

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

TESI DI LAUREA

**CARATTERIZZAZIONE DI MUTAZIONI NEL GENE
COL5A1 CHE CAUSANO APLOINSUFFICIENZA NELLA
SINDROME DI EHLERS - DANLOS**

Relatore: Ch.mo Prof. M. ZORDAN
Dipartimento di Biologia, Università di Padova

Correlatore: dott.ssa A. SANGALLI
Dipartimento Materno Infantile e di Biologia-Genetica
Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona

Laureando: CLAUDIO ESPOSITO

ANNO ACCADEMICO 2005 - 2006

INDICE

RIASSUNTO	5
INTRODUZIONE	
La sindrome di Ehlers-Danlos	7
Alterazioni biochimiche	10
<i>Il collagene</i>	12
<i>Il collagene V</i>	14
Aspetti genetici	18
<i>Eterogeneità genetica</i>	20
Aploinsufficienza nel gene COL5A1	22
SCOPO DEL LAVORO	27
MATERIALI E METODI	29
RISULTATI	45
DISCUSSIONE	53
CONCLUSIONI	57
BIBLIOGRAFIA	59

RIASSUNTO

Il termine sindrome di Ehlers Dahnlos (EDS) indica un gruppo eterogeneo di malattie ereditarie del tessuto connettivo. Tra le varie forme classificate, il tipo classico (tipo I, MIM 13000 e tipo II, MIM 130010) presenta caratteristiche cliniche e genetiche abbastanza omogenee. Si è dimostrato che mutazioni di carattere dominante nel gene COL5A1, codificante per le catene $\alpha 1(V)$ del collagene sono la causa molecolare più frequente (50%) dei casi studiati. È inoltre noto che mutazioni che creano codoni di terminazione prematuri portano alla degradazione dell'mRNA tramite un processo definito **Nonsense Mediated Decay**; i dati in letteratura indicano che un terzo delle mutazioni di COL5A1 sono del tipo allele nullo.

Un saggio per identificare mutanti per COL5A1 in cui uno dei due alleli produce mRNA instabile è stato utilizzato per controllare dieci pazienti con diagnosi di EDS di tipo classico. DNA e RNA sono stati estratti da colture di fibroblasti e genotipizzati con quattro marcatori polimorfici intragenici. In nove di questi pazienti si è verificato uno stato di eterozigosi per almeno uno dei marcatori; una successiva verifica a livello di cDNA ha dimostrato che sette di questi nove individui mostravano totale o marcata riduzione di uno dei due trascritti (aploinsufficienza). In questi sette soggetti si è proceduto poi a stabilizzare l'mRNA mutante trattando le cellule con cicloesimide, un inibitore della sintesi proteica che ha altresì la capacità di stabilizzare l'RNA messaggero.

Sono state quindi cercate mutazioni non senso nella sequenza codificante di COL5A1 mediante *Protein Truncation Test*. In due individui sono state riscontrate mutazioni puntiformi tipo frame-shift e codoni di stop prematuri.

Nei cinque pazienti negativi al PTT si è proceduto a sequenziare l'intero cDNA di COL5A1. In uno di questi soggetti si è riscontrata una mutazione puntiforme del tipo frame-shift. Tre dei quattro rimanenti presentano splicing alternativo in un esone, condizione che però si configura come non patologica, essendo presente anche in un soggetto normale. In seguito nei quattro soggetti rimanenti si sono analizzate le sequenze del 5'UTR e del 3'UTR, non riscontrando alcuna mutazione.

INTRODUZIONE

La sindrome di Ehlers-Danlos (EDS) comprende un gruppo vasto ed eterogeneo di malattie ereditarie che colpiscono i tessuti connettivi, principalmente a livello della pelle, dei legamenti, delle giunture e dei vasi sanguigni.

La variabilità di queste patologie rare si traduce in una variabilità a livello dei fenotipi clinici unitamente ad un'eterogeneità genetica che coinvolge diverse componenti della matrice. Opportune diagnosi cliniche, supportate da analisi biochimiche, di microscopia elettronica, e da analisi molecolari, hanno reso possibile una precisa identificazione e classificazione delle sindromi di Ehlers-Danlos. Le prime osservazioni cliniche risalgono agli inizi del XX secolo quando i medici Edvard **Ehlers (1901)** ed Henri Alexandre **Danlos (1908)**, per primi descrissero i sintomi caratteristici di questa malattia, rappresentati da ipermobilità articolare, estensibilità cutanea e fragilità generalizzata dei tessuti.

Beighton nel 1988 [Beighton et al., 1988] elaborò una prima classificazione, nella quale venivano distinte ben undici diverse forme di Ehlers-Danlos, ognuna associata al proprio tipo di ereditarietà mendeliana, sia esso autosomico dominante, autosomico recessivo, o legato al cromosoma X.

Attualmente viene accettata la classificazione proposta nel 1997 a Villefranche in Francia [Beighton et al., 1998], la quale accorpa in soli sei gruppi tutte le tipologie, risultando così notevolmente semplificata (cfr. Tabella 1).

La sindrome di Ehlers-Danlos colpisce mediamente un individuo su 5000 (Pyeritz et al., 2000) e non mostra una predisposizione di carattere etnico.

EDS tipo classico

Il quadro clinico può variare in gravità: nella vecchia classificazione si distinguevano un tipo *gravis* ed un tipo *mitis*, ma lo spettro di variabilità fenotipica è continuo. La sindrome di Ehlers-Danlos di tipo classico si trasmette con un'ereditarietà autosomica dominante.

I principali segni sono cutanei: iperestensibilità della cute, che si presenta vellutata e fragile, la cicatrizzazione è scarsa e lenta con cicatrici atrofiche

allargate ("a carta di sigaretta") e lesioni "molluscoidi" nelle zone di pressione (ginocchia, gomiti). Le articolazioni sono ipermobili e vanno quindi frequentemente incontro a sublussazioni che, nelle forme più gravi, possono rendere difficoltosa la marcia, ma anche la statica (piede piatto, ginocchio recurvato); sono presenti dolori articolari e insorgenza precoce di osteoartriti. In alcuni casi la crescita in statura è nettamente insufficiente ed è presente una cifoscoliosi. Radiologicamente può essere presente una deformità a cuneo di alcune vertebre o una spondilodistesi, mentre le ossa lunghe mostrano solamente leggeri incurvamenti.

I neonati affetti sono in genere prematuri a causa di rottura precoce delle membrane fetali.

Il presente lavoro di tesi si focalizza sulle basi genetico molecolari dell'EDS di tipo classico, la forma più frequente. Per completezza vengono di seguito descritte brevemente altre forme di EDS ed un quadro riassuntivo è presentato in Tabella 1.

ALTRI TIPI DI EDS

EDS di tipo cardiovascolare

È la forma clinica più grave di EDS, in cui la probabilità di sopravvivenza (l'età media è di 48 anni) è minacciata da rottura improvvisa di arterie, intestino, utero nelle donne gravide. Gli individui affetti presentano pelle sottile, translucida con il reticolo venoso sottostante ben evidente e con ecchimosi diffuse; il volto è caratteristico, con naso sottile e appuntito, occhi sporgenti, guance incavate, labbra sottili. L'ereditarietà è autosomica dominante.

