluso cancro del colon-retto, della vescica, della mammella e dei polmoni) portò a pensare che in questa regione ci fossero dei geni importanti per il controllo dello sviluppo dei tumori; in effetti poi una mappa dettagliata della regione di 17p che veniva persa nei casi di cancro al colon-retto, dimostrò che in questa regione era incluso il gene per p53 (Baker et al, 1989). L'analisi della sequenza dell'allele di p53 rimasto, in seguito alla perdita di eterozigotà, evidenziò inoltre che questo era mutato, in perfetto accordo con

l'ipotesi di Knudson del *two-hits* per i geni oncosoppressori. Queste osservazioni furono estese ad altri tipi di tumori, confermando la teoria che TP53 è un *tumor suppressor gene* (Masuda et al, 1987; Ahuja et al, 1989; Eliyahu et al, 1988).

Basandosi sui diversi tipi di tumori in cui si sono trovate mutazioni in p53 e sulla prevalenza delle mutazioni di p53 in questi tumori, si pensa ad oggi che TP53 sia il gene più frequentemente mutato nei tumori umani (Hollstein et al, 1999).

1.7.1 IL GENE TP53

Il gene TP53 è localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 (17p 13.1), è lungo approssimativamente 20 kb, con 2.8 kb di trascritto e codifica per una fosfoproteina nucleare di 53 kDa, composta di 393 aminoacidi (McBride et al, 1986).

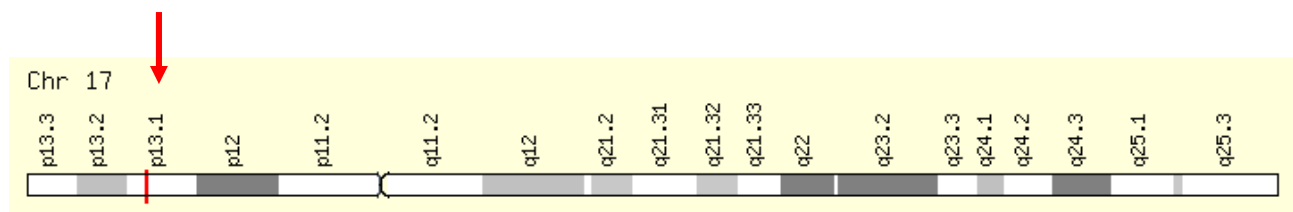


Figura 9: Cromosoma 17 e localizzazione del gene TP53.

Il gene è formato da 11 esoni, di cui solo il primo non codificante. L'analisi della sequenza nucleotidica e aminoacidica mostra la presenza di cinque domini (I-V) che si sono conservati nel corso dell'evoluzione da *Xenopus* all'uomo (Soussi et al, 1990); queste regioni conservate sono necessarie per il corretto funzionamento della proteina (**figura 10**, in rosa i domini conservati). Molte proprietà di p53 sono indicate dalla presenza di diversi domini: due *DNA-binding domains*, due *SV40 tumor-antigen binding sites*, un *nuclear localization signal*, un dominio di oligomerizzazione e molti siti di fosforilazione (Foord et al, 1991; Stenger et al, 1992; Meek et al, 1988).

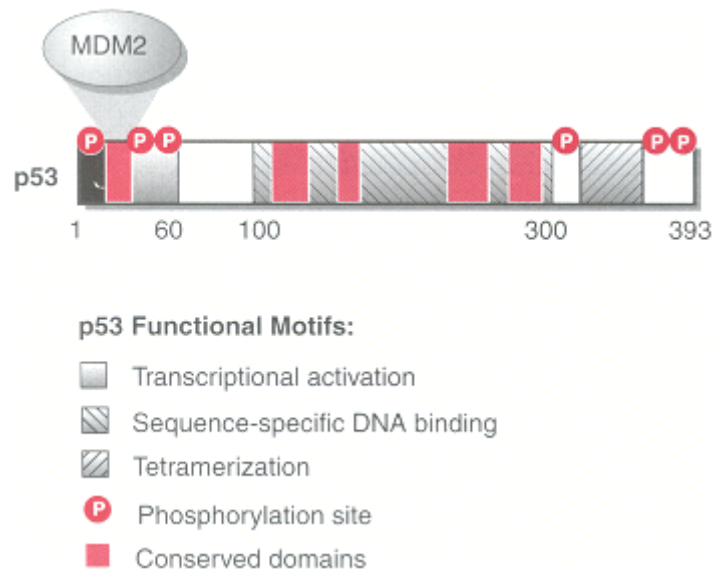


Figura 10: domini funzionali e i cinque domini conservati (in rosa) di p53.

1.8.2 LA PROTEINA P53

La proteina p53 agisce da regolatore della trascrizione: nel suo stato *wild-type* è capace di legare specifiche sequenze di DNA con il suo dominio centrale, mentre la sua sequenza amino-terminale funge da dominio di transattivazione e la sua sequenza carbossi-terminale è necessaria a p53 stessa per formare dimeri e tetrametri con altre p53 (**figura 11**) (Vogelstein et al, 2000; el-Deiry et al, 1998).

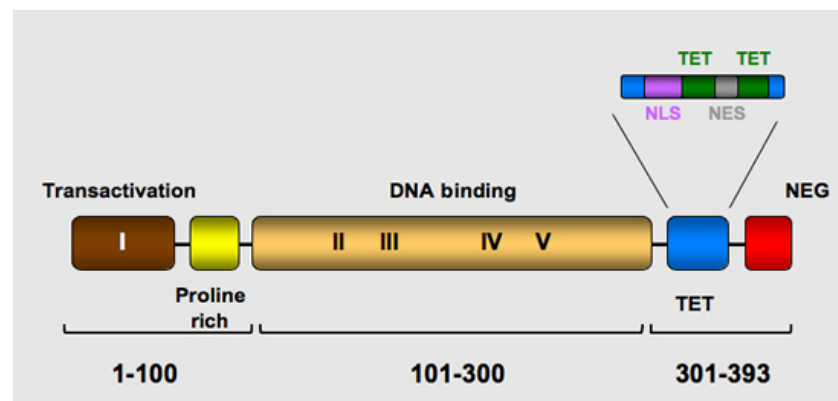


Figura 11: domini funzionali di p53 (TET= Tetra oligomerization domain; NLS= nuclear localization domain; NES= nuclear exclusion domain; NEG= negative regulation domain).

P53 attiva la trascrizione di numerosi geni che hanno un ruolo nel controllo della progressione del ciclo cellulare, tra cui p21 che ne controlla l'arresto inibendo l'attivazione

delle chinasi cicline-dipendenti CDK che a loro volta sono richieste dalla cellula per entrare nella fase S di replicazione del DNA. Altri targets di p53 sono MDM2 (un regolatore negativo di p53 stessa), BAX che promuove l'apoptosi della cellula e GADD45 (una proteina di riparo dei danni del DNA) (Kastan et al, 1992; el-Deiry et al, 1998).

P53 si attiva in risposta a situazioni di stress cellulare (ad es. ipossia) o in caso di danni al DNA causati da radiazioni ionizzanti, agenti carcinogeni o mutageni e agisce in diversi modi: a livello del G1/S checkpoint per regolare la decisione della cellula di sintetizzare nuovo DNA (si è visto che ha un ruolo cruciale anche a livello del passaggio G2/M, Bunz et al, 1998) bloccando il ciclo cellulare per permettere alla cellula di riparare i danni al DNA (Kastan et al, 1991); se il DNA non può essere riparato allora p53 esercita un controllo nella decisione della cellula di entrare in apoptosi (Polyak et al, 1997).

E' evidente che se una cellula manca di p53 o presenta una p53 non funzionante, eventuali danni al DNA non possono essere riparati, non si ha l'arresto del ciclo cellulare o l'apoptosi e la cellula danneggiata continua a dividersi accumulando nuove mutazioni con il risultato di una proliferazione dei danni genetici che possono portare sia a perdita di altri tumor suppressor gene che all'attivazione di oncogeni che alla fine portano all'insorgenza di neoplasie.

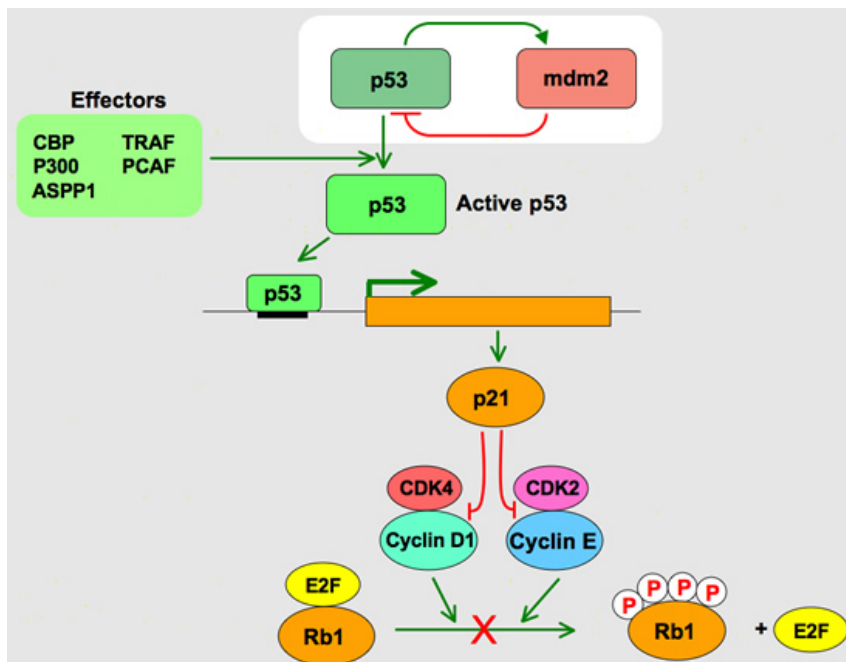


Figura 12: pathway di p53: downstream signaling, arresto di G1 via trascrizione di p21 che inibisce l'attivazione delle chinasi cicline-dipendenti CDK, bloccando la fosforilazione di pRb.

1.8 GENI MODIFICATORI

L'analisi comparativa tra tipo/sede di mutazione e fenotipo non sembra consentire per ora di individuare una precisa correlazione tra genotipo e quadro clinico in pazienti NF1.

Una correlazione sembra esserci tra delezioni coinvolgenti l'intero gene NF1 e le sue regioni fiancheggianti, e pazienti che presentano un fenotipo più grave. La frequenza di queste microdelezioni (evidenziabili mediante *FISH*, ibridazione in situ fluorescente) è di circa il 5% e la maggior parte delle delezioni ha dimensioni di circa 1.5 Mb.

I pazienti con microdelezioni possono presentare un dismorfismo cranio-facciale (in particolare macrocrania), difficoltà di apprendimento o ritardo mentale, malformazioni soprattutto cardio-vascolari, una comparsa più precoce e in maggior numero di neurofibromi e una più alta incidenza di tumori maligni, rispetto alla maggior parte di pazienti con NF1 (De Raedt et al, 2003). La delezione coinvolgendo il gene e le regioni vicine, potrebbe spiegare la severità del fenotipo con l'aploinsufficienza del gene NF1, associata con la perdita di funzione di geni contigui o dei tre geni *EVI2A*, *EVI2B* e *OMPG* inseriti nell'introne 27. Non si è però ancora in grado di stabilire in quale misura questi fattori siano responsabili della gravità del fenotipo.

A parte questa eccezione, per il resto dei pazienti NF1 la variabilità intra e inter-familiare delle manifestazioni cliniche è notevole per tutti i tipi di sintomi descritti. Questa estrema variabilità fenotipica non è quindi spiegabile attraverso il semplice meccanismo di mutazione/delezione del gene NF1. Anche se sono state formulate numerose ipotesi, quali il background genetico/ambientale, meccanismi epigenetici e mosaicismo, non sono ancora noti i meccanismi molecolari che sottendono tale variabilità.

In alcuni pazienti affetti da NF1 (sia bambini che adulti) possono insorgere tumori quali gliomi, astrocitomi, feocromocitomi, neurofibrosarcomi, certe forme di leucemia-mieloide e nel 10-15% dei pazienti il neurofibroma plessiforme (una lesione frequente e grave dal punto di vista clinico) può evolvere in un tumore maligno della guaina dei nervi periferici ("*malignant peripheral nerve sheath tumor*", MPNST) (Ferner and Gutmann, 2002).

Risulta quindi chiaro che la prognosi in questi pazienti dipende non solo dalle variabili cliniche ma anche dalla precocità di identificazione di tali complicanze.

