

Claudio Rabacchi, Elena Tenedini, Isabella Bernardis, Maria Luisa Simone, Enrico Tagliafico, Patrizia Tarugi

Università di Modena e Reggio Emilia
Centro Interdipartimentale di Ricerche Genomiche



UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA



ACGR UNIMORE
CENTER FOR GENOME RESEARCH

DIAGNOSI MOLECOLARE DI IPERTRIGLICERIDEMIE PRIMITIVE ATTRAVERSO NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

INTRODUZIONE

L'ipertrigliceridemia severa è una condizione caratterizzata da elevati livelli di trigliceridi (TG) superiori a 1000 mg/dl ed accumulo di chilomicroni a digiuno. Questa condizione è rivelata dalla presenza di plasma lattescente e può essere secondaria (es. in corso di diabete scompensato, sindrome nefrosica grave etc.) o primitiva su base genetica. La forma primitiva prende il nome di Chilomicronemia

Familiare (CF).

Il quadro clinico della CF può comprendere: coliche addominali, pancreatiti ricorrenti, xantomi eruttivi, lipemia retinalis, ed epatomegalia. Questo disordine ha una modalità di trasmissione autosomica recessiva ed è dovuto a mutazioni in uno dei geni coinvolti nella cascata lipolitica intravascolare, il processo attraverso il quale i trigliceridi trasportati dai chilomicroni e dalle VLDL sono idrolizzati nel

plasma.

I principali geni candidati tradizionalmente considerati sono cinque: il gene LPL che codifica per l'enzima lipasi lipoproteica; il gene APOC2 ed il gene APOA5 che codificano per due apolipoproteine che svolgono il ruolo di attivatori della LPL; il gene GPIHBP1 che codifica la piattaforma molecolare per la LPL, ed infine il gene LMF1 che codifica per una proteina coinvolta nella maturazione intracellulare della LPL

XIX CONGRESSO NAZIONALE SIGU



TORINO
23-26 Novembre 2016

MATERIALI E METODI

E' stata utilizzata la tecnologia "Next Generation Sequencing" (NGS) "Ion Torrent" che nel nostro laboratorio prevede l'analisi in parallelo di un pannello di 19 geni coinvolti nel metabolismo delle lipoproteine contenenti trigliceridi.

LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1, LMF1, APOE, LPC, LIPG, APOC3, GPD1, ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL8, CREB3L3, GALNT2, MLXIPL, TRIB1, GCKR, APOB (esoni 26 e 29)].

Le varianti genomiche riscontrate con NGS sono state confermate con il metodo di sequenziamento Sanger. Le varianti «nuove» (non presenti nei database) o non studiate in letteratura sono state analizzate in silico per valutarne il possibile effetto patogenetico tramite diversi algoritmi informatici quali POLYPHEN-2, PANTHER, SIFT, PROVEAN

RISULTATI

L'analisi ha portato all'identificazione di quattro condizioni definite come assetto genotipico:

- 1) **“atteso”** caratterizzato da mutazioni o varianti funzionali dei geni candidati maggiori, riscontrato in 6 pazienti;
- 2) **“inatteso”** caratterizzato da mutazioni o varianti funzionali di geni minori, riscontrato in un paziente;
- 3) **“complesso”** caratterizzato dalla presenza di multiple varianti genomiche rare in vari geni, riscontrato in un paziente
- 4) **“negativo”** caratterizzato dall'assenza di varianti patogenetiche nei geni esaminati, identificabili con i metodi di sequenziamento utilizzati, riscontrato in 4 pazienti.