EDS di tipo oculoscoliotico

Segni clinici distintivi sono dati da scoliosi fin dalla nascita che progredisce con l'età, da ipotonia muscolare marcata, miopia, distacco della retina e fragilità delle sclere, che può causare rottura del bulbo ottico in seguito a trauma

lieve. Altri segni, comuni ad altri tipi di EDS, riguardano la cute che risulta fragile, iperestensibile, facile alle ecchimosi e con cicatrici diffuse.

L'ereditarietà è di tipo autosomico recessivo: la patologia è stata riscontrata in famiglie con alto grado di consanguineità.

EDS tipo artrocalasia

La lussazione congenita dell'anca è presente in tutti gli individui affetti, mentre altre manifestazioni cardinali sono rappresentate da micrognazia, bassa statura e marcata ipermobilità articolare. L'ereditarietà è autosomica dominante e per quanto concerne difetti a livello genetico, in genere vengono descritti casi sporadici piuttosto che familiari.

EDS tipo dermatosparassi

I maggiori criteri diagnostici sono rappresentati da una marcata fragilità e da ridondanza della pelle, oltre che da una certa facilità di contusione. Altre manifestazioni riguardano la rottura prematura delle membrane fetali e la comparsa di ernie inguinali oppure ombelicali. È una forma piuttosto rara che si trasmette con un'eredità autosomica recessiva.

Nome	Vecchia classificazione	Fenotipo clinico	Ereditarietà
<i>Tipo classico</i>	EDS I/II	Iperestensibilità della pelle, cicatrici atrofiche sparse, ipermobilità articolare	A D
<i>Tipo vascolare</i>	EDS IV	Pelle sottile, fragilità a livello di arterie, intestino, utero; ecchimosi diffuse e volto caratteristico.	A D
<i>Tipo ipermobile</i>	EDS III	Pelle iperestensibile e/o soffice e vellutata	AD
<i>Tipo oculoscoliotico</i>	EDS VI	Lassità generalizzata delle giunture, ipotonia muscolare e scoliosi alla nascita, fragilità delle sclere	A R

<i>Tipo artroclasia</i>	EDS VIIA/B	Ipermobilità generalizzata con frequenti sublussazioni; dislocazione congenita all'anca	A D
<i>Tipo dermatosparassi</i>	EDS VIIC	Fragilità e ridondanza della pelle	A R
<i>Altri tipi</i>	EDS V	-	X L
	EDS VIII	friabilità periodontale	A D
	EDS IX	sindrome del corno occipitale	X L
	EDS X	-	?
	EDS XI	sindrome dell'ipermobilità articolare	A D

Tabella 1: Classificazione delle varie forme di sindrome di Ehlers Danlos secondo la classificazione proposta a Villefranche, 1997 [Beighton et al., 1998]. È riportata in tabella anche la vecchia classificazione. Nell'ultima colonna è mostrato il tipo di ereditarietà. AD= autosomico dominante; AR= autosomico recessivo; XL= legato all'X.

ALTERAZIONI BIOCHIMICHE

Le alterate proprietà meccaniche dei tessuti connettivi, tipiche degli individui EDS, indicano nei componenti della matrice i principali candidati per il difetto di base di questa malattia.

Studi morfologici effettuati sulla pelle di pazienti affetti da EDS classico [Vogel et al., 1979] mostrano anomalie nell'organizzazione di specifiche fibrille collageniche, e nella fattispecie quelle generate da una precisa associazione del collagene di tipo I con il collagene di tipo V. La presenza di una *fibrillogenesi alterata* nei tessuti connettivi degli individui malati, si manifesta con una variazione del diametro fibrillare, che può arrivare ad un incremento del 13%-40%, e con un alto grado di variabilità nella forma stessa delle fibrille. In sezione longitudinale si evidenzia una marcata disorganizzazione nell'assemblamento delle fibrille, mentre in sezione trasversale si possono osservare profili molto irregolari [Nicholls et al., 1996].

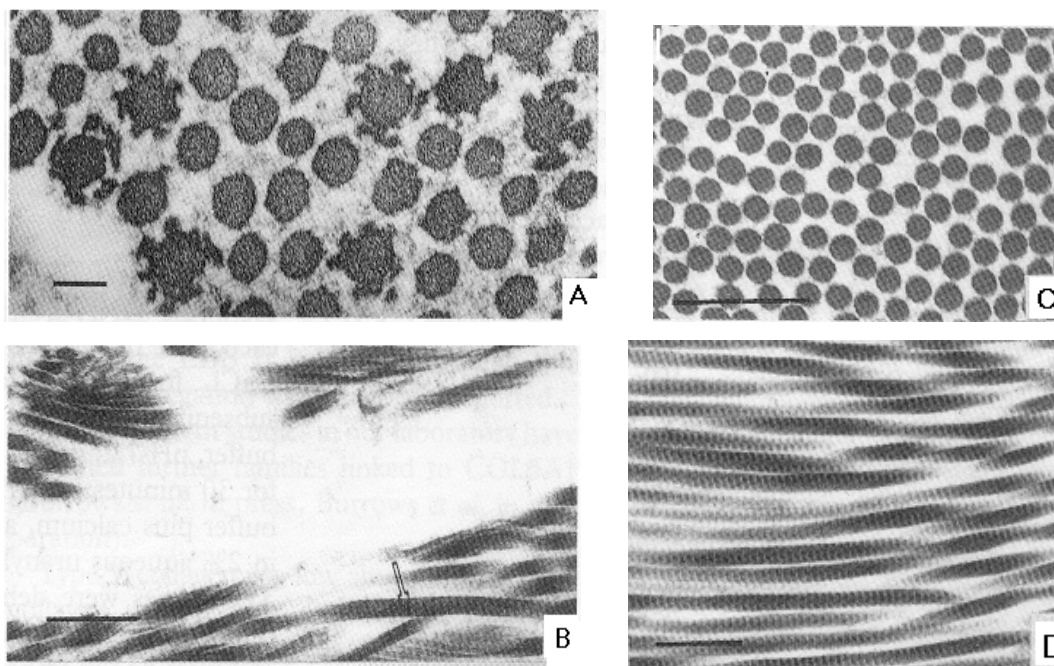


Figura 1: Microscopia elettronica della pelle. Sezione trasversale (A) e longitudinale (B) di fibrille di collagene di un individuo malato: si notano i bordi irregolari e l'assemblamento disorganizzato. Sezioni trasversale (C) e longitudinale (D) di fibrille di collagene di un individuo sano (tratta da Nicholls et al., 1996).

Ulteriori analisi a livello biochimico sono state compiute sulle catene $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ del collagene V, sintetizzato da colture di fibroblasti di pazienti con EDS classico, vascolare e tipo artrocalasia. Tali studi hanno evidenziato, per queste due proteine, una mobilità in gel SDS-PAGE inferiore alla norma, dovuta ad eccessive modificazioni post-traduzionali [Nicholls et al., 1994] e la presenza di una popolazione di catene $\alpha 1$ più corte del normale [Nicholls et al., 1996]. I risultati di questi esperimenti hanno contribuito a dimostrare che alterazioni in queste catene possono determinare il fenotipo della sindrome di Ehlers-Danlos.