Si è supposto quindi che oltre al gene NF1, altri fattori genetici possano intervenire nel modificare l'espressione della malattia. L'identificazione di questi **geni modificatori** potrà

essere quindi di grande valore, sia da un punto di vista diagnostico che prognostico (Wiest et al, 2003).

1.8.1 NF1 E GLIOMI DEL NERVO OTTICO

L'astrocitoma pilocitico del nervo ottico, o glioma delle vie ottiche, è il tumore che insorge più frequentemente (15-20%) nei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo I, in particolare nei bambini sotto ai 10 anni di età. Questi tumori di solito sono benigni (classificati di grado 1) poiché la loro crescita è lenta e possono anche andare incontro a regressione spontanea; tuttavia occasionalmente alcuni possono diventare aggressivi, continuare a crescere e provocare danni a carico delle strutture nervose coinvolte come cecità o disfunzioni ipotalamiche. Non è ancora chiaro quali cambiamenti molecolari portino all'insorgenza di un glioma delle vie ottiche nei pazienti NF1 né cosa faccia sì che un astrocitoma pilocitico associato a NF1 rimanga stabile o progredisca nel tempo danneggiando il tessuto nervoso: alterazioni genetiche associate con la patogenesi e la progressione di tali tumori non sono state infatti ancora caratterizzate.

Da studi condotti su pazienti con astrocitomi sporadici (non associati a NF1) di alto grado emerge che tali tumori possono presentare mutazioni a carico di p53, amplificazione del gene per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), delezioni del cromosoma 10q che coinvolgono PTEN e delezioni della regione 9q che coinvolge il gene CDKN2A (Kleihues *et al*, 2000).

CDKN2A e TP53 sono entrambi noti come *tumor suppressor genes*, frequentemente mutati o deleti in molti tumori poiché coinvolti nella regolazione della progressione del ciclo cellulare (dalla fase G1 alla fase S), tramite la *pathway* della proteina del retinoblastoma pRb.

In letteratura inoltre sono riportati diversi polimorfismi che vengono associati a insorgenza o progressione tumorale, in particolare il C500G e il C540T in 3' UTR del gene CDKN2A (Sakano et al, 2003 e Sauroja et al, 2000) e IVS 6+62 G/A e 12256 G/C, nella regione del promotore, del gene TP53 (Malmer et al, 2005 e 2007).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Gli obiettivi che questo studio si propone sono quelli di:

- analizzare un gruppo di pazienti NF1 tutti presentanti glioma delle vie ottiche e un gruppo di soggetti con glioma delle vie ottiche senza diagnosi clinica di NF1 per valutare sia la presenza di particolari mutazioni a carico del gene NF1, sia la presenza di mutazioni nel gene onco-soppressore CDKN2A, tramite l'applicazione di tecniche di biologia molecolare (DHPLC);
- in secondo luogo analizzare nel campione in studio e in un campione di controlli sani alcuni polimorfismi noti dalla letteratura nei geni onco-soppressori CDKN2A e TP53, che vengono associati a insorgenza o progressione tumorale, in particolare il C500G e il C540T in 3' UTR del gene CDKN2A e IVS 6+62 G/A e 12256 G/C, nella regione del promotore, del gene TP53, utilizzando due diverse tecniche di biologia molecolare (RFLP e HRMA);
- infine valutare i risultati con metodi statistici per stabilire se lo sviluppo del tumore (glioma del nervo ottico) in questo tipo di pazienti possa essere associato alla presenza di determinate mutazioni e/o polimorfismi nei geni analizzati.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI IN STUDIO

Si è effettuato uno screening di mutazioni e/o polimorfismi nei geni NF1, CDKN2A e TP53 in un gruppo di 25 soggetti con diagnosi clinica di NF1, tutti presentanti glioma delle vie ottiche (l'astrocitoma pilocitico del nervo ottico o glioma è il tumore più frequente nei pazienti NF1) provenienti dall'Azienda ospedaliera di Padova, Servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica, Dipartimento di Pediatria e 21 soggetti con presenza di glioma ipotalamo-chiasmatico delle vie ottiche, provenienti dall'ospedale pediatrico Meyer, Unità di Neurochirurgia, Firenze, senza diagnosi clinica di NF1. Ognuno dei pazienti arruolati per lo studio ha dato il consenso informato per il prelievo di sangue periferico in EDTA e per la successiva analisi molecolare.

Il DNA dei pazienti NF1 selezionati per l'analisi era già presente nella banca di DNA del Servizio di Genetica Clinica ed Epidemiologica del Dipartimento di Pediatria, mentre dei soggetti non affetti da NF1 ci sono pervenuti prelievi di sangue periferico in EDTA, dai quali è stato poi estratto il DNA genomico con un kit commerciale (*Perfect gDNA Blood Mini Isolation Kit*, Eppendorf), secondo il protocollo riportato. Il DNA estratto è stato successivamente controllato in gel di agarosio allo 0.8% e quantificato allo spettrofotometro.

3.2 ANALISI DEL GENE NF1

3.2.1 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

Gli esoni del gene NF1 e le rispettive regioni fiancheggianti sono stati amplificati utilizzando coppie di primer specifiche per ogni amplificato. I primer sono stati reperiti per lo più dalla letteratura (De luca *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2001), ad eccezione delle coppie amplificanti gli esoni 7, 12a, 19a, 21, 24, 28, che sono stati disegnati utilizzando il software, disponibile online, *primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). In **tabella 1** sono riportate le sequenze delle coppie di primer (*forward* e *reverse*), con le relative temperature di *annealing* e dimensioni degli amplificati.

Esone	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	bp	T_a (°C)
1	cag acc ctc tcc ttg cct ctt	gga tgg agg gtc gga ggc tg	439	62
2	aag ctg tta acg tgt ttt ttt ttt c	aag aaa aga aag caa att ccc c	228	54
3	ttt cac ttt tca gat gtg tgt tg	tgg tcc aca tct gta ctt tg	245	55
4a	tta aat cta ggt ggt gtg t	aaa ctc att tct ctg gag	517	57
4b	tca agt ggt cct cct gcc tt	cat tca tga tac tag ttt ttg ac	283	56
4c	ttt cct agc aga caa cta tgc a	agg atg cta aca aca gca aat	306	58
5	gaa gga agt tag aag ttt gtg aca	caa tgc tat cct tac cag cca t	308	57
6	cat gtt tat ctt tta aaa atg ttg cc	ata atg gaa ata att ttg ccc tcc	301	56
7	gct aca tct gga ata gaa gaa act tca	cca ttt agg ctg atg aac aca	399	58
8	gga ttt tac tgc cat ttg tgt g	taa cag cat cag taa ata tag tta gat a	275	60
9	gct gtt ctt ttt ggc ttc	cgg tca aga ctt aat atg	183	51
9a	ctg tgg ctc aga aca cta aaa	cac atg cag tgc tca tta ga	308	54
10a	acg taa ttt tgt act ttt tct tcc	caa tag aaa gga ggt gag att c	222	55
10b	att atc ctg agt ctt atg tc	taa ctt agt gtg ata att ttg aga	229	51
10c	att gaa gtt tcc ttt ttt tcc ttg c	gta tag aca taa aca tac cat ttc c	275	52
11	cca aaa atg ttt gag tga gtc t	acc ata aaa cct ttg gaa gtg	256	54
12a	ttt aat gaa aca tag ggg gct ta	gga agg aga agc tga aat aga acc	473	58
12b	ctc ttg gtt gtc agt gct tc	cag aaa aca aac aga gca cat	260	58
13	cac agt tta ttg cat tgt tag	gcc atg tgc ttt gag gca g	375	55
14	gct ctt cct act cct ttt gg	ttt ctg ttg cta agg gca ta	191	58
15	act tgg ctg tag ctg att ga	act tta ctg agc gac tct tga a	247	57
16	tgg ata aag cat aat ttg tca agt	tag aga aag gtg aaa aat aag ag	549	53
17	tct cta ggg ggt ctg tct tc	cac cct agt ttg tgt gca gt	326	60
18	aga agt tgt gta cgt tct ttt ct	ctc ctt tct acc aat aac cgc	367	58
19a	gct tgt tcc ctt ctg gct tt	ttt caa aca caa aag ttt gac atc	388	53
19b	tga ggg gaa gtg aaa gaa ct	ggc ttt att tgc ttt ttg ct	235	56
20	cca ccc tgg ctg att atc g	taa ttt ttg ctt ctc tta cat gc	402	52
21	tgg cat gta aga gaa gca aaa a	tct tcc ccg ctt act cta atc a	312	56
22	tgc tac tct tta gct tcc tac	cct taa aag aag aca atc agc c	331	58
23-1	ttt gta tca ttc att ttg tgt gta	aaa aac agc ggt tct atg tga aaa g	282	55
23-2	ctt aat gtc tgt ata aga gtc tc	act tta gat taa taa tgg taa tct c	268	54
23a	agc cag aaa tag tag aca tga ttg ggt	cta ttt tgt gcc aga att agt aga	446	58
24	tgc aaa gtt tga cct ttg aac t	aaa gca cat aac tga aaa cca tag g	369	61
25	cct gtt tta ttg tgt aga tac ttc a	taa gtg gca aga aaa tta cct	134	55
26	aat tct aat gac ttt gca ttt ttg	atc taa att taa acg gag agt g	226	56
27a	gtt aca agt taa aga aat gtg tag	cta aca agt ggc ctg gtg gca aac	298	59
27b	ttt att gtt tat cca att ata gac tt	tcc tgt taa gtc aac tgg gaa aaa c	296	55
28	aaa ata aaa ttg att agt ggc atc tg	caa aac aca gac tgg aac tta ctt t	536	56
29	tct gga gcc ttt tag aat ttt atg	gca aca aac ccc aaa tca aac tga	460	57
30	caa ctt cat ttg tgt ttt ctc cta g	ctt tga att ctc tta gaa taa ttg tta	282	56
31	ata att gtt gat gtg att ttc att g	aat ttt gaa cca gat gaa gag	424	54

32	atc tag tat ttt tga ggc ctc ag	cag ata tgc tat agt aca gaa gg	312	58
33	tgc taa aac ttt gag tcc cat g	gca act tgg tgt tag agc ac	447	56
34	ttt tct gtc ttt act tgt tcc ttt a	cag tcc atg caa gtg ttt tt	384	58
35	gca tgg act gtg tta ttg gta	tgc aat taa aag atc cac aga	319	53
36	gft ctg tgg atc ttt taa ttg c	cat tga cct caa att taa acg	238	53
37	cat tcc gag att cag ttt agg ag	aag taa cat tca aca ctg ata ccc	236	58
38	cta tgt cat gat tca tct tac tag c	cta aat ttg agt aat cta gga acc tc	233	60
39	cta ctg tgt gaa cct cat caa cc	gta aga cat aag ggc taa ctt act tc	284	62
40	tca ggg aag aag acc tca gca gat gc	tga act ttc tgc tct gcc acg caa cc	328	59
41	gtg cac att taa cag gta cta t	ctt cct agg cca tct cta gat	373	65
42	ctt gga agg agc aaa cga tgg ttg	caa aaa ctt tgc tac act gac atg g	356	60
43	ttt tct ttt tag tgt att ccc att	gat tct aag aaa tgg ctg gaa	287	53
44	cac gtt aat tcc cta tct tgc	tga gaa gta gaa gac tgt atc c	268	56
45	cat gaa tag gat aca gtc ttc tac	cac att act ggg taa gca ttt aac	269	61
46	aaa tgt tcc tct gtt gac tt	cat caa cca tcc ttc tcc aga	211	53
47	ctg tta caa tta aaa gat acc ttg c	tgt gtg ttc tta aag cag gca tac	185	62
48	ttt tgg ctt cag atg ggg att tac	aag gga att cct aat gtt ggt gtc	351	66
48a	att cct tct gaa aac caa gg	aag gca gac tga gct tac ag	280	57
49	aga atg tgt ccc cgt tgt taa	caa acc gga tgg gtt cat ta	369	55

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati per la PCR, lunghezza dell'amplificato e temperatura di annealing.

L'amplificazione mediante PCR è stata eseguita, in un volume di 50 µl, secondo il protocollo riportato in **tabella 2**, utilizzando l'enzima *Taq Gold Polimerase* (Amplitaq Gold, Applied Biosystem) e sottoponendo la soluzione di reazione al ciclo di temperature descritto in **tabella 3**.