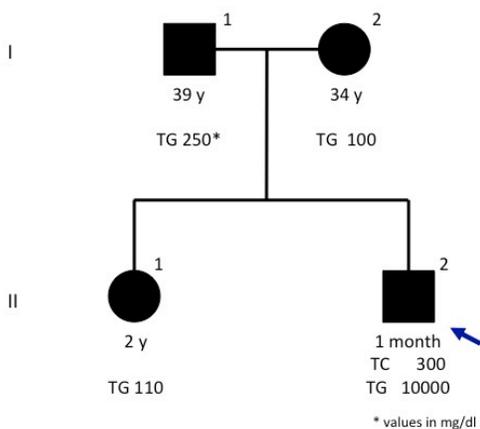
Assetto genotipico “atteso”.

Sei pazienti con assetto genotipico “atteso” sono risultati portatori di mutazioni

patogenetiche o varianti funzionali nei geni candidati **“maggiori”** coinvolti nella lipolisi intravascolare: LPL, APOA5, GPIHBP1.

Questo gruppo comprendeva:

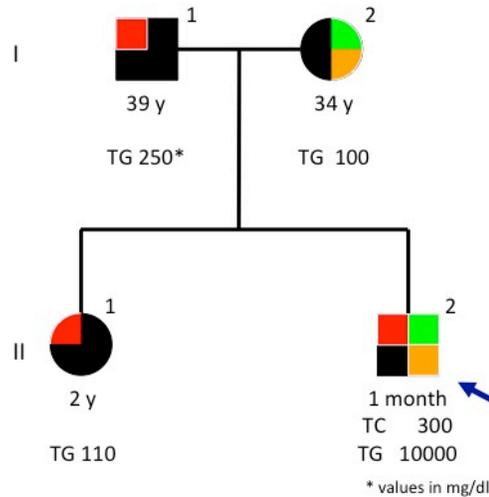
- a) un omozigote per una mutazione nonsense p.Cys89* di GPIHBP1;
- b) un etero-composto per mutazioni (p.Arg214Ile/p.Glu282*) di LPL ed eterozigote semplice per la variante p.Gly248Val di LPC (un gene “minore” codificante la Lipasi Epatica);
- c) un doppio eterozigote per una mutazione di LPL (p.Trp113Arg) ed una variante funzionale (p.Gly185Cys) di APOA5;
- d) un doppio eterozigote per due varianti funzionali di LPL (p.Asn318Ser) e di APOA5 (p.Ser19Trp);
- e) due eterozigoti per varianti funzionali di LPL (p.Asn318Ser) e di GPIHBP1 (p.Cys14Phe)



Esempio di assetto genotipico “atteso”. (Family V)

E' pervenuto alla nostra attenzione un bambino di 1 mese (II.2) nato a termine, indicato dalla freccia. L'osservazione di plasma lattescente durante un prelievo di routine, ha indotto a dosare i lipidi plasmatici. Il livello dei trigliceridi (TG) è risultato pari a 10000 mg/dl mentre il colesterolo totale (TC) è risultato pari a 300 mg/dl. I genitori, non consanguinei, e la sorella del probando erano in buona salute. La madre (I.2) e la sorella (II.1) presentavano valori di TG normali, mentre il padre (I.1) aveva una lieve ipertrigliceridemia

- LPL, p.Glu282*, rare mutation
- LPL, p.Arg214Ile, new variant (predicted DAMAGING)
- LIPC, p.Gly248Val, reported rare variant (predicted DAMAGING)



Come illustrato nella figura a sinistra in alto, il sequenziamento del probando II.2 ha rivelato la presenza allo stato eterozigote di una rara mutazione nonsense (p.Glu282*, indicata in rosso, sicuramente patogenetica) e di una nuova variante missenso (p.Arg214Ile, indicata in verde) del gene LPL, predetta essere dannosa. Inoltre, il probando (II.2) risultava portatore eterozigote di una variante missenso rara del gene LIPC (p.Gly248Val), codificante la lipasi epatica, predetta essere dannosa.