Nonostante le alterazioni del collagene siano le manifestazioni morfologiche più frequenti negli individui EDS, in alcuni casi sono state identificate ulteriori anomalie in altre proteine della matrice extracellulare.

Mutazioni in una proteina non collagenica, la tenascina-X, si sono dimostrate causa di un fenotipo autosomico recessivo molto simile all'EDS di tipo classico. La tenascina-X è una proteina della membrana extracellulare la cui funzione non è ancora del tutto compresa, che sembra giocare un ruolo importante

nella regolazione della del collagene nei fibroblasti del derma [Mao et al., 2002]. Una completa mancanza di tenascina-X è stata riscontrata in pazienti con fenotipo simile all'EDS classico. Mutazioni troncanti o larghe delezioni erano presenti in entrambi gli alleli della tenascina-X, il che rivela il carattere recessivo di questa condizione.

Sono inoltre state studiate quelle proteine extracellulari che intervengono nella fibrillogenesi, come la decorina [Danielson et al., 1997], la trombospondina 2 [Kiriakides et al., 1998] e la fibromodulina. Si è notato, in esperimenti effettuati su topi, che anomalie molecolari in una di queste proteine causavano un fenotipo estremamente simile a quello EDS, con le caratteristiche alterazioni nella forma e nell'assemblamento delle fibrille di collagene.

È stata identificata una sostituzione *arginina* -> *cisteina* nel collagene tipo I ($\alpha 1(I)$ -R134C) in due pazienti non imparentati con EDS di tipo classico [Nuytinck et al., 2000]. Studi recenti suggeriscono tuttavia che mutazioni nel collagene di tipo I sono rare, dal momento che nessuna mutazione vi è stata identificata in una casistica di 48 pazienti con EDS di tipo classico [Malfait et al., 2005].

Sono infine stati identificati difetti enzimatici che pregiudicano il normale metabolismo dei collagene, come ad esempio la deficienza dell'enzima procollagene N-terminale peptidasi riscontrata in casi di EDS tipo dermatosparassi [Byers, 1997].

Le sindromi di EDS, tuttavia, rimangono patologie collageniche per antonomasia, essendo principalmente imputabili a difetti strutturali in vari collagene di tipo fibrillare abbondanti nella cute e nei vasi.

IL COLLAGENE

I collagene costituiscono una famiglia di proteine strutturali della matrice extracellulare, sono secreti dalle cellule del tessuto connettivo e da molti altri tipi cellulari. Grazie alla loro abbondanza, rappresentano le più importanti proteine presenti nei mammiferi, e si presentano con una tipica distribuzione tessuto specifica.

La caratteristica peculiare di una tipica molecola di collagene è la struttura a tripla elica lunga e rigida in cui le tre catene polipeptidiche, dette *catene α*, sono avvolte l'una intorno all'altra. Da un punto di vista molecolare i collagene condividono un'organizzazione della triplice elica che prevede la ripetizione del motivo amminoacidico Gly-X-Y. Finora sono state identificate 25 catene α, ciascuna codificata da un gene distinto, che si combinano svariamente, dando così una distribuzione tessuta specifica.

I collagene si dividono in due grandi gruppi: i collagene non fibrillari ed i collagene fibrillari:

- I **collagene non fibrillari** formano varie strutture sopramolecolari, contengono domini a tripla elica di lunghezza variabile, a tratti interrotti da regioni in cui è assente la conformazione a tripla elica delle catene α. Questi collagene sono codificati da geni che non presentano un'apprezzabile conservazione a livello dell'organizzazione introne/esone.
- I **collagene fibrillari** (I-III, V e XI, cfr. tabella 2) contengono ininterrotti domini a tripla elica di circa 1000 bp ciascuno e sono caratterizzati da un'organizzazione introne/esone altamente conservata. La preponderanza in questi domini di esoni delle lunghezza di 54 bp o multipli di essa, fa pensare che questi collagene abbiano tratto origine da duplicazioni di un gene ancestrale contenente 54 nucleotidi e codificante esattamente sei tratti ripetuti a struttura Gly-X-Y. I residui di glicina rappresentano 1/3 dei residui delle macromolecole di collagene. Le ragioni di questa particolare composizione sono di ordine strutturale: la glicina è l'amminoacido che, non possedendo una catena laterale, ha l'ingombro sterico minore e può adattarsi perfettamente ad occupare la posizione assiale che si ripete nella tripla elica, ogni tre residui. La sostituzione della glicina con un qualsiasi altro amminoacido nel dominio a tripla elica interferisce con l'avvolgimento corretto della catena α ed altera la struttura regolare del collagene. La glicina, che è presente nella parte centrale della catena ogni tre amminoacidi, compatta la superelica finale del collagene, mediante legami idrogeno tra le catene.

I collageni sono inoltre estremamente ricchi in prolina e in lisina, che spesso occupano la posizione X e Y all'interno del tripletta Gly-X-Y. Questi residui, vengono idrossilati nel lume del reticolo endoplasmatico, dando luogo all'idrossiprolina e all'idrossilisina che formano legami idrogeno tra le catene α , favorendo così la stabilizzazione della tripla elica. La prolina, grazie alla sua struttura ad anello, stabilizza la conformazione ad elica in ciascuna catena α .

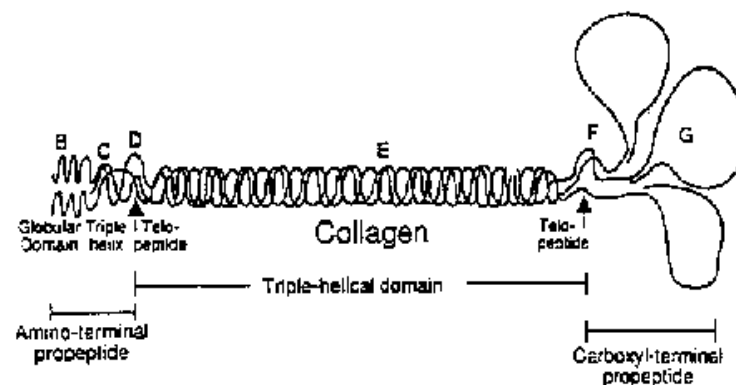


Figura 2: Molecola di collagene fibrillare costituita da un dominio centrale a tripla elica e da due propeptidi ammino e carbossi-terminali.

Il Collagene V

Il collagene di tipo V è un collagene fibrillare variamente distribuito nei tessuti e rappresenta una componente minore della matrice extracellulare. È stato all'inizio identificato nella placenta umana e nella pelle, ma studi successivi ne hanno dimostrato la presenza anche a livello dei vasi sanguigni, ossa, tendini, nervi e muscoli.

Il collagene di tipo V possiede tre varietà di catene α : le catene $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, codificate rispettivamente dai geni COL5A1, COL5A2 e COL5A3. In genere si presenta nella forma di *monomeri eterotrimerici* di composizione $\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)$, ma si può anche trovare nelle forme di *omotrimeri* $\alpha 1(V)_3$ e di *eterotrimeri* $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$.

Il collagene V è coespresso con il collagene I in molti tessuti e gioca un ruolo importante nella fibrillogenesi del collagene I. Il ruolo del collagene di tipo V nella matrice è quello di combinarsi con il più abbondante collagene di tipo I

per formare fibrille eterotipiche, e quello di avere un effetto diretto nella regolazione del diametro di suddette fibrille.