T (°C)	Tempo	N°cicli
95	10'	1
95	10"	40
T _a	40"	
72	1'	1
72	30'	
4	10'	1

Tabella 2. Profilo termico della reazione.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O sterile	31,7
Buffer 10X Gold	5
MgCl ₂ Gold	3
dNTPs 10mM	1
pForward 10µM	2,5
pReverse 10µM	2,5
Taq Gold	0,3
TOTALE	46 µl mix+ 4 µl DNA

Tabella 3. Mix della reazione di amplificazione.

La resa della reazione, sia qualitativa che quantitativa, è stata valutata sottoponendo 5 µl di prodotto di amplificazione a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,5% colorato con etidio bromuro, dopo aver sottoposto i campioni a denaturazione e rinaturazione termica. L'intensità luminosa della banda su gel è stata utilizzata come parametro per valutare la quantità di amplificato da sottoporre all'analisi mediante DHPLC (da 8 a 15 µl a seconda della reazione).

Per ogni esone è stato amplificato anche il DNA di soggetti campione, presi casualmente nella popolazione e negativi ad una diagnosi clinica di Neurofibromatosi tipo 1, per poter confrontare le sequenze dei soggetti in analisi con quelle di controlli sani.

3.2.2 ANALISI MEDIANTE DHPLC (*DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*)

I campioni ottenuti dall'amplificazione dei singoli esoni del gene NF1 da DNA genomico dei pazienti in analisi e dei controlli, sono stati sottoposti a denaturazione e rinaturazione termica per consentire la formazione di eventuali molecole eteroduplex. In **tabella 4** è descritto il profilo termico per la denaturazione la successiva graduale rinaturazione (uguale per tutti gli esoni).

T (°C)	Tempo	N° cicli
95	10'	1
T - 1 ^(*)		75
20	10'	1

Tabella 4. Profilo termico per il ciclo di denaturazione / rinaturazione.

(*) La temperatura viene abbassata di 1°C ad ogni ciclo, da 95°C fino a 20°C.

L'analisi dei prodotti di PCR è stata eseguita con l'ausilio dell'apparecchiatura per DHPLC: *2100 Wave DNA fragment analysis system* (Transgenomic).

Per ogni esone sono state utilizzate due temperature di analisi in modo che tutta la lunghezza della sequenza in questione, potesse trovarsi in condizioni di parziale denaturazione: domini diversi, all'interno della stessa sequenza, possono comportarsi in modo differente alla stessa temperatura. Temperature di analisi e valori del *Time shift* (un parametro che induce una variazione nella quantità di acetonitrile utilizzata per l'eluizione e di conseguenza una variazione temporale nel rilevamento dei picchi cromatografici) erano stati precedentemente messi a punto nel nostro laboratorio (**tabella 5**).

Esone	T° dhplc (°C)	Time shift	T° dhplc (°C)	Time shift
1	62,3	-0,5	63,3	0
2	55	-0,5	56	0
3	54,9	-1	55,7	-0,5
4a	53	-1	58	0,5
4b	51	-1	54,6	-1,5
4c	54	-1,5	55	-1,5
5	53,6	2	54,6	2,5
6	53	-0,5	56	0,5
7	54,2	-0,5	56,2	0,5
8	57,5	0	58,5	1,5
9a	60	1,5	61	1,5
10a	53	-1	58	0
10b	54,3	-1		
10c	57,3	0	59	1
11	54	-0,5	52	-1
12b	57,5	0	59	0,5
14	60,3	-1	61,7	-0,5
15	57,5	-1,5	58,3	-1,5
16	55,5	0	58,2	1
17	54,6	-1	55,6	-1,5
18	55,5	1	56,5	1,5
19b	52,5	-0,5	54,5	0
20	55	-1	57	0
21	55,8	-1,5	56,8	-1
22	56,5	0	58	0,5
23-1	55,6	-0,5	56,6	-0,5
23-2	53	-0,5	58	0,5
23a	53	-1	54,5	-0,5
24	57	0	58	1

25	56	-1	57	-0,5
26	54,8	-0,5	56,8	0
27a	55	0	57	0,5
29	57,5	0	60	1
30	54,4	0	56,4	0
31	56,7	0	57,7	0
32	56	0,5	57	1
33	55,5	0	59	1,5
34	57,5	0	59,5	1
35	55,3	0,5	56,3	1
36	55	0	59	1,5
37	54,1	-1	56	-0,5
38	57	0	59,5	1
39	55,5	0	56,5	0,5
41	54,7	-2	55,7	-1
42	52	-0,5	55	0,5
43	54,8	0	55,8	0
44	56,1	-1,5	58,1	-0,5
45	56	-0,5	57	-0,5
46	55	-0,5	56	0
47	55,4	0	56,4	0
48	55,1	-0,5	58,1	0
49	58	-1	60	0

Tabella 5. Temperature di parziale denaturazione e rispettivo *time shift* per l'analisi DHPLC di ogni esone del gene *NF1*.

I cromatogrammi ottenuti dall'analisi DHPLC dei pazienti sono stati confrontati con i cromatogrammi dei relativi esoni dei controlli sani.

I campioni in cui è stata valutata un'anomalia del cromatogramma sono stati sottoposti a sequenziamento diretto della regione genica in questione. Il cromatogramma infatti non fornisce alcuna informazione sul tipo di alterazione, ne indica solo la presenza.

3.2.3 SEQUENZIAMENTO

L'analisi dei campioni con sospetta mutazione è stata eseguita utilizzando un sequenziatore automatico *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem).

I prodotti di PCR degli esoni da sequenziare sono stati ottenuti con lo stesso protocollo utilizzato per l'analisi DHPLC. Successivamente è stata eseguita una purificazione dei

prodotti di amplificazione mediante l'uso di *Microcon Centrifugal Filter Devices* (Millipore). La concentrazione di acido nucleico nel prodotto di purificazione è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

La reazione di sequenza è stata eseguita a partire da 80 ng di acido nucleico secondo il protocollo riportato nel kit *Big dye 3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystem); sono stati utilizzati sia il primer *forward* che *reverse* per ogni campione (**tabelle 6-7**).

Materiale	Quantità x1 (µl)
PCR purificata (10ng/µl)	8
H ₂ O sterile	5,4
buffer	3
pForward/pReverse 10µM	0,6
Big Dye 3.1	3

Tabella 6. Mix di reazione di amplificazione per il sequenziamento.

T (°C)	Tempo	N°cicli
95	10"	25
50	5"	
60	2'	

Tabella 7. Ciclo della reazione per sequenza.

Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti ad ulteriore purificazione con colonnine *Centrisept spin columns* (Applied Biosystem). 10 µl di purificato sono stati mescolati a 10µl di formamide e, dopo rapida denaturazione (10 minuti a 95° C), caricati nel sequenziatore automatico.

Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con il software *Chromas 2.22* (winlmp self-extractor copyright 2000 technelysium pty ltd) e le sequenze dei campioni allineate alla sequenza *wild type* del gene *NF1* riportata in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>) utilizzando il software BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>).

3.3 ANALISI DEL GENE CDKN2A

3.3.1 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

Si è effettuata una ricerca *on-line* in GenBank delle sequenze codificanti il gene CDKN2A e si sono disegnati i primers per l'amplificazione dei frammenti corrispondenti agli esoni 1 α , 1 β , 2 e 3, tramite utilizzo del programma Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi); l'esone 1 β è stato suddiviso in 2 parti (1 β a e 1 β b) in quanto l'esone intero di elevate dimensioni era di difficile amplificazione; la prima parte della sequenza (1 β a), inoltre, è risultata essere ricca in CG, si è quindi eseguita la PCR su questo frammento utilizzando un apposito Kit (G-C rich kit, *Roche*).

Per l'analisi del polimorfismo **C540T** in 3' UTR si sono utilizzati primers presi dalla letteratura (Sauroja et al, 2000), denominati esone 3 bis.

Contemporaneamente ai pazienti sottoposti a indagine molecolare venivano sempre amplificati dei controlli sani, utili per la successiva analisi mediante DHPLC.

In **tabella 8** sono riportati i primers utilizzati.

Esone	Primers		T _a (°C)	Dimensioni (bp)
1 β a	For	5' ctgagagccgttccgagat 3'	56	254bp
	Rev	5'aaccacgaaaaccctcactc 3'		
1 β b	For	5' agaacatggtgcgaggt 3'	54	250bp
	Rev	5' caaacaacaagaagtcgcaat3'		
1 α	For	5'accggaggaagaaaggag 3'	56	347bp
	Rev	5' gcgtacctgattccaattc 3'		
2	For	5' tagacacctgggcttgtgt 3'	56	504bp
	Rev	5' gctgaactttctgtgctgga 3'		
3	For	5' gtattcaatgccggtaggg 3'	55	181bp
	Rev	5' cctgtaggaccttcggtgac 3'		
3bis	For	5'gcctgttttcttctgcctctg3'	58	143bp
	Rev	5' cgaaagcggggtgggtgtg 3'		

Tabella 8. Sequenze dei primers utilizzati per la PCR, temperature di annealing e lunghezza degli amplificati.

L'amplificazione mediante PCR è stata eseguita, in un volume finale di 50 μ l, secondo il protocollo riportato in **tabelle 9-11**, utilizzando l'enzima *Taq Gold Polimerase* (Amplitaq Gold, Applied Biosystem) e sottoponendo la soluzione di reazione ai cicli di temperature descritti in **tabella 14**. L'esone 1 β a è stato amplificato seguendo il protocollo riportato nel kit GC-Rich (*Roche*) in un volume finale di 25 μ l, come in **tabelle 12-13**, sottoponendo la soluzione di reazione ai cicli di temperature descritti in **tabella 15**.

Mix esone 1α	Quantità x 1 (μl)
H ₂ O sterile	32,7
Buffer 10X Gold	5
MgCl ₂ Gold	2
dNTPs 10mM	1
pForward 10 μ M	2,5
pReverse 10 μ M	2,5
Taq Gold	0,3
TOTALE	46 μ l mix+ 4 μ l DNA

Tabella 9. Mix di reazione di amplificazione dell'esone 1 α .

Mix esone 1βb,3,3bis	Quantità x 1 (μl)
H ₂ O sterile	31,7
Buffer 10X Gold	5
MgCl ₂ Gold	3
dNTPs 10mM	1
pForward 10 μ M	2,5
pReverse 10 μ M	2,5
Taq Gold	0,3
TOTALE	46 μ l mix+ 4 μ l DNA

Tabella 10. Mix di reazione di amplificazione degli esoni 1 β b, 3 e 3bis.

Mix esone 2	Quantità x 1 (μl)
H ₂ O sterile	29,7
Buffer 10X Gold	5
MgCl ₂ Gold	3
dNTPs 10mM	1
pForward 10 μ M	2,5
pReverse 10 μ M	2,5
BSA	2
Taq Gold	0,3
TOTALE	46 μ l mix+ 4 μ l DNA

Tabella 11. Mix di reazione di amplificazione dell'esone 2.

Mix 1 esone 1βa	Quantità x 1 (μl)
H ₂ O sterile	6
GC solution	0.3
dNTPs	0.5
pForward 25μM	0,5
pReverse 25μM	0,5
TOTALE	12.5 μl mix+ 5 μl DNA

Mix 2 esone 1βa	Quantità x 1 (μl)
H ₂ O sterile	2
Buffer	5
enzima	0.5
TOTALE	7.5 μl mix

Tabelle 12 e 13. Mix di reazione di amplificazione dell'esone 1βa, secondo il protocollo del kit GC Rich (Roche).

T (°C)	Tempo	N°cicli
95	10'	1
95	30"	40
T _a	30"	
72	1'	
72	30'	1
4	10'	1

Tabella 14. Profilo termico delle reazioni di PCR per gli esoni 1α, 1βb, 2, 3 e 3bis.

T (°C)	Tempo	N°cicli
95	3'	1
95	30"	10
T _a	30"	
72	30"	
95	30"	25
T _a	30"	
72	30"+5"/ciclo	
72	30'	1
4	10'	1

Tabella 15. Profilo termico della reazione di PCR per l'esone 1βa.

3.3.2 ANALISI MEDIANTE DHPLC (*DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*)

L'analisi di mutazioni è stata effettuata nei 3 esoni del gene *CDKN2A* tramite DHPLC. Gli amplificati dei campioni sono stati miscelati con un ugual volume di amplificato di un controllo sano, prima della successiva denaturazione e rinaturazione.