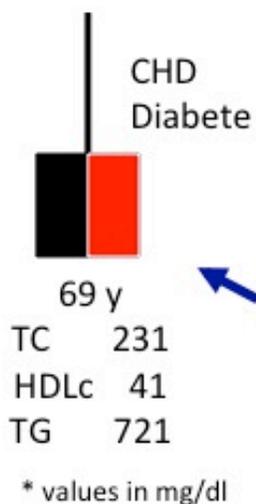
Si sono analizzati gli altri membri della famiglia e la situazione è riassunta nella figura a lato.

Il probando (II.2) risulta essere un soggetto eterozigote composto per due mutazioni del gene LPL, quindi avere un deficit di lipasi lipoproteica (LPL). In aggiunta, egli è portatore eterozigote di una rara variante del gene LIPC.

La mutazione del gene LPL indicata in rosso è presente anche nella sorella (II.1) in eterozigosi e nonostante la sua gravità, non sembra avere influenza sui livelli di TG. Nel padre (I.1), invece, questa stessa mutazione, sempre allo stato eterozigote, potrebbe avere un effetto incrementale sui livelli di TG, che sono moderatamente elevati. La madre (I.2), normotrigliceridemia, è portatrice eterozigote della variante missenso del gene LPL e della variante della lipasi epatica. Potenzialmente, questa donna potrebbe sviluppare un'ipertrigliceridemia in concomitanza con qualche fattore aggiuntivo ad esempio una gravidanza, un incremento ponderale o semplicemente con l'avanzare dell'età

Assetto genotipico "inatteso"

Il caso di assetto genotipico "inatteso" è rappresentato da un paziente di 69 anni (indicato dalla freccia), con storia positiva di malattia coronarica (CHD) e diabete, valori di TG elevati,



■ APOB, p.Ala4148Glu

variabili tra 700 e 1000 mg/dl, mostrato nella figura a sinistra in basso.

Egli è risultato eterozigote per una nuova variante missenso del gene APOB (non coinvolto direttamente nella cascata lipolitica), localizzata nella regione carbossi-terminale che consiste nella sostituzione dell'alalina in posizione 4148 con un acido glutammico (p.Ala4148Glu). L'analisi in silico prediceva che questa variante potesse avere un effetto dannoso. La proteina apoB-100 rappresenta il principale componente proteico delle lipoproteine VLDL sintetizzate dal fegato. Essa rientra nella cascata lipolitica in quanto componente costitutiva fondamentale delle VLDL. Quale impatto potrebbe avere questa variante in vivo? La proteina apoB-100 mutata potrebbe:

- i) rendere le VLDL «resistenti» all'azione della Lipasi?
- ii) aumentare la produzione epatica di VLDL ricche in trigliceridi?
- iii) non avere alcun effetto sul livello dei trigliceridi?

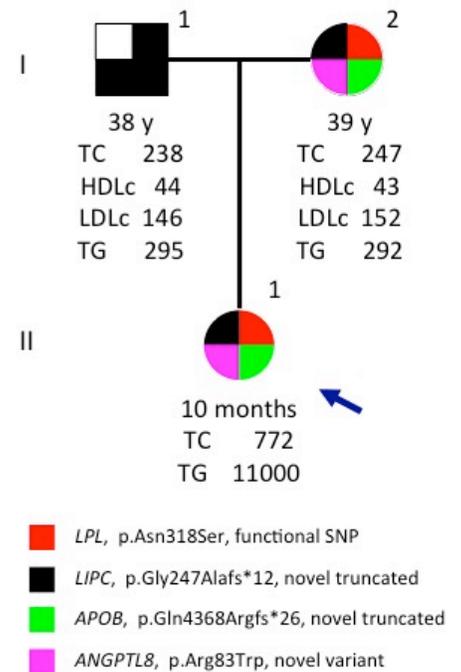
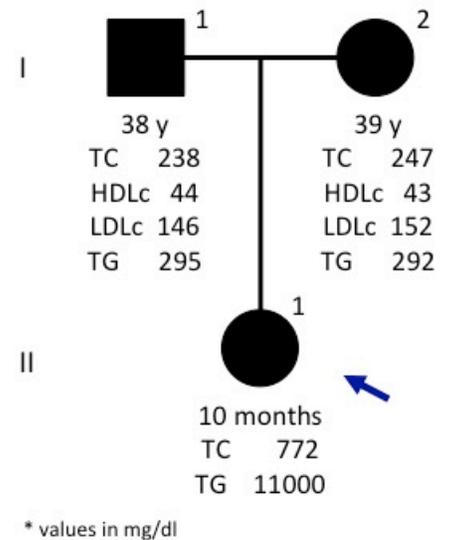
Queste domande rimangono tuttora aperte.