Esperimenti *in vitro* dimostrano che, un aumento in proporzione di collagene V rispetto al collagene I, si traduce in una riduzione del diametro fibrillare. Nella regolazione di questo processo svolge un ruolo essenziale la *porzione N terminale* del collagene V: i trimeri del collagene V si localizzano alla periferia delle fibrille del collagene I con le regioni a tripla elica infossate, mentre le estensioni N-terminali sono proiettate verso la superficie. Questa disposizione delle porzioni N-terminali esercita un impedimento sterico ed è quindi limitante per la crescita fibrillare [Leisenmayer et al., 1993] (cfr. Figura 3).

Il collagene V condivide molte caratteristiche con il collagene fibrillare di tipo XI, sia a livello molecolare che funzionale. Il collagene XI interagisce infatti con il collagene II, nella cartilagine, in una maniera analoga a quella con cui il collagene V forma fibre eterotipiche con il collagene I.

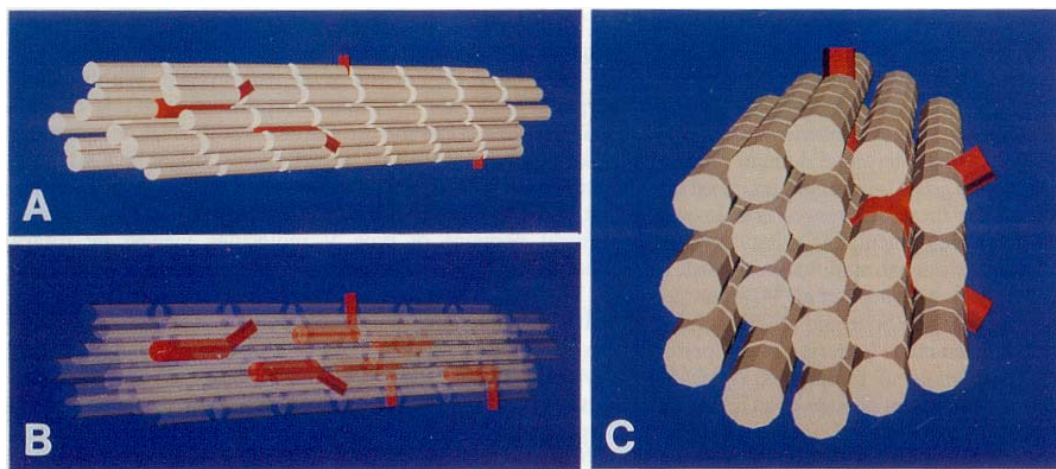


Figura 3: Tre visuali di un modello proposto per arrangiamento delle molecole di collagene di tipo V nelle fibrille eterotipiche composte da collagene I e V. A e B mostrano la fibrilla longitudinalmente. C mostra una sezione trasversale. Le molecole tipo I sono colorate in giallo, le molecole di tipo V in rosso. In B le molecole tipo I sono state rese trasparenti, per vedere le molecole di tipo V situate all'interno [Lisenmayer et al., 1993].

Il gene **COL5A1** è localizzato sul cromosoma 9q34.2-q34.3, è lungo circa 200 kb e la sua sequenza codificante, è stata interamente sequenziata [Takahara et

al., 1991]. È uno dei geni più grandi conosciuti finora, è complessivamente costituito da 66 esoni e il suo primo introne raggiunge le dimensioni di ben 600 Kb. Il numero di esoni presenti nel gene COL5A1 è considerevole, se paragonato agli altri collagene fibrillari, con i quali tuttavia condivide l'organizzazione tra esoni e introne molto conservata.

La preponderanza di esoni della lunghezza di 54 bp, o suoi multipli, nella regione a tripla elica, supporta la teoria secondo cui questi collagene si sarebbero evoluti dall'amplificazione di un gene collagenico ancestrale codificante la sequenza (Gly-X-Y)₆. La maggior parte degli esoni rispetta quindi la fase di lettura della sequenza codificante, specialmente quelli che si trovano nella regione fibrillare.

L'elevato numero di esoni riscontrato nel gene COL5A1, trova in parte origine dalle incrementate dimensioni del pro α (V) N-propeptide, il quale comprende, infatti, ben 13 esoni, per un totale di 522 residui nella proteina collagenica.

La struttura primaria della catena α 1(V) codificata dal gene COL5A1 presenta un peptide segnale di 36 amminoacidi ricco in residui di leucina, un'ampia regione N-terminale non collagenica, un principale dominio centrale a tripla elica costituito da 338 triplette Gly-X-Y, e una regione C-terminale non collagenica (cfr. fig. 4).

La regione preponderante della catena α 1(V) è rappresentata dal dominio centrale a tripla elica, che presenta molte similitudini con il collagene fibrillare del tipo XI.



Figura 4: Organizzazione della catena α 1 del collagene V:

1	1-36	peptide segnale	4	559-1570	dominio a tripla elica
2	38-443	dominio non a tripla elica	5	1571- 1605	dominio non a tripla elica
3	444-558	dominio regione collagenica interrotta	6	1606-1838	C- propeptide

Il gene **COL5A2** è stato mappato sul cromosoma 2q24.3-q31 [Vuorio et al. 1990], è lungo 67 Kb ed è formato da 52 esoni che presentano la tipica organizzazione dei collagene fibrillari. Possiede una struttura molecolare estremamente simile a quella del collagene III [Valkkila et al., 2001] e in determinati tessuti, per esempio l'umor vitreo, le catene $\alpha 2(V)$ si associano con le catene $\alpha 1(XI)$, a formare un eterotrimerico composto [Iamamura et al., 2000].

Il gene **COL5A3** è stato mappato (19p13.2) ed è altamente correlato al gene COL5A1, eccetto per delle sostanziali differenze nella sequenza dell' N-propeptide, e in caratteristiche nel dominio collagenico [Iamamura et al., 2000].

Tipi	Catene	Geni	Localizzazione	Molecole	Distribuzione
<i>Collageni fibrillari</i>					
I*	$\alpha 1(I)$	COL1A1	17q21-q22	$\alpha 1(I)_2\alpha 1(I)$	Pelle, tendine, osso, connettivi, dentina
	$\alpha 2(I)$	COL1A2	7q21-q22	$\alpha 1(I)_3$	Come sopra, tumori, e liquido amniotico
II	$\alpha 1(II)$	COL2A1	12q13-q14	$\alpha 1(II)_3$	Cartilagine, umore vitreo
III*	$\alpha 1(III)$	COL3A1	2q31-q32	$\alpha 1(III)_3$	Pelle, connettivi e utero
V*	$\alpha 1(V)$	COL5A1	2q31-q32	$\alpha 1(V)_3$	Membrane basali, matrice extracellulare
	$\alpha 2(V)$	COL5A2	9q33-q34	$\alpha 3(V)_3$	
	$\alpha 3(V)$	COL5A3	19p13.2	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ $\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)$	