Le condizioni di analisi di mutazione si sono messe a punto confrontando i dati del software WaveMaker (Transgenomic) con quelli dell'algoritmo disponibile al sito dell'Università di Stanford (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>) e determinando poi sperimentalmente le condizioni ottimali. In **tabella 16** sono riportate le condizioni di analisi utilizzate.

Esone	Temperature (C°)	Time shift
1α	63.5	-0.5
	64.5	-0.5
	68	+0.5
1βa	66.3	-1
	67.3	-1
1βb	62.5	-1
	63.5	-1
2	62.7	0
	63.5	0
3	59	-1
	60	-0.5

Tabella 16. Temperature di parziale denaturazione e rispettivo *time shift* per l'analisi DHPLC di ogni esone del gene *CDKN2A*.

I cromatogrammi ottenuti dall'analisi DHPLC dei pazienti sono stati confrontati con i cromatogrammi dei relativi esoni dei controlli sani.

I campioni in cui è stata valutata un'anomalia del cromatogramma sono stati sottoposti a sequenziamento diretto della regione genica in questione.

3.3.3 SEQUENZIAMENTO

Per il sequenziamento si sono seguite le stesse procedure utilizzate per gli amplificati del gene NF1.

3.3.4 ANALISI RFLP (*RESTRICTION FRAGMENTS LENGTH POLYMORPHISM*) DEI POLIMORFISMI C500G E C540T in 3' UTR DEL GENE CDKN2A

Si sono analizzati due polimorfismi noti in letteratura (C540T in 3' UTR e C500G in 3' UTR; Sakano et al, 2003 e Sauroja et al, 2000) mediante analisi RFLP, nei pazienti e in un campione di controlli sani.

Per l'analisi dei polimorfismi si sono cercati degli enzimi di restrizione, mediante il programma disponibile al sito <http://www.restrictionmapper.org/>, che vengono riportati in **tabella 17**.

Polimorfismo CDKN2A	Enzima di restrizione	Sito di riconoscimento
C500G in 3' UTR	Ava I	CYCGRG
C540T in 3' UTR	Hae III	GGCC

Tabella 17: descrizione degli enzimi individuati per analisi RFLP nel gene CDKN2A.

Si sono utilizzati 10 µl di amplificato dei campioni e dei controlli per la digestione con gli enzimi di restrizione con le reazioni riportate in **tabelle 18-19**. Le digestioni sono proseguite per due ore a 37°C. I prodotti di digestione sono stati poi visualizzati in gel di poliacrilammide al 12%, dopo colorazione con bromuro di etidio.

Mix di reazione	Digestione x 1
H₂O sterile	3,3 µl
Buffer NEB II 10X	1,5 µl
<i>Hae III (Biolabs)</i>	0,2 µl
Totale	5 µl + 10 µl PCR

Tabella 18: reazione di digestione con enzima *Hae III*.

Mix di reazione	Digestione x 1
H ₂ O sterile	3.3 µl
Buffer <i>NEB IV 10X</i>	1.5 µl
<i>Ava I (Biolabs)</i>	0.2 µl
Totale	5 µl + 10 µl PCR

Tabella 19: reazione di digestione con enzima *Ava I*.

3.5 ANALISI DEL GENE TP53

3.5.1 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

Per il gene TP53 si sono presi in esame due polimorfismi riportati in letteratura (Malmer B.S. et al, 2005 e 2007) di cui si sono cercate le sequenze relative per l'amplificazione mediante PCR nel sito SNPper- SNP View (<http://snpper.chip.org/bio/find-snp>). Si sono poi disegnati i primers tramite utilizzo del programma Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e del programma Oligo 6 (proprietà Dia Tech). Si sono effettuate delle prove sperimentali per decidere quali primers fossero i migliori per la successiva analisi HRM. I primers utilizzati sono elencati in **tabella 20**.

Polimorfismo	Primers		T _a (°C)	Dimensioni (bp)
IVS 6+62 A/G	For	5'tctgggaggagggttaag 3'	55	107
	Rev	5'tgcacatctcatggggttat 3'		
Prom C/G	For	5' tcttctgcaggaaggettgt 3'	56	236
	Rev	5'tccccgatgaataaaaatgc3'		

Tabella 20. Sequenze dei primers utilizzati per la PCR, temperature di annealing e lunghezza degli amplificati.

L'amplificazione mediante PCR pre-melt è stata eseguita, in un volume finale di 25 µl, utilizzando il kit specifico per Real Time (TaKara Ex Taq, TAKARA Bio Inc.) secondo il protocollo riportato in **tabella 21** e sottoponendo la soluzione di reazione ai cicli di temperature descritti in **tabelle 22-23**.

Mix	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O sterile	12.95
Buffer 5X	5
MgCl ₂	1.5
dNTPs 10 mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
EvaGreen	1.25
Taq TaKara	0.3
TOTALE	23 µl mix+ 2 µl DNA

Tabella 21. Mix per la PCR pre-melt.

T (°C)	Tempo	N°cicli
95	5'	1
95	10''	45
55	20''	
72	5'	1

Tabella 22. Profili ciclici di temperature e tempi di reazione per l'amplificazione della regione di TP53 contenente il polimorfismo **IVS 6+62 A/G**.

T (°C)	Tempo	N°cicli
95	3'	1
95	30''	35
56	30''	
72	30''	
72	5'	1

Tabella 23. Profili ciclici di temperature e tempi di reazione per l'amplificazione della regione del promotore di TP53.

3.5.2 ANALISI DEI POLIMORFISMI IVS 6+62 G/A E 12256 G/C NELLA REGIONE DEL PROMOTORE DEL GENE TP53 MEDIANTE HRM (*HIGH RESOLUTION MELT*)

L'HRMA combina, con l'uso di fluorofori che saturano il DNA a doppia elica, una Real-Time PCR con un'analisi di melting fluorescente e costituisce un metodo alternativo per lo studio dei polimorfismi. Permette di distinguere gli amplificati sfruttando la diversa temperatura di melting delle sequenze e può essere usata per rilevare tutti i tipi di variazioni di sequenza, dai singoli SNPs alle piccole inserzioni o delezioni.

Prima dell'analisi HRM, la sequenza target deve essere amplificata in presenza di un fluoroforo che si lega al DNA a doppia elica ed emette fluorescenza se esposto a fonte luminosa di opportuna lunghezza d'onda (nel nostro caso è stato utilizzato EvaGreen che se eccitato ad una lunghezza d'onda di 470 nm, emette fluorescenza a 510 nm).

Durante la reazione di amplificazione la concentrazione di DNA e quindi la fluorescenza aumentano in maniera esponenziale per poi arrivare rapidamente a plateau intorno al 35°-40° ciclo.

Dopo l'amplificazione, i campioni subiscono una denaturazione progressiva da 70° a 90° C e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di melt (**figura 13**).

La fluorescenza diminuirà con l'aumentare della temperatura mano a mano che il fluoroforo è rilasciato dal dsDNA che si dissocia in ssDNA.

La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza costituisce la temperatura di melting alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata. A ogni prodotto di PCR corrisponde una temperatura di melting caratteristica, perciò tramite questo tipo di analisi è possibile distinguere i diversi genotipi.

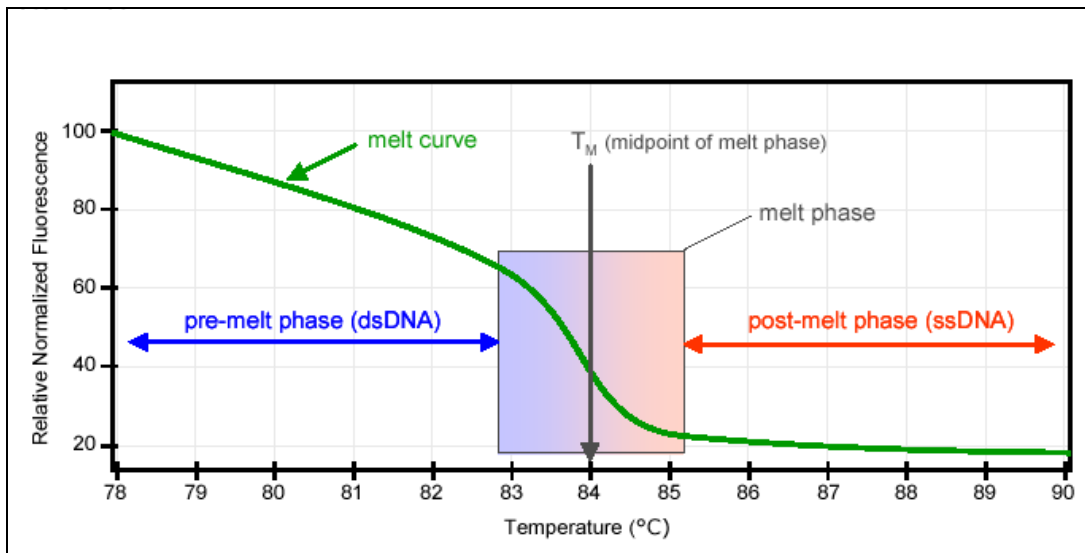


Figura 13: Melt curve dopo analisi HRM. Si possono distinguere una fase di pre-melt (in cui la maggior parte del DNA è ancora a doppio filamento) e una fase post-melt (in cui il DNA è quasi tutto a singolo filamento). T_M indica la temperatura di melting alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata.

Amplificazione e successiva analisi HRM dei polimorfismi del gene TP53 si sono effettuate in Rotor-Gene 6000 (Corbett) nei campioni e in un gruppo di 50 controlli sani. Da una prima analisi si sono estrapolati dalle curve di melt alcuni campioni per ogni tipo di curva prodotto. Si è proceduto quindi al loro sequenziamento diretto per avere la certezza che ad ogni curva corrispondesse un diverso genotipo. Una volta ottenuti questi risultati si sono utilizzati quei campioni per produrre delle curve di riferimento per le analisi successive.

4. RISULTATI

4.1 RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE NF1 MEDIANTE DHPLC

Dopo aver amplificato mediante PCR tutti gli esoni del gene NF1 nel campione di soggetti in studio, si è proceduto allo screening di mutazioni tramite DHPLC. Tutti i cromatogrammi dei campioni ottenuti dall'analisi sono stati confrontati con quelli di controlli sani per ogni esone analizzato. Dove si sono riscontrate differenze nel numero o nella forma dei picchi (**figure 14 e 15**), si è proceduto al sequenziamento diretto del campione per valutare la presenza di possibili mutazioni o polimorfismi.

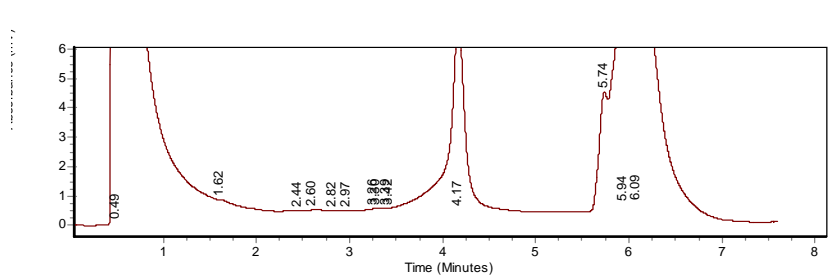


Fig 14: es. di cromatogramma di un controllo *wild type*.

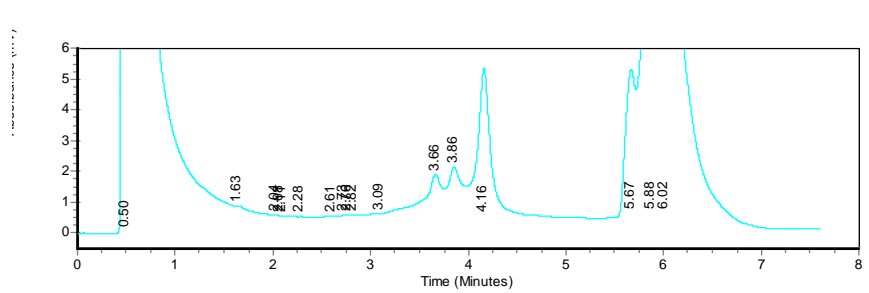


Fig 15: es. di cromatogramma di un campione "mutato".

Come ci aspettavamo non si è riscontrata alcuna mutazione nei soggetti con glioma delle vie ottiche senza diagnosi clinica di NF1, mentre si sono trovate mutazioni nel gene in 15/25 pazienti con glioma delle vie ottiche e diagnosi di NF1. Le mutazioni evidenziate sono riportate in **tabella 24**.