Assetto genotipico “complesso”

La probanda, indicata dalla freccia (II.1), (figura a destra, in alto) è una bambina di 10 mesi, che presentava una severa ipertrigliceridemia, con valori di trigliceridi pari a 11000 mg/dl. I genitori mostravano un profilo lipidico simile tra loro, caratterizzato da un'ipertrigliceridemia moderata. L'analisi genetica ha rivelato un assetto genotipico “complesso” nella piccola paziente (II.1) che consiste nella presenza di 4 varianti, in eterozigosi, in quattro geni diversi (figura sottostante):

- a. un polimorfismo funzionale di LPL (p.Asn318Ser) con basso impatto sui livelli plasmatici dei TG, indicata in rosso;
- b. due varianti a sicuro effetto patogenetico:
 - i. una del gene della lipasi epatica (LIPC) (p.Gly247Alafs*12), indicata in nero;
 - ii. una del gene APOB (p.Gln4368Argfs*26), indicata in verde; che determinano la formazione di proteine tronche;
- c. una nuova variante missenso del gene ANGPTL8, codificante la angiopoietin-like protein 8, che è un inibitore fisiologico della LPL (p.Arg83Trp) indicata in viola.

Si sono analizzati gli altri membri della famiglia e la situazione è riassunta nella figura a destra in basso. Il padre (I.1) è risultato portatore della variante della lipasi epatica (LIPC), mentre la madre (I.2) è portatrice delle altre 3 varianti (LPL, APOB e ANGPTL8). Entrambi presentavano una moderata ipertrigliceridemia. Quindi, nella probanda, le varianti della LPL e della Lipasi epatica potrebbero contribuire all'ipertrigliceridemia, ma non spiegare livelli così elevati di TG. La variante nell'APOB dà luogo ad una forma troncata, situazione che ci si attende di trovare nell'ipobetalipoproteinemia familiare, una condizione caratterizzata da bassi livelli di VLDL e TG; non riscontrata né nella probanda né nella madre. La variante ANGPTL8 (inibitore fisiologico della Lipasi) potrebbe configurarsi come perdita o guadagno di funzione. Nel primo caso si ridurrebbe l'inibizione della LPL dando luogo ad una situazione di ipotrigliceridemia; nel caso di un guadagno di funzione, aumenterebbe l'inibizione della LPL che determinerebbe una condizione di ipertrigliceridemia. Infine, l'ipertrigliceridemia potrebbe avere un'altra patogenesi indipendente dalle varianti riscontrate nel pannello di geni esaminato



CONCLUSIONI

La procedura NGS consente di analizzare in parallelo un gruppo di geni ritenuti coinvolti nel metabolismo dei trigliceridi e quindi rivelare, in tempi brevi, le basi molecolari delle ipertrigliceridemie, che possono coinvolgere più geni, alcuni dei quali in precedenza trascurati perché considerati “minori”. Nel contempo, questa tecnologia porta all'identificazione di varianti genomiche rare in geni multipli il cui impatto funzionale e ruolo patogenetico nell'indurre ipertrigliceridemia rimane al momento indefinito e la selezione di pazienti negativi ai test di primo livello e sui quali eseguire ulteriori studi.