XI	$\alpha 1(\text{XI})$ $\alpha 1(\text{XI})$	COL11A1 COL11A2	1p21	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$	Cartilagine
<i>Catene lunghe/interrotte</i>					
IV	$\alpha 1(\text{IV})$ $\alpha 2(\text{IV})$	COL4A1 COL4A2	13q33-q34 13q33-q34	$\alpha 1(\text{IV})_2 \alpha 2(\text{IV})$ $\alpha 1(\text{IV})_3, \alpha 2(\text{IV})_3$	Membrana basale
<i>Catene corte/interrotte</i>					
VI	$\alpha 1(\text{VI})$ $\alpha 2(\text{VI})$ $\alpha 3(\text{VI})$	COL6A1 COL6A2 COL6A3	21q223 21q223 2q37	Incerto	Ubiquitario
VIII	$\alpha 1(\text{VIII})$	COL8A1			
IX	$\alpha 1(\text{IX})$ $\alpha 2(\text{IX})$ $\alpha 3(\text{IX})$	COL9A1 COL9A2 COL9A3		$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$	Cartilagine
X	$\alpha 1(\text{X})$	COL10A1			Cartilagine
<i>Catene estese/interrotte</i>					
VII	$\alpha 1(\text{VII})$	COL7A1		$\alpha 1(\text{VII})_3$	Giunzioni epiteliali e mesenchimali

Tabella 2: Tipi di collagene, distribuzione, struttura molecolare e localizzazione del gene. Le alterazioni nei collagene asteriscati sono alla base di varie forme di EDS (cfr. Tab. 3).

ASPETTI GENETICI

Le basi molecolari delle sindromi di Ehlers-Danlos sono state a lungo studiate, ma l'eterogeneità genetica che contraddistingue queste patologie ha complicato la ricerca e l'identificazione dei geni malattia e delle mutazioni. Così, mutazioni in geni differenti causano il medesimo fenotipo, mentre diverse mutazioni sullo stesso gene possono causare fenotipi distinti. Le scoperte dei difetti a livello del DNA hanno spesso resi necessari adattamenti delle classificazioni delle sindromi di Ehlers-Danlos. Le evidenti anomalie collageniche riscontrate negli individui malati, osservate con analisi biochimiche ultrastrutturali della pelle, hanno

indirizzato la ricerca dei difetti molecolari nell'ambito dei collagene fibrillari di tipo I e di tipo V.

Uno dei primi approcci intrapresi per indagare i difetti genetici di questa sindrome, è stata l'**analisi di linkage**, metodo utilizzato nello studio delle malattie genetiche ereditarie per investigare la segregazione di caratteri mendeliani all'interno di famiglie, e per stabilire la localizzazione cromosomica dei geni malattia. Questo tipo di analisi necessita di marcatori polimorfici che siano in associazione con la malattia: i marcatori usati sono rappresentati da marcatori biallelici (Restriction Fragments Length Polymorphism) e da polimorfismi ipervariabili. Mediante studi basati su analisi di linkage, si è potuto constatare che, in famiglie con EDS classico con ereditarietà autosomica dominante, la malattia segregava con i geni **COL5A1** e **COL5A2** [Wordsworth et al., 1991, Wenstrup et al., 1996, De Paepe et al., 1997, Giunta et al., 2000, Burrows et al., 1996].

Un'altra testimonianza di un coinvolgimento del collagene V in questa malattia proveniva da esperimenti eseguiti su topi transgenici [Andrikopoulos et al., 1995]. Tecniche di *gene targeting* hanno permesso di creare topi che producono catene $\alpha 2(V)$ alterate. I topi eterozigoti per questo tipo di mutazione non presentavano particolare fenotipo, mentre gli omozigoti difficilmente sopravvivevano oltre lo svezzamento. Essi presentavano una straordinaria fragilità della pelle, lacerazioni estese, difficoltà nella cicatrizzazione; all'esame ultrastrutturale erano evidenti le anomalie nell'organizzazione delle fibrille collageniche e l'alterazione del diametro delle stesse. In sintesi, nel modello murino la situazione di eterozigosi, che è quella riscontrata nei pazienti EDS, sembra dare un fenotipo subclinico, mentre la situazione di omozigosi presenta un quadro coerente con quello umano, ma assai più grave.

In almeno metà dei pazienti con EDS di tipo classico sono state rilevate mutazioni nei geni COL5A1 e COL5A2 [Malfait et al., 2005]; nessuna mutazione è stata invece riscontrata nel gene COL5A3. I tipi più comuni di difetti molecolari sono quelli che portano all'aploinsufficienza dell'mRNA di COL5A1; circa un terzo dei pazienti con EDS di tipo classico presentano mutazioni di tipo *nonsense*, *frameshift*, o di splicing che introducono un codone di terminazione prematuro che causa la non funzionalità di un allele di COL5A1 [Schwarze et al., 2000; Wenstrup et al., 2000; Malfait et al., 2005]; queste mutazioni inducono l'instabilità

dell'mRNA attraverso l'innescò di un processo detto *nonsense mediated decay* [Frischmeyer and Dietz, 1999].

Si sono inoltre riscontrate un limitato numero di mutazioni strutturali nei geni COL5A1 e COL5A2, causanti la produzione di una proteina del collagene V non funzionale; la maggioranza sono mutazioni dei siti di splicing che provocano *exon skipping* [Nicholls et al., 1996; Wenstrup et al., 1996; De Paepe et al., 1997, Burrows et al., 1998; Michalickova et al., 1998; Malfait et al., 2005], o rare mutazioni puntiformi in cui una glicina è sostituita da un amminoacido più pesante nella regione a tripla elica della molecola di collagene [Richards et al., 1998; Giunta and Steinmann, 2000, Malfait et al., 2004]. La sostituzione di una glicina nel dominio collagenico dell'aminopropeptide $\alpha 1(V)$ (p.G530S) sembra causare la malattia se presente in omozigosi [Giunta et al., 2002], mentre la aggrava se presente in eterozigosi in soggetti già affetti, in cui la sostituzione di una glicina (p.G1489D) nel dominio principale a tripla elica appare come causa del fenotipo. [Giunta and Steinmann, 2000]. Una delle mutazioni puntiformi identificata in COL5A1 è mutazione, una quasi unica, che cambia un residuo altamente conservato di cisteina in una serina nel propeptide della catena C-terminale del collagene $\alpha 1(V)$ [De Paepe et al., 1997]; questo residuo è essenziale per i legami disolfuro intracatena prima dell'assemblaggio delle catene pro $\alpha 1$ e del ripirgamento della tripla elica delle molecole di collagene. Un'altra mutazione che provoca *exon skipping* è stata individuata nel propeptide C-terminale del pro $\alpha 1(V)$ [Wenstrup et al., 1996]. Più probabilmente le ultime due mutazioni impediscono l'incorporazione delle catene mutanti nella molecola, causando la riduzione degli eterotrimeri del collagene V.

Complessivamente questi risultati suggeriscono che mutazioni che diminuiscono la quantità del collagene V normale giocano un ruolo importante nello sviluppo dell'EDS classico.