Esone/Introne	Identificativo paziente	Cambio nucleotidico	Alterazione aminoacidica	Alterazione a livello di trascrizione/ traduzione	References
IVS 4a	621	IVS 4a-2 A>G		<i>Splice site</i>	Kluwe et al, 2002
4b	2551	499-502 del TGTT	D176X	Proteina tronca	Ars et al,2003
7	673	981-982 Del GT	Delezione aa 327, PTC 328	Proteina tronca	Abernathy et al,1997
10a	3261	1278 G>A	W426X	Proteina tronca	Non riportata
10 c	2107	1541 Del A	Delezione aa 514, PTC 525	Proteina tronca	Non riportata
IVS 10b	3458	1527+1 del GTAA		<i>Splice site</i>	Non riportata
IVS 13	1477	IVS 13+2 T>A		<i>Splice site</i>	Non riportata
16	3527	2810 T>A	L937X	Proteina tronca	Non riportata
16	1598	2848 del C	Delezione aa 950, PTC 953	Proteina tronca	Non riportata
IVS 17	3028	2991-1 G>A		Skip Esone 18 (IF-41aa)	Fahsold et al, 2000
23-1	482	3941 G>A	W1314X	Proteina tronca	Non riportata
23-2	3445	3989 del AGAG	Delezione aa1330-1331, PTC 1341	Proteina tronca	Non riportata
25	1745	4312-4314 del GAA	1438 del E	Delezione aa (IF -1aa)	Ars et al, 2003
34	2361	6492 del G	Delezione aa 2164, PTC 2178	Proteina tronca	Non riportata
45	3303	7846 C>T	R2616X	Proteina tronca	Fahsold et al, 2000

Tabella 24: mutazioni identificate mediante DHPLC nei pazienti affetti da NF1 con glioma delle vie ottiche.

La percentuale di mutazioni osservata con l'analisi DHPLC è stata quindi del 60% , un valore che si accosta a quelli riportati in letteratura (De Luca *et al.*, 2004). Dai risultati osservati sembrerebbe inoltre non esserci una tipologia preferenziale di alterazione nucleotidica, mentre a livello proteico (in accordo con i dati riportati in letteratura Fahsold *et al.*, 2000) la maggior parte delle mutazioni (67%) sono alterazioni che provocano la

formazione di una proteina tronca: sia in seguito a cambio aminoacidico (nonsense), che per delezione di una o più basi, che generando una variazione nel modulo di lettura causano la formazione di un codone di stop prematuro.

Il 60% delle mutazioni evidenziate non sono state precedentemente individuate (non riportate) a conferma dell'alto tasso di variabilità delle mutazioni nel gene NF1.

4.2 RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE CDKN2A MEDIANTE DHPLC

Come per il gene NF1, abbiamo effettuato uno screening di mutazioni anche nel gene CDKN2A, con la stessa metodica (PCR-DHPLC-sequenziamento e analisi delle sequenze). Nei campioni analizzati non si sono evidenziate mutazioni all'interno dei singoli esoni; i doppi picchi osservati si sono rivelati essere polimorfismi già riportati in letteratura (**figure 16 e 17**).

Il polimorfismo **G442A** nell'esone 2 è stato riportato da Puig et al in uno studio del 2005, la sostituzione della base causa un cambio aminoacidico in posizione 148, una treonina al posto di un'alanina (A148T) che non comporta in questo caso un'alterazione della funzionalità della proteina. Questo polimorfismo si è riscontrato in eterozigosi in due pazienti: 2361, 482 (**figura 18**).

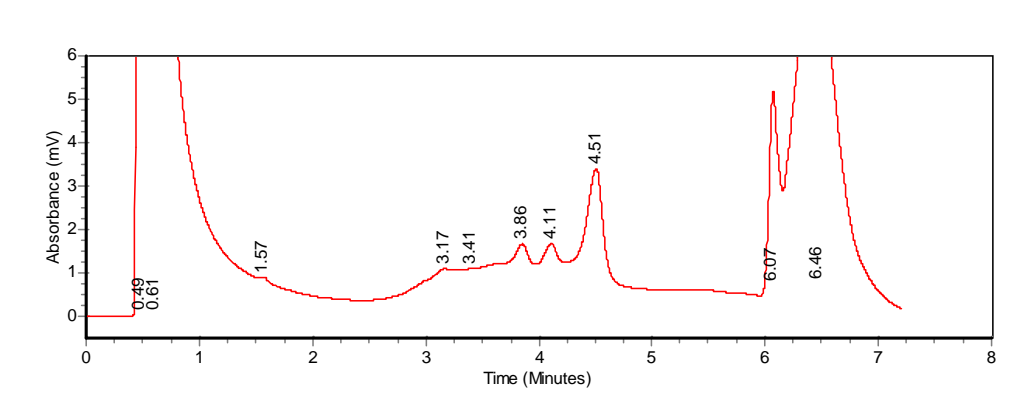


Figura 16: cromatogramma relativo alla PCR dell'esone 2 del paziente 2361.

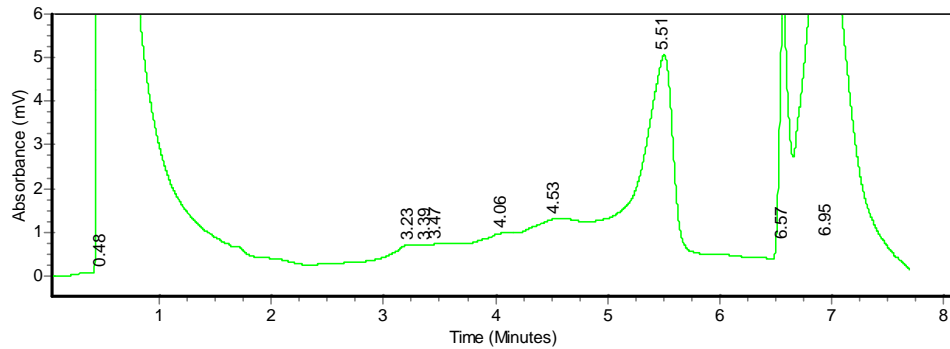


Figura 17: cromatogramma relativo alla PCR dell'esone 2 di un controllo *wt*.

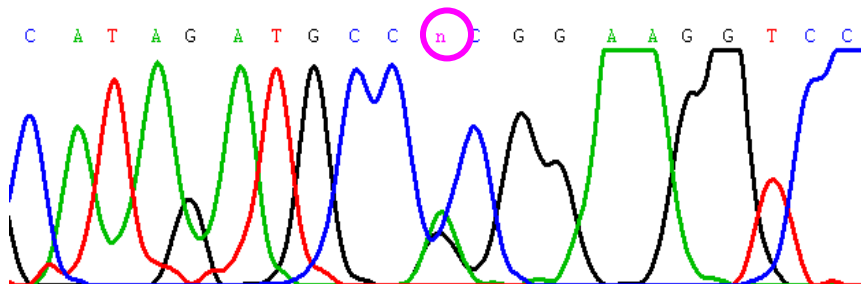


Figura 18: parte della sequenza del campione 2361 relativa alla PCR dell'esone 2, in cui è presente una sostituzione G>A, in eterozigosi.

Si è trovata comunque una nuova sostituzione nucleotidica in un paziente (3527), al 3' UTR del gene, in posizione 520 (**C520G**) che potrebbe rappresentare un nuovo polimorfismo (**figura 19**).

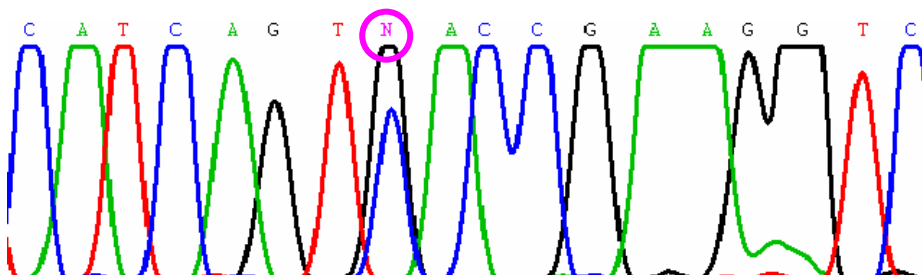


Figura 19: parte della sequenza del campione 3527 relativa alla PCR dell'esone 3, in cui è presente una sostituzione C>G, in eterozigosi.

4.3 ANALISI RFLP DEI POLIMORFISMI C500G e C540T in 3' UTR DEL GENE CDKN2A

Si sono analizzati mediante RFLP (*restriction fragments length polymorphism*) due polimorfismi noti in letteratura (C540T in 3' UTR e C500G in 3' UTR). L'analisi è stata condotta in tutti i pazienti con glioma, più 50 controlli sani, per verificare la frequenza del polimorfismo nella popolazione. Gli amplificati dopo digestione con l'enzima di restrizione specifico (vedi materiali e metodi) sono stati visualizzati in un gel di poliacrilamide al 12% (**figure 20 e 21**).

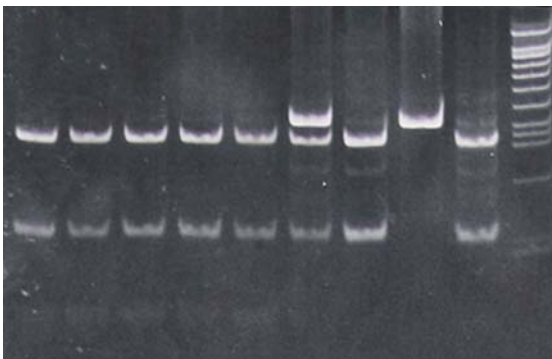


Fig 20: gel di poliacrilamide dopo digestione degli amplificati dell'esone 3 del gene CDKN2A con enzima *Hae III*.

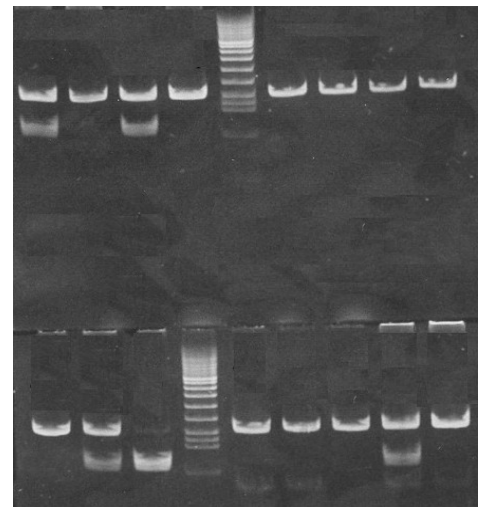


Fig 21: gel di poliacrilamide dopo digestione degli amplificati dell'esone 3 del gene CDKN2A con enzima *Ava I*.

I valori ottenuti per le frequenze geniche e alleliche sono riportati nelle **tabelle 25 e 26**.

Polimorfismo C 540 T	Controlli sani n=50		Pazienti con glioma n=21		Pazienti con <u>NF 1 e</u> glioma n=25	
	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze
C	82	p = 0,82	39	p = 0,93	45	p = 0,9
T	18	q = 0,18	3	q = 0,07	5	q = 0,1
Genotipo	N°	frequenze	N°	frequenze	N°	frequenze
C/C	33	p²=0,67	18	p²= 0,86	20	p²=0,8
C/T	16	2pq= 0,29	3	2pq= 0,14	5	2pq= 0,18
T/T	1	q²= 0,03	0	q²= 0	0	q²= 0,01

Tabella 25 : frequenze geniche e alleliche del polimorfismo **C540T** del gene CDKN2A.

Polimorfismo C 500 G	Controlli sani n=50		Pazienti con glioma n=21		Pazienti con <u>NF 1 e</u> glioma n=25	
	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze
C	85	p = 0,85	34	p = 0,8	45	p = 0,9
G	15	q = 0,15	8	q = 0,2	5	q = 0,1
Genotipo	N°	frequenze	N°	frequenze	N°	frequenze
C/C	37	p²= 0,72	14	p²= 0,64	21	p²= 0,8
C/G	11	2pq= 0,25	6	2pq= 0,32	3	2pq= 0,18
G/G	2	q²= 0,02	1	q²= 0,04	1	q²= 0,01

Tabella 26: frequenze geniche e alleliche del polimorfismo **C500G** del gene CDKN2A.

Si è effettuata poi un'analisi statistica dei dati ottenuti mediante test X^2 per verificare una possibile associazione tra la presenza dei polimorfismi e una predisposizione genetica allo sviluppo dei gliomi del nervo ottico.