Eterogeneità genetica dell'EDS

Si stima che soltanto il 50% dei casi analizzati sia imputabile a mutazioni nei geni COL5A1 e COL5A2 . Viene quindi avvalorata la teoria che altri loci siano

coinvolti in questa patologia, anche alla luce dei risultati di quelle analisi di linkage che escludono l'associazione della malattia con i geni COL5A1 e COL5A2 in alcune famiglie [Greenspan et al., 1995, Wenstrup et al., 1996]; nelle varie forme di EDS altri geni, collagenici e non, sono stati trovati mutati. Il quadro delle conoscenze attuali è riassunto in Tabella 3. Molti altri loci devono, tuttavia, ancora essere identificati, anche se numerosi geni sono già stati individuati come possibili geni candidati.

Un buon candidato è il gene **COL5A3** (2q31-q32.3), gene codificante per le catene $\alpha 3(V)$ che formano l'eterotrimerico in associazione con le catene $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$. Da esperimenti di ibridizzazione *in situ* di embrioni murini, è emerso che la distribuzione del COL5A3 (legamenti, giunture, fogli epimisiali) suggerisce che questo potrebbe essere un buon locus candidato per casi EDS classico in cui sono stati esclusi i geni COL5A1 e COL5A2 e per alcuni casi di EDS ipermobile [Iamamura et al., 2000], anche se attualmente non sono state riportate mutazioni in COL5A3 in casi di EDS. Altri loci candidati sono rappresentati da geni codificanti per proteine coinvolte nella fibrillogenosi, tutte individuate con esperimenti di gene targeting eseguiti su topi. Il gene *Thbs2* della **trombospondina 2**, una proteina extracellulare dalle funzioni complesse e ancora scarsamente conosciute, è stato interrotto mediante ricombinazione omologa in cellule staminali e adoperato per creare topi *Thbs2* $-/-$. Questi topi presentavano numerose anomalie specialmente a livello delle fibre di collagene della pelle e dei tendini, che si presentavano ingrandite e dai contorni irregolari [Kyriakides et al., 1998]. Anche esperimenti eseguiti sul gene della **decorina**, un proteoglicano ricco in leucina, mostrarono che i topi in cui questo gene era stato interrotto avevano un fenotipo tipo EDS con la caratteristica fragilità cutanea [Danielson et al., 1997]. Recentemente è stato descritto un paziente EDS in cui una deficienza del core della Decorina determinava l'insorgere della malattia con ulcera cronica della pelle [Utani et al., 2001]. Il livello di mRNA subiva una drastica riduzione, e la ridotta espressione della decorina era dovuta ad anomalie nella regione regolatoria.

Nome	Vecchia classificazione	Geni malattia	Ereditarietà
<i>Tipo classico</i>	EDS I/II	COL5A1, COL5A2, COL1A1, TNX (6p21.3, sindrome da geni contigui)	A D A R
<i>Tipo vascolare</i> <i>Tipo ipermobile</i>	EDS IV EDS III	COL3A1	A D
<i>Tipo oculoscoliotico</i>	EDS VI	PLOD (1p36.3-p36.2, Procollagen Lysin 2 Oxoglutarate 5 Dioxygenase)	A R
<i>Tipo artrocalasia</i>	EDS VIIA/B	COL1A1, COL1A2	A D
<i>Tipo dermatosparass</i>	EDS VIIC	Gene del procollagene N-peptidas (ADAMTS2, A Disintegrin-like and metallo proteinase with Thrombospondine type1 motif, 2)	A R
<i>Altri tipi</i>	EDS V	?	X L
	EDS VIII	?	A D
	EDS IX	?	X L
	EDS X	?	A R
	EDS XI	?	A D

Tabella 3: Correlazione delle sindromi di Ehlers-Danlos con i geni malattia

APLOINSUFFICIENZA NEL GENE COL5A1

L'improduttività della ricerca di mutazioni nei geni del collagene V è stata recentemente giustificata con il fatto che un' aploinsufficienza del gene COL5A1 può produrre un fenotipo Ehlers-Danlos classico. Tradizionalmente la ricerca di mutazioni viene eseguita su cDNA e quindi risulta infruttuosa in caso di assenza totale o marcatissima diminuzione del trascritto anomalo. I lavori intrapresi per ricercare individui *allele nullo* si sono serviti di marcatori polimorfici di lunghezza di restrizione (RFLP) localizzati nella sequenza codificante, mediante i quali venivano genotipizzati i cDNA degli individui risultati informativi a livello genomico. Studi compiuti su un campione di soggetti con diagnosi EDS hanno

rivelato come l'aploinsufficienza sia una causa molto comune nel determinare l'insorgere di questa malattia, tanto che circa il 30% degli individui informativi per polimorfismi intragenici, esibiva solamente uno dei due alleli rappresentati nel cDNA [Wenstrup et al., 2000]. Dall'analisi di mutazioni, intrapresa sugli mRNA stabilizzati di otto soggetti risultati allele silente, emergevano due mutazioni dovute a delezioni o inserzioni di due nucleotidi e una sostituzione causante l'inserzione di 178 bp dall'introne 28, tutte causanti slittamento della fase di lettura con comparsa di codoni di terminazione prematura (PTC); inoltre si rilevava una sostituzione causante l'esclusione *in frame* di 168 bp codificate dall'esone 2. Anche in un secondo lavoro circa un terzo degli individui analizzati presentava una mutazione del tipo allele nullo [Schwarze et al., 2000]; si evidenziavano infatti 6 casi su 16 con aploinsufficienza nel gene COL5A1. La caratterizzazione delle mutazioni metteva in luce come causa primaria della marcata diminuzione di uno dei due trascritti, una mutazione *frameshift* con comparsa di PTC, che si manifestava in ben 5 soggetti. Studiando quattro soggetti imparentati affetti da EDS, Bouma et al. [2001] identificavano una mutazione nel sito accettore di splicing dell'esone 14 che determinava l'inclusione nel messaggero maturo di 100 bp dell'introne 13. Questa inserzione portava ad uno slittamento della fase di lettura, e alla conseguente comparsa di un codone di stop dopo 760 nucleotidi, che determinava il decadimento di quell'm-RNA. Malfait et al. [2005] identifica in uno studio su 43 pazienti informativi 25 soggetti (52%) che presentano mutazioni in COL5A1 o COL5A2; di questi in 17 (35.4%) riscontra una mutazione nonsense o *frameshift* inducente PTC, mentre in tre non identifica la causa della condizione di allele nullo. Toriello et al. [1996] caratterizzavano, in un individuo EDS classico, una traslocazione cromosomica bilanciata tra il cromosoma 9 e un cromosoma X, che interrompeva il gene COL5A1. L'osservazione che non sono prodotte proteine aberranti e che il è ridotta la quantità di collagene V nei fibroblasti dei pazienti, suggerisce che tale fenotipo EDS sia dovuto ad un aploinsufficienza. In realtà in ben un terzo delle malattie genetiche ereditarie, e persino in molte forme di cancro, l'aploinsufficienza risulta essere la causa determinante, prodotta da mutazioni *frameshift* o da mutazioni nonsense.

In conclusione da questi lavori emerge che circa un terzo degli individui informativi risulta allele nullo, e che nella maggioranza dei casi una mutazione di tipo *frameshift* inducente comparsa di PTC o una mutazione nonsense sono causa di aploinsufficienza. Solo in un caso [Wenstrup et al., 2000], viene riportato un caso di *exon skipping in frame* correlato alla condizione di allele nullo.

La conseguenza principale di mutazioni *frameshift* o nonsense non è la sintesi di proteine troncate, ma il decadimento dell'RNA messaggero [Peltz et al., 1993]. La maggior parte dei trascritti non senso viene riconosciuta ed è efficientemente degradata dalla cellula tramite una via nota come ***Nonsense Mediated mRNA Decay*** (NMD). Questo meccanismo di sorveglianza è ubiquitario tra gli eucarioti e si pensa protegga l'organismo dagli effetti deleteri che deriverebbero dalla traduzione di proteine tronche o con effetto *dominant negative*. I casi di β -talassemia dominante sono causati appunto da una mutazione che induce la comparsa di un PTC nel terzo e ultimo esone della β -globina, che sfugge all'NMD causando così la traduzione di una proteina troncata che formando eterodimeri con l' α -globina produce una proteina *dominant negative* [Hall and Thein, 1994; Thein et al., 1990]; analogamente nella sindrome di Marfan si riscontra un fenotipo meno grave in casi in cui viene rilevata una riduzione dell'mRNA mutante causata da NMD [Dietz et al., 1993]. Appare evidente che la spinta evolutiva per lo sviluppo di questo meccanismo sia stata l'utilità di eliminare i trascritti anormali formati in conseguenza di errori nella trascrizione, di scorretto processamento o improprio assemblaggio dei complessi maturi mRNA-ribonucleoproteine (mRNP), più che la possibilità di proteggere la cellula da trascritti aberranti dovuti a mutazioni del DNA genomico. L'apparato dell'NMD è in grado di riconoscere e dare innesco alla degradazione, oltre che di trascritti contenenti PTC, anche di trascritti aberranti con splicing incompleto [Mitrovich et al., 2000], con regioni 3' non tradotte (UTR) anormalmente estese [Muhlrad et al., 1999], o con *open reading frame* (ORF) nel 5'UTR [Oliveira et al., 1995; Welch et al., 1999; Ruiz-Echevarria et al., 2000]. Il meccanismo dell'NMD risulta traduzione dipendente; è infatti tramite un ciclo preliminare di traduzione che l'mRNA viene analizzato e l'eventuale presenza di un codone di stop anormale rilevata [Ishigaki et al., 2001]; il decadimento è inoltre inibito da antibiotici quali anisomicina, cicloesimide, emetina, pactamicina o puromicina,

che si legano e inattivano i ribosomi attivi nella traduzione [Qian et al., 1993; Menon et al., 1994; Carter et al., 1995]. I substrati per la degradazione sono riconosciuti dall'aggregazione di tre particolari proteine al complesso dell'mRNP: la prima di queste, Upf3/3X, si associa al complesso nel nucleo, dove, nei mammiferi, risulta effettivamente localizzata [Kim et al., 2001; Serin et al., 2001]; Upf2 si associa nel passaggio dal nucleo al citoplasma [Maquat, 2004; Lejeune et al., 2005; Lykke-Andersen, 2001], mentre Upf1 si associa probabilmente in seguito al riconoscimento del PTC a completare l'innescò per la degradazione del trascritto [Maquat et al., 2004; Lejeune et al., 2005; Kim et al., 2005]. Lavori volti a definire sequenze *cis*-agenti all'interno del trascritto e fattori *trans*-agenti nell'innescò dell'NMD hanno dato differenti risultati nel lievito e nei mammiferi. Comunque in tutti gli organismi è necessaria la combinazione di due elementi *cis* per innescare la degradazione [Maquat, 2004]: il primo dei fattori *cis* è la presenza di un'anomalia nell'mRNA, come un PTC, mentre il secondo è l'associazione con il trascritto di un complesso proteico di giunzione esone-esone (EJC) che si associa al trascritto durante lo splicing: se un codone di terminazione si trova a più di 50 – 55 paia di basi a monte di tale complesso viene riconosciuto come PTC ed innescò il processo di NMD [Nagy and Maquat, 1998]. Da studi effettuati su *S. cerevisiae* [Muhlrath et al., 1994; Mitchell et al., 2003] il processo di degradazione del trascritto aberrante avviene tramite vari meccanismi: il primo è il decapping e la degradazione da parte della 5' → 3' Xrn1 esonucleasi; il secondo è una degradazione 3' → 5' attraverso un meccanismo esosoma dipendente; un terzo meccanismo è stato identificato in *D. melanogaster*, e consiste nel taglio endonucleasico del trascritto in prossimità del PTC seguito dalla degradazione del frammento 5' da parte dell'esosoma, e del frammento 3' da parte della Xrn1 esonucleasi [Gatfield et al., 2004].

È inoltre accertato che un meccanismo analogo all'NMD si innescò per degradare trascritti che mancano di un codone di stop (cfr. figura 5), con un meccanismo dipendente dall'esosoma citoplasmatico e dal complesso associato Ski, composto da Ski2, Ski3 e Ski8, e dalla proteina adattatrice Ski7 [Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002].

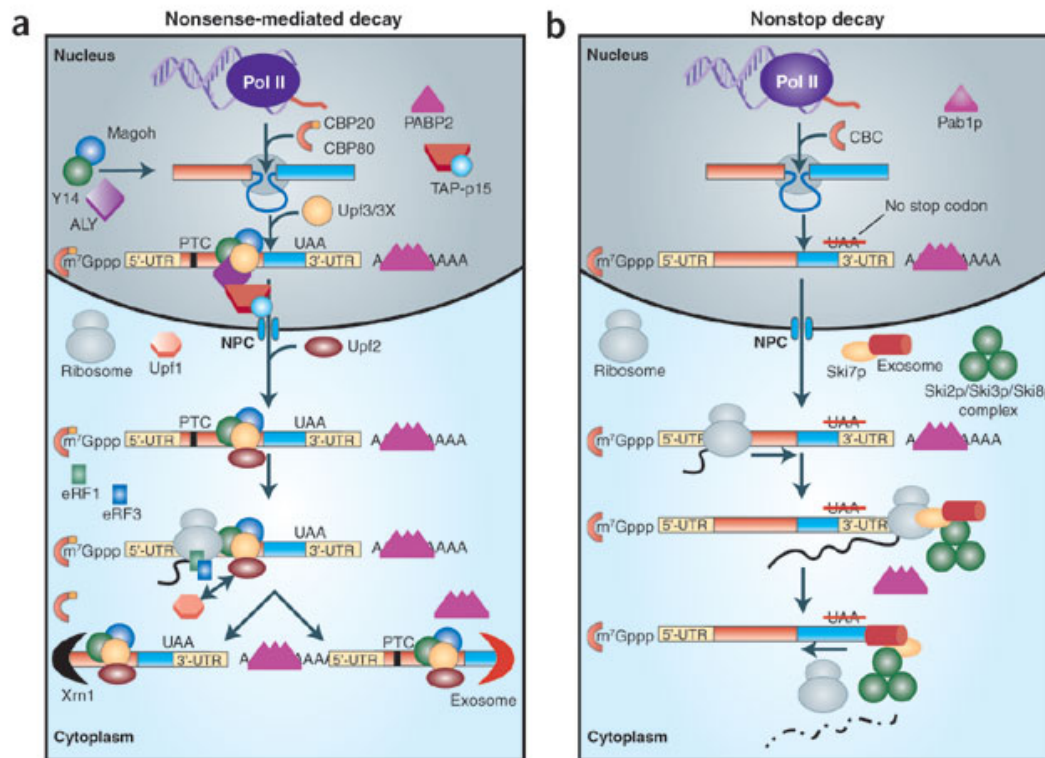


Figura 5: Modello del funzionamento dell’NMD negli eucarioti superiori e del nonstop decay in lievito.