Il test X^2 applicato alle frequenze alleliche e genotipiche dei due polimorfismi noti del gene CDKN2A, analizzati nei pazienti e nel campione di controllo, sembra escludere

un'associazione tra la presenza dei polimorfismi e una predisposizione genetica allo sviluppo dei gliomi del nervo ottico ($P>0,05$).

4.4 ANALISI HRM DEI POLIMORFISMI IVS 6+62 G/A E 12256 G/C NELLA REGIONE DEL PROMOTORE DEL GENE TP53

Si sono infine studiati due polimorfismi del gene TP53 noti in letteratura (IVS 6+62 G/A e 12256 G/C, nella regione del promotore), nei pazienti con glioma ottico e in un campione di 50 controlli sani, mediante analisi HRM (*high resolution melt*).

Prima dell'analisi HRM le sequenze del gene e del promotore contenenti i polimorfismi sono state amplificate in presenza del fluoroforo EvaGreen. Quando questo viene eccitato dal LED, emette fluorescenza permettendo così di seguire la cinetica della reazione di amplificazione. Dai grafici riportati in **figure 22 e 23** si può vedere bene come la fluorescenza aumenti mano a mano che la reazione di PCR procede e la concentrazione di DNA aumenta, fino a raggiungere un plateau.

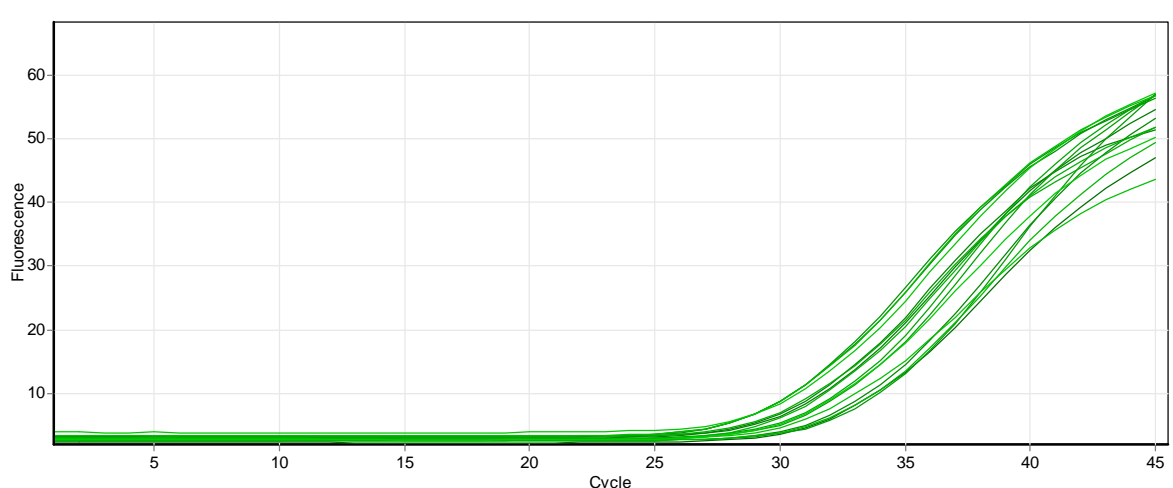


Figura 22: curva di PCR pre-melt della regione di TP53 contenente il polimorfismo IVS 6+62 A/G.

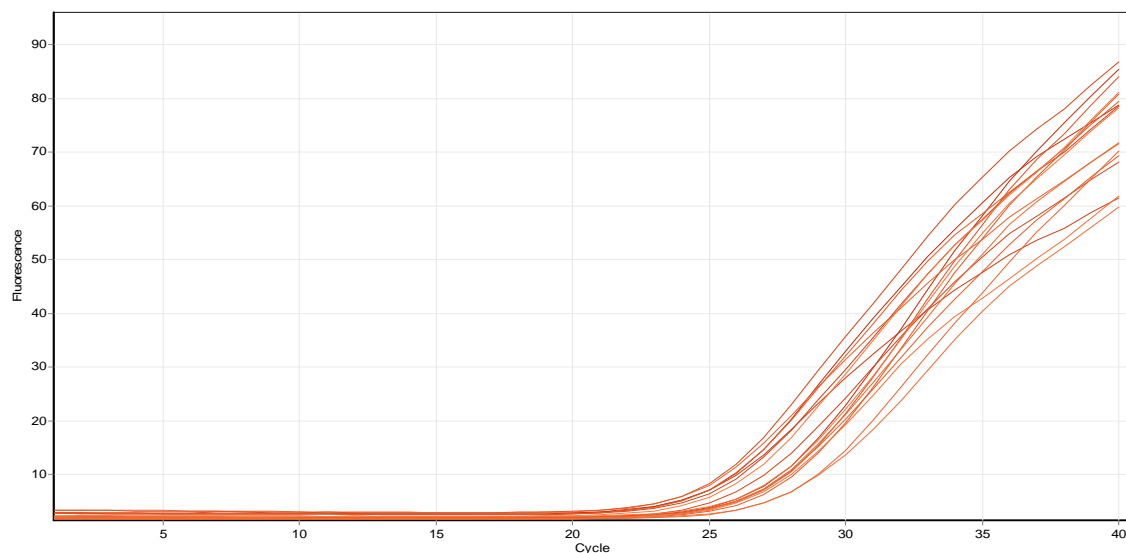


Figura 23: curva di PCR pre-melt della regione del promotore di TP53.

Dopo l'amplificazione, i campioni subiscono una denaturazione progressiva da 70 a 90 gradi e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di melt.

Dato che l'HRM è in grado di rivelare variazioni all'interno della sequenza del DNA ma non di caratterizzarle è stata fatta una prima analisi su alcuni campioni e da questa si sono estrapolati dalle curve di melt dei campioni per ogni tipo di curva prodotto. Si è proceduto quindi al loro sequenziamento diretto per avere la certezza che ad ogni curva corrispondesse un diverso genotipo. Una volta ottenuti questi risultati si sono utilizzati quei campioni per produrre delle curve di riferimento per le analisi successive.

In **figura 24 e 25** sono riportate a titolo esemplificativo due analisi HRM, una di campioni per il polimorfismo **IVS 6+62 G/A** in cui si distinguono bene tre fasci di curve corrispondenti ognuno ad un diverso genotipo e una per il polimorfismo **12256 G/C**, nella regione del promotore, per il quale non si sono trovati soggetti con genotipo C/C.

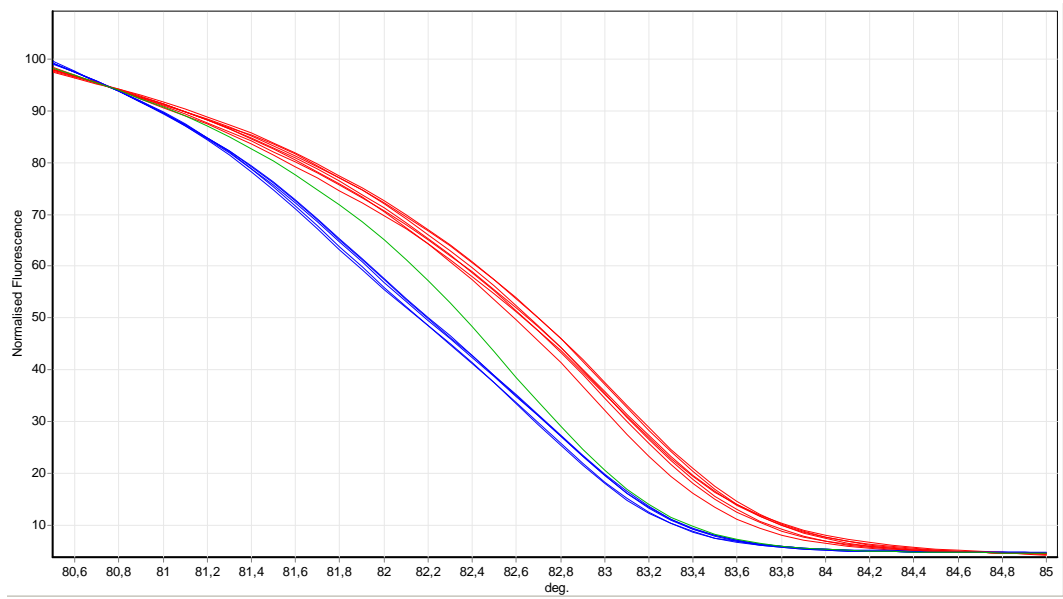


Figura 24: analisi HRM del polimorfismo IVS 6+62 G/A. In rosso campioni con genotipo G/G, in blu eterozigoti e in verde un campione A/A.

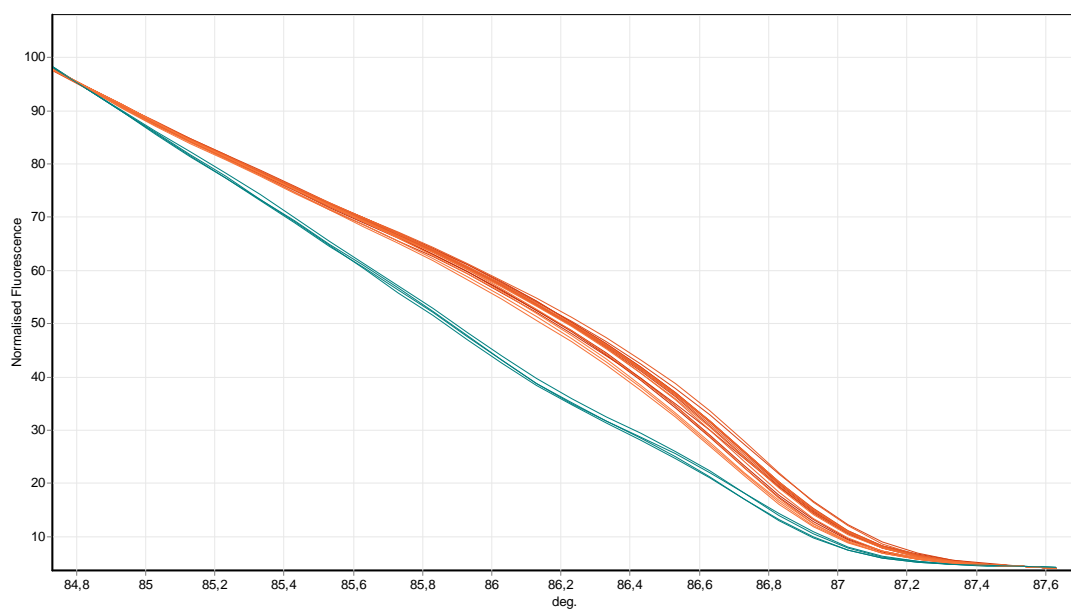


Figura 25: analisi HRM del polimorfismo della regione del promotore di TP53. In arancio campioni con genotipo G/G, in verde eterozigoti, non si sono trovati campioni C/C.

I valori ottenuti per le frequenze geniche e alleliche sono riportati nelle **tabelle 27 e 28**.

Polimorfismo 12256 G/C	Controlli sani n=50		Pazienti con <u>glioma</u> n=21		Pazienti con <u>NF 1 e</u> <u>glioma</u> n=25	
	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze
G	76	$p = 0,88$	40	$p = 0,95$	46	$p = 0,92$
C	12	$q = 0,12$	2	$q = 0,05$	4	$q = 0,08$
Genotipo	N°	frequenze	N°	frequenze	N°	frequenze
G/G	38	$p^2=0,78$	19	$p^2= 0,9$	21	$p^2=0,84$
G/C	12	$2pq= 0,2$	2	$2pq= 0,1$	4	$2pq= 0,16$
C/C	0	$q^2= 0,02$	0	$q^2= 0$	0	$q^2= 0$

Tabella 27: frequenze geniche e alleliche del polimorfismo 12256 G/C nel promotore del gene TP53.

Polimorfismo IVS 6+62 G/A	Controlli sani n=50		Pazienti con <u>glioma</u> n=21		Pazienti con <u>NF 1 e</u> <u>glioma</u> n=25	
	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze	N°alleli	frequenze
G	87	$p = 0,87$	34	$p = 0,8$	39	$p = 0,78$
A	13	$q = 0,13$	8	$q = 0,2$	11	$q = 0,22$
Genotipo	N°	frequenze	N°	frequenze	N°	frequenze
G/G	37	$p^2=0,76$	13	$p^2= 0,64$	15	$p^2=0,6$
G/A	13	$2pq= 0,22$	8	$2pq= 0,32$	9	$2pq= 0,35$
A/A	0	$q^2= 0,02$	0	$q^2= 0,04$	1	$q^2= 0,05$

Tabella 28: frequenze geniche e alleliche del polimorfismo IVS 6+62 G/A del gene TP53.

Si è effettuata poi un'analisi statistica dei dati ottenuti mediante test X^2 per verificare una possibile associazione tra la presenza dei polimorfismi e una predisposizione genetica allo sviluppo dei gliomi del nervo ottico.

Il test X^2 applicato alle frequenze alleliche e genotipiche dei due polimorfismi noti del gene TP53, analizzati nei pazienti e nel campione di controllo, sembra escludere un'associazione tra la presenza dei polimorfismi e una predisposizione genetica allo sviluppo dei gliomi del nervo ottico ($P>0,05$).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La Neurofibromatosi di tipo I, la più comune forma di neurofibromatosi, presenta un'estrema variabilità fenotipica sia inter- che intra-familiare; l'analisi comparativa tra tipo/sede di mutazione e fenotipo non consente di individuare una precisa correlazione tra genotipo e quadro clinico nei pazienti affetti. Risulta quindi chiaro che la prognosi in questi pazienti dipende non solo dalle variabili cliniche ma anche dalla precocità di identificazione delle complicanze che caratterizzano la malattia.

L'astrocitoma pilocitico del nervo ottico, glioma, è il tumore che insorge più frequentemente in pazienti affetti da NF1. La crescita di questi tumori è di solito lenta e può anche andare incontro a regressione spontanea, tuttavia un certo numero può continuare a crescere e provocare danni a carico delle strutture nervose coinvolte come cecità o disfunzioni ipotalamiche. Mentre numerosi studi hanno evidenziato che la presenza di microdelezioni, coinvolgenti l'intero gene NF1 e le sue regioni fiancheggianti, sia associata ad una maggiore frequenza di complicanze quali gli MPNST, non è ancora chiaro quali cambiamenti molecolari portino all'insorgenza di un glioma delle vie ottiche nei pazienti NF1 né cosa faccia sì che un astrocitoma pilocitico rimanga stabile o progredisca nel tempo danneggiando il tessuto nervoso: alterazioni genetiche associate con la patogenesi e la progressione di tali tumori non sono state infatti ancora caratterizzate.

Si è supposto quindi che oltre al gene NF1, altri fattori genetici possano intervenire nel modificare l'espressione della malattia (Wiest et al, 2003). L'eventuale identificazione di geni modificatori consentirebbe

- di effettuare uno screening delle mutazioni in questi geni nei soggetti affetti da NF1,
- di identificare quelli a maggior rischio di complicanze tumorali,
- di programmare per loro una valutazione ed un follow-up mirato,
- di fornire una diagnosi prenatale o presintomatica che tenga conto della gravità della malattia e della probabilità di insorgenza di complicanze tumorali.

Uno studio su topi geneticamente modificati (Zhu et al, 2005) ha dimostrato che topi knock out per il gene NF1 nel sistema nervoso centrale presentano una varietà di difetti nello sviluppo che porta ad una aumentata proliferazione delle cellule progenitrici della glia. Come conseguenza tutti i mutanti manifestano lesioni ai nervi ottici (iperplasia del nervo ottico) che possono progredire nel cervello dell'adulto fino a diventare dei gliomi delle vie ottiche.

Si può quindi supporre che nei pazienti NF1 la presenza di una mutazione nel gene NF1 a livello germinale predisponga all'insorgenza di tumori benigni e che per la trasformazione neoplastica siano necessari uno o più eventi a livello somatico che possono coinvolgere sia l'altra copia del gene NF1 che altri geni oncosoppressori.

Da studi condotti su pazienti con astrocitomi sporadici (non associati a NF1) di alto grado emerge che tali tumori possono presentare mutazioni a carico di p53, amplificazione del gene per il recettore dell'Epidermal Growth Factor (EGFR), delezioni del cromosoma 10q che coinvolgono PTEN e delezioni della regione 9q che coinvolge il gene CDKN2A (Kleihues *et al*, 2000).

In questo studio ci siamo quindi proposti di analizzare un gruppo di pazienti NF1 tutti presentanti glioma delle vie ottiche e un gruppo di soggetti con glioma delle vie ottiche senza diagnosi clinica di NF1 per valutare sia la presenza di particolari mutazioni a carico del gene NF1, sia la presenza di mutazioni nel gene CDKN2A, sia una possibile associazione tra lo sviluppo del tumore e la presenza di alcuni polimorfismi noti dalla letteratura nei geni onco-soppressori CDKN2A e TP53.

In letteratura sono riportati diversi polimorfismi che vengono associati a insorgenza o progressione tumorale, in particolare il C500G e il C540T in 3' UTR del gene CDKN2A (Sakano et al, 2003 e Sauroja et al, 2000) e IVS 6+62 G/A e 12256 G/C, nella regione del promotore, del gene TP53 (Malmer et al, 2005 e 2007).

La ricerca di mutazioni nel gene NF1 tramite DHPLC ha permesso di identificare mutazioni in 15/25 (60%) pazienti con glioma delle vie ottiche e diagnosi di NF1, un valore che conferma i dati riportati in letteratura (De Luca *et al.*, 2004) e che è dovuto sia alla sensibilità della metodica, sia al fatto che altri tipi di alterazioni non identificabili con la tecnica DHPLC possono provocare la malattia (delezioni/inserzioni di più esoni o dell'intero gene). Dai risultati osservati sembrerebbe non esserci una tipologia preferenziale di alterazione nucleotidica ma la maggior parte (67%) delle mutazioni sono

alterazioni che provocano la formazione di una proteina tronca (in accordo con i dati riportati in letteratura Fashold *et al.*, 2000).

I risultati dell'analisi mutazionale nel gene NF1 confermano quindi la mancanza di una correlazione genotipo (presenza di un certo tipo di mutazioni nel gene) -fenotipo (insorgenza del glioma delle vie ottiche) per i pazienti affetti da NF1.

La ricerca di mutazioni nel gene CDKN2A tramite DHPLC ha permesso di identificare due alterazioni nei soggetti NF1 in analisi, il polimorfismo G442A nell'esone 2, riportato da Puig *et al* in uno studio del 2005 ed una sostituzione, non riportata in letteratura, al 3' UTR del gene (C520G) che potrebbe rappresentare un nuovo polimorfismo.

L'analisi dei polimorfismi nei due geni CDKN2A e TP53 è stata effettuata con due diverse metodiche; questo ha consentito di valutare la HRMA rispetto alla RFLP e stabilire che la prima può essere considerata un valido strumento per l'analisi degli *SNPs*, in quanto presenta facilità di preparazione dei campioni, velocità di analisi *closed-tube*, costo ridotto per analisi, sensibilità e specificità che la rendono preferibile per studi futuri.

Per quanto riguarda i risultati statistici finali, il test χ^2 applicato alle frequenze alleliche e genotipiche dei due polimorfismi noti del gene CDKN2A e dei due polimorfismi noti del gene TP53, analizzati nei pazienti e nel campione di controllo, sembra escludere un'associazione tra la presenza dei polimorfismi e una predisposizione genetica allo sviluppo dei gliomi del nervo ottico ($P > 0,05$).

Tuttavia per il numero di soggetti analizzati non si possono considerare risultati definitivi. Sarà dunque importante rivalutare i dati ampliando il campione in studio e il numero di polimorfismi da analizzare.

In conclusione i risultati ottenuti da questo lavoro sembrerebbero per ora confermare una patogenesi molecolare dei gliomi del nervo ottico nei pazienti NF1 differente da quella degli astrocitomi pilocitici sporadici di alto grado che possono presentare mutazioni/delezioni a carico di p53, p16, pRB.

La limitazione principale dello studio è l'impossibilità di analizzare tessuto tumorale nel nostro campione di pazienti (NF1 e non-NF1). Le nostre conclusioni riguardano solo le mutazioni costituzionali. Per tale motivo abbiamo infatti focalizzato la nostra attenzione su polimorfismi per valutarne l'eventuale associazione con lo sviluppo di malattia.

Sono perciò necessari altri studi per chiarire quali eventi molecolari siano coinvolti nell'insorgenza e progressione tumorale dei gliomi del nervo ottico in pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo I.

6. BIBLIOGRAFIA

Ahuja H, Bar-Eli M, Advani SH, et al. *Alterations of the p53 gene and the clonal evolution of the blast crises of chronic myelogenous leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:6783-7.

Aravind L, Neuwald AF, Ponting CP. *Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling*. Curr. Biol (1999), 9 (6): R 195-7.

Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, Estivill X, Làzaro C. *Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients*. J Med Genet 2003; 40: e82.

Baker S, Fearon ER, Nigro J, et al. *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. Science 1989;244:217-21.

Bonnemaison E et al. *Complications de la neurofibromatose de type 1 chez l'enfant : a propos d'une serie de 100 cas*. Archives de pediatrie 2006, 13 :1009-1014.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. Science 1998;282:1497-501.

Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, et al. *Assignment of a locus for familiar melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22*. Science 258: 1080-1081, 1992.

Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, et al. *Localization of the 9p melanoma susceptibility locus (MLM) to a 2-cM region between D9S736 and D9S171*. Genomics, 23: 265-268, 1994.

Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, White R. *A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations.* Cell 1990; 62(1): 193-201.

Clementi M, Barbujani G, Turolla L, Tenconi R. *Neurofibromatosis-1: a maximum likelihood estimation of mutation rate.* Hum. Genet. 1990; 84: 116-118.

Crawford LV, Pim DC, Lamb P. *The cellular protein p53 in human tumors.* Mol Biol Med 1984;2:261-72.

Daston MM, Scrabble H, Nordlund M, Sturbaum AK, Nissen LM, Ratner N. *The protein product of neurofibromatosis type 1 gene is expressed at the highest abundance in neurons, Schwann cells and oligodendrocytes.* Neuron (1992) 8: 415-428.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, et al. *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse.* Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76:2420-4.

De Luca A, Buccino A, Gianni D, Mangino M, Giustizi S, Richetta A, Divona L, Calvieri S, Mingarelli R, Dalla Piccola B. *NF1 gene analysis based on DHPLC.* Hum Mutat. (2003) 21(2): 171-2.

De Luca A, Schirinzi A, Buccino A, Bottillo I, Sinibaldi L, Torrente I, Ciavarella A, Dottorini T, Porcello R, Giustizi S, Calvieri S, Dalla Piccola B. *Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in italian patients with neurofibromatosis type 1.* Human Mutation Mutation in Brief #716 (2004) Online.

De Raedt, Brems H, Wolkenstein P, et al. *Elevated risk for MPNST in Nf1 microdeletion patients.* Am J Hum Genet (2003); 72: 1288-92.

el-Deiry WS. *Regulation of p53 downstream genes.* Semin Cancer Biol 1998;8:345-57.

Eliyahu D, Goldfinger N, Pinhasi-Kimhi O, et al. *Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species*. *Oncogene* 1988;3:313-21.

Fashold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kücküceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kauffman D, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P. *Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain*. *Am J Hum Genet.* (2000); 66: 790-818.

Ferner RE, Gutmann DH. *International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1*. *Cancer Res* (2002) 62:1573-1577.

Foord OS, Bhattacharya P, Reich Z, Rotter V. *A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein*. *Nucleic Acids Res* (1991) 19:5191.

Gutmann DH, Geist RT, Douglas E, Wright E, Snider WD. *Expression of the neurofibromatosis type 1 (NF1) isoforms in developing and adult rat tissues*. *Cell growth and Differentiation* (1995); 6:315-323.

Han S, Cooper D, Upadhyaya M. *Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene*. *Hum. Genet.* (2001) 109:487-497.

Hattori S, Maekawa M, Nakamura S. *Identification of neurofibromatosis type 1 gene product as an insoluble GTP-ase-activating protein toward ras p21*. *Oncogene* (1992); 7:481-5.

Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, et al. *New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra*. *Mutat Res* 1999;31:199-209.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Skolnich MH, et al. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. *Science*, 264: 436-440, 1994.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. *Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage*. Cancer Res 1991;51:6304-11.

Kastan M, Zhan Q, El-Diery W, et al. *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia*. Cell 1992;71:587-98.

Kleihues P, Cavanee WK, World Health Organization Classification of Tumors, International Agency for Research on Cancer (IARC) *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System*. Lyon: IARC Press, 2000.

Lakkis MM, Tennekoon GI. *Neurofibromatosis type 1. I. General overview*. Journal of Neuroscience Research 2000; 62: 755-763.

Lane D, Crawford L. *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature 1979;278:261-3.

Larsen CJ. *p16^{INK4A}: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression*. Oncogene 12: 2041-2044, 1996.

Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, Carey JC. *Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation*. Am J Hum Genet. 1989 Jan; 44(1): 20-24.

Listernick R et al. *Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1. Consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force*. Ann Neurol 1997, 41: 143-149.

Malmer B, Feychting M, Lonn S, Ahlbom A, Henriksson R. *p53 genotypes and risk of glioma and meningioma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev (2005);14(9) :2220-2223.

Malmer B, Feychting M, Lonn S, Lindstrom S, Gronberg H, Henriksson R et al. *Genetic variation in p53 and ATM haplotype and risk of glioma and meningioma*. J Neurooncol (2007) 82: 229-237.

Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. *A novel p16^{INK4A} transcript*. Cancer Res, 55: 2995-2997. 1995.

Masuda H, Miller C, Koeffler HP, et al. *Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas*. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:7716-9.

Mattocks C, Baralle D, Tarpey P, French-Constant C, Bobrow M, Whittaker J. *Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11-17 distinct from the GAP related domain*. J Med Genet (2004); 41: e48.

McBride OW, Merry D, Givol D. *The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13)*. Proc Natl Acad Sci USA (1986); 83:130.

Meek DW, Eckhart W. *Phosphorylation of p53 in normal and simian virus 40-transformed NIH 3T3 cells*. Mol Cell Biol (1998); 8:461.

Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, De Paepe A. *Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects*. Human Mutation. (2000); 15: 541-555.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. *Deletions of the cyclin-dependent-kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature, 368: 753-756, 1994.

Perrone F, Tabano S, Colombo F, Dagrada G, Birindelli S, Gronchi A, Colecchia M, Pierotti M, Pilotti S. *p15, p14, and p16 inactivation in sporadic and neurofibromatosis type I-related malignant peripheral nerve sheath tumors*. Clinical Cancer Research Vol 9: 4132-4138, 2003.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, et al. *A model for p53-induced apoptosis*. Nature 1997;389:300-5.

Puig S, Malavehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D et al. *Role of CDKN2A Locus in patient with multiple primary melanomas*. Journal of Clinical Oncology 23: 3043-3051, 2005.

Quelle DE, Zindy F, Ashumn RA, Sherr J. *Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest*. Cell Vol 83: 993-1000, 1995.

Robbins *Basi patologiche delle malattie*, Ed It. Piccin, 2000.

Ruggieri M e Tenconi R. *Le Neurofibromatosi*. Associazione Linfa, Lottiano Insieme per la Neurofibromatosi- ONLUS- (2001).

Russo A. *Functions of CDKs: a review*. Nature, 395: 237-243, 1998.

Rutter JL, Goldstein AM, Davila MR, Tucker AM, Struewing P. *CDKN2A point mutation D153spl (c.457G>T) and IVS+1G>T result in aberrant splice product affecting both p16 and p14*. Oncogene, 22: 4444-4448, 2003.

Sakano S, Berggren P, Kumar R, Steineck G, Larsson P et al. *Clinical course of bladder neoplasms and single nucleotide polymorphisms in the cdkn2a gene*. Int.J Cancer (2003) 104: 98-103.

Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T, Kumar R et al. *Analysis of G1/S Checkpoint Regulators in Metastatic Melanoma*. Genes, Chromosomes and cancer (2000) 28:404-414.

Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW, Opitz JM, Reynolds JF. *Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2*. Am J Med Genet 1987; 28: 771-777.

Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Faryniarz AG, Chao MV et al. *Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene*. Cell 1987; 49(5): 589-594.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 366: 634-635, 1993.

Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. *Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1)*. J Med Genet (1996); 33: 2-17.

Soussi T, Caron de Fromental C, May P. *Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution*. Oncogene (1990); 5:945;

Stenger JE, Mayr GA, Mann K, Tegtmeyer P. *Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers*. Mol Carcinogen (1992); 5: 102;

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnel BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2*. The Embo journal Vol 17: 5001-5014, 1998.

Upadhyaya M, Shaw DJ and Harper PS. *Molecular basis of neurofibromatosis type 1 (NF1): mutation analysis and polymorphisms in the NF1 gene*. Human Mutation (1994) 4:83-101.

Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L. *Neurofibromin is actively transported to the nucleus*. FEBS Lett. (2004); 560 (1-3): 98-102.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. *Surfing the p53 network*. Nature 2000;408:307-10.

White R, Nakamura Y, O'Connell P, Leppert M, Lalouet JM, Barker D, Golgar D, Skolnick M, Carey J, Wallis CE. *Tightly linked markers for the neurofibromatosis type 1 gene*. Genomics (1987) 1:364-7.

Wiest V, Eisenbarth I, Schmegner C, Krone W, Assum G. *Somatic NF1 mutation spectra in a family with Neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers*. Hum Mutat. (2003); 22: 423-427.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. *Subunit rearrangement of the cyclin dependent kinases is associated with cellular transformation*. Genes Dev. 7: 1572-1583, 1993.

Zhu Y, Harada T, Liu L, Lush ME, Gutmann DH et al. *Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation*. Development (2005) Dec; 132 (24): 5577-88.

7. ALLEGATI

7.1 PAZIENTI IN ANALISI

Identificativo paziente	data nascita	Gravità NF1	Tipo di glioma	Neuro fibromi	altre neoplasie	Altro
3527	30/09/87	4	perdita funz nervo ottico dx	si	no	
3458	15/05/94	3	glioma monolaterale	si	Sosp. subependimoma	
3445	22/10/51	3	nn	si	nn	
3303	09/03/91	4	astrocitoma pilocitico ipotol- chiasmatico	no	no	
3261	14/08/95	3	Sosp.glioma bilat. più evidente dx	no	no	
3142	19/11/97	4	glioma nervo ottico sx e sosp.dx	no	no	
3028	01/10/95	3	glioma nervo ottico dx	no	no	
2961	24/09/71	4	glioma nervi ottici e chiasma	si	meningioma cordoite	idrocefalo triventricolare
2811	14/05/98	4	glioma delle vie ottiche	no	no	
2551	25/05/98	3	glioma dei nervi ottici e del S.N. prechiasm e retrobulbare dx	no	no	
2361	20/04/95	3	ingrossamento nervi ottici e chiasma ottico	no	no	
2274	25/07/88	3	glioma monolaterale	no	no	
2111	25/07/81	4	glioma prechiasmatico, del chiasma e del nervo ottico sx	si	no	idrocefalia e dilatazione dei ventricoli
2107	24/03/94	3	glioma monolaterale	no	no	
1745	01/10/94	4	glioma del chiasma con infiltraz peduncolo- ipofisarie	no	no	diabete mellito insulino- dipendente

1598	03/06/80	4	glioma gigante del III ventricolo ad origine dal chiasma (astrocitoma)	no	no	sindrome di Russel
1477	01/08/94	4	glioma ipotalamo-chiasmatico	no	no	cecità, isch. cerebrale per stenosi carotide interna
1393	02/03/74	4	glioma monolaterale	si	Astrocitoma pilocitico sottocorticale dx	
673	24/09/72	3	Glioma del chiasma e dei nervi ottici	si	no	
630	19/12/80	4	Astrocitoma pilocitico del chiasma e nervi ottici	si	no	
621	13/07/92	3	Astrocitoma pilocit. di I grado chiasma e nervi ottici	no	no	
492	16/04/89	4	Glioma ipotalamo-chiasmatico e sosp.glioma a liv. tronco-encefalico	no	no	Ritardo mentale
482	03/02/92	3	Glioma del chiasma e dei nervi ottici	no	no	
99	03/08/89	4	Glioma del chiasma	no	no	
3612	09/07/03	nn	Astrocitoma pilocitico del nervo ottico di grado I	nn	nn	

Tabella 29: pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), con diagnosi confermata di glioma del nervo ottico, provenienti dall'Azienda ospedaliera di Padova.

Codice Estrazione	data nascita	NF1	glioma ottico
3319	16/04/03	nn	si
3320	22/06/96	nn	si
3321	08/11/90	nn	si
3322	07/10/96	nn	si
3323	29/10/88	nn	si
3324	06/12/02	nn	si
3325	08/02/98	nn	si
3326	/06/02/97	nn	si
3327	30/05/99	nn	si
3328	05/05/97	nn	si
3378	20/07/98	nn	si
3379	24/10/02	nn	si
3380	23/07/97	nn	si
3381	03/02/98	nn	si
3382	07/12/95	nn	si
3383	24/07/97	nn	si
3384	17/08/88	nn	si
3385	23/11/96	nn	si
3386	21/02/03	nn	si
3387	19/05/83	nn	si
3388	02/12/83	nn	si

Tabella 30: pazienti con diagnosi confermata di glioma ipotalamo-chiasmatico delle vie ottiche, provenienti dall'ospedale pediatrico Meyer, Unità di Neurochirurgia, Firenze.

7.2 TABELLE RISULTATI ANALISI DEI POLIMORFISMI

Pazienti con glioma	540C>T	500C>G
3319	C/C	C/C
3320	C/C	C/C
3321	C/C	C/C
3322	C/C	C/C
3323	C/C	C/C
3324	C/C	Het
3325	C/C	Het
3326	C/C	C/C
3327	C/C	C/C
3328	Het	C/C
3378	C/C	Het
3379	C/C	G/G
3380	C/C	C/C
3381	C/C	Het

3382	C/C	Het
3383	C/C	C/C
3384	C/C	C/C
3385	C/C	C/C
3386	C/C	Het
3387	Het	C/C
3388	Het	C/C

Tabella 31: genotipi dei polimorfismi del gene CDKN2A nei pazienti con glioma del nervo ottico, provenienti dall'ospedale pediatrico Meyer, Unità di Neurochirurgia, Firenze.

Pazienti NF1 con glioma	540C>T	500C>G
3527	C/C	C/C
3458	C/C	C/C
3445	Het	C/C
3303	C/C	Het
3261	Het	C/C
3142	C/C	C/C
3028	Het	C/C
2961	C/C	C/C
2811	C/C	C/C
2551	C/C	C/C
2361	C/C	G/G
2274	C/C	C/C
2111	C/C	C/C
2107	Het	C/C
1745	C/C	C/C
1598	C/C	C/C
1477	C/C	C/C
1393	C/C	C/C
673	C/C	C/C
630	C/C	C/C
621	C/C	Het
492	C/C	C/C
482	C/C	Het
99	C/C	C/C
3612	Het	C/C

Tabella 32: genotipi dei polimorfismi del gene CDKN2A nei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), con diagnosi confermata di glioma del nervo ottico, provenienti dall'Azienda ospedaliera di Padova.

Pazienti con glioma	prom p53	IVS6 p53
3319	omo G	omo G
3320	omo G	omo G
3321	omo G	omo G
3322	omo G	omo G
3323	omo G	het
3324	omo G	het
3325	omo G	omo G
3326	omo G	omo G
3327	omo G	omo G
3328	omo G	het
3378	het	het
3379	omo G	omo G
3380	omo G	omo G
3381	omo G	omo G
3382	omo G	het
3383	omo G	het
3384	omo G	omo G
3385	het	het
3386	omo G	het
3387	omo G	omo G
3388	omo G	omo G

Tabella 33: genotipi dei polimorfismi del gene TP53 nei pazienti con glioma del nervo ottico, provenienti dall'ospedale pediatrico Meyer, Unità di Neurochirurgia, Firenze.

Pazienti NF1 con glioma	prom p53	IVS6 p53
3527	omo G	omo G
3458	omo G	omo G
3445	omo G	het
3303	omo G	omo G
3261	het	het
3142	omo G	omo G
3028	omo G	omo G
2961	omo G	omo G
2811	omo G	omo G
2551	omo G	het
2361	omo G	omo G
2274	omo G	het
2111	omo G	omo G
2107	omo G	het
1745	omo G	het
1598	omo G	het
1477	omo G	omo G
1393	omo G	omo G
673	omo G	het

630	het	omo G
621	omo G	omo G
492	omo G	omo G
482	het	het
99	omo G	omo G
3612	het	omo A

Tabella 34: genotipi dei polimorfismi del gene TP53 nei pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), con diagnosi confermata di glioma del nervo ottico, provenienti dall'Azienda ospedaliera di Padova.