- (a) NMD: dopo lo splicing e l’associazione dell’EJC, la proteina Upf3/3X si unisce al complesso; dopo uscita dal nucleo alcune proteine dell’EJC si dissociano e Upf2 si lega al complesso tramite interazione con Upf3/3X. Durante un ciclo pioniero di traduzione, l’NMD è innescato dal riconoscimento di un PTC a monte di una giunzione esone – esone e dalle proteine Upf3/3X, Upf2 e Upf1, associate all’EJC. La proteina citoplasmica Upf1 si unisce al complesso probabilmente durante la terminazione della traduzione. L’mRNA contenente il PTC è degradato tramite 5’ decapping e degradazione 5’→3’ esonucleasica Xrn-1 dipendente o attraverso deasilazione e degradazione 3’→5’.
- (b) Nonstop decay: dopo lo splicing e l’ingresso nel citoplasma, inizia la traduzione; non trovando un codone di stop, il ribosoma procede fino alla coda di poliA, provoca il distacco di Pab1 e si blocca al 3’ terminale. Il sito A del ribosoma, ora libero, viene riconosciuto da Ski7p, che a sua volta recluta l’esosoma e il complesso Ski2p-Ski3p-Ski8p. L’mRNA viene a questo punto degradato dal 3’ terminale e la proteina tradotta è distrutta.

(Tratta da Fasken and Corbett, 2005)

SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro è stato intrapreso, su individui affetti da sindrome di Ehlers-Dahnlos di tipo classico, al fine di identificare soggetti che presentassero una totale o marcata assenza di uno dei due trascritti del gene collagenico COL5A1, e di caratterizzare quindi in questo gene la mutazione causale di questa condizione, che rappresenta una causa comune nell'insorgere del fenotipo patologico.

MATERIALI E METODI

Nello studio effettuato sono inclusi un totale di dieci pazienti con diagnosi di sindrome di Ehlers – Dahnlos di tipo classico, classificati come EDS 604, EDS 625, EDS 626, EDS 769, EDS 792, EDS 793, EDS 799, EDS 819, EDS 866 e EDS TE. Per tre di questi (EDS 604, EDS 625, EDS 626) la condizione di allele nullo era stata già verificata in un precedente lavoro di tesi.

Analisi DNA genomico

Tutti i soggetti sono stati genotipizzati per quattro polimorfismi di singolo nucleotide intragenici. L'analisi è stata poi estesa al cDNA dei soggetti informativi. Per ciascuno degli individui studiati si sono analizzati quattro siti polimorfici per la lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP), utilizzando gli enzimi Pst I, Bsl I, BstU I e Dpn II e i seguenti primer (cfr. Figura 6):

- polimorfismo nell'esone 5 per Pst I (Schwarze et al., 2000)

5A1 IN 4S TCTGGACTTTCCCCTGCTTCAAGGC

5A1 IN 5A ATTTATTTAAAATAAGGGTCCCATGGC

- polimorfismo nell'esone 58 per Bsl I (Schwarze et al., 2000)

4482 C/G CAGGCCTGATCGGGCTCATCCGT

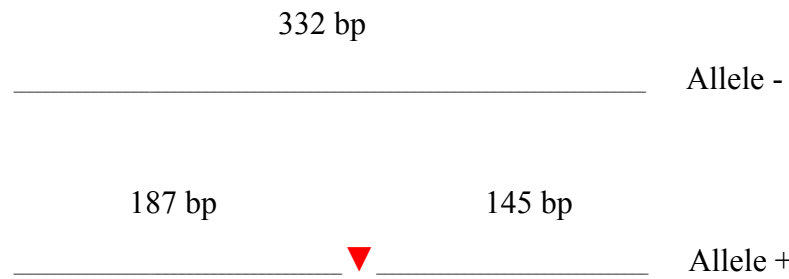
5A1 IN 58A CTTCGGGCTCTGATGGCCTCCTGT

- polimorfismi nell'esone 66 per BstU I e Dpn II (Greenspan e Pasquinelli, 1994)

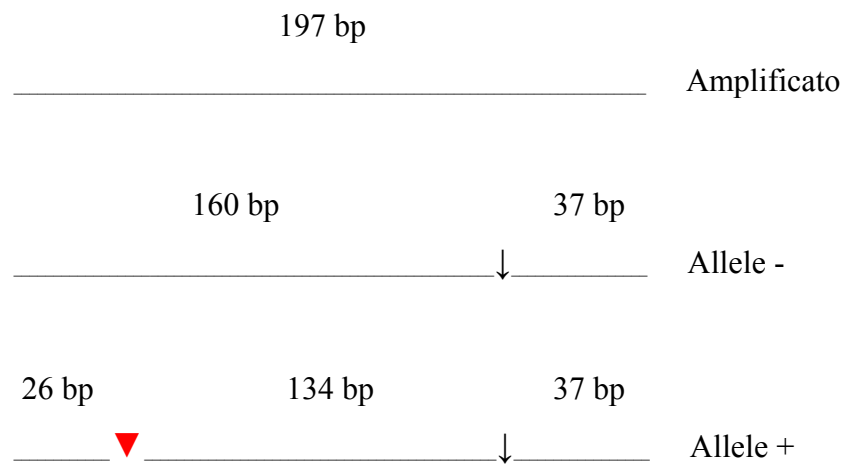
COL5A1 F GAAGACGGTTCTGGAGATCG

COL5A1 R GAAGGCACCTGCAGAATGAC

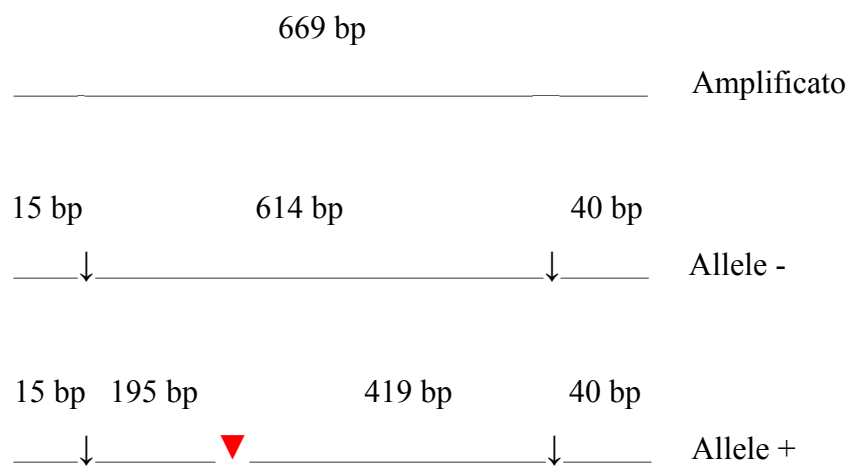
Pst I



Bsl I



Dpn II



BstU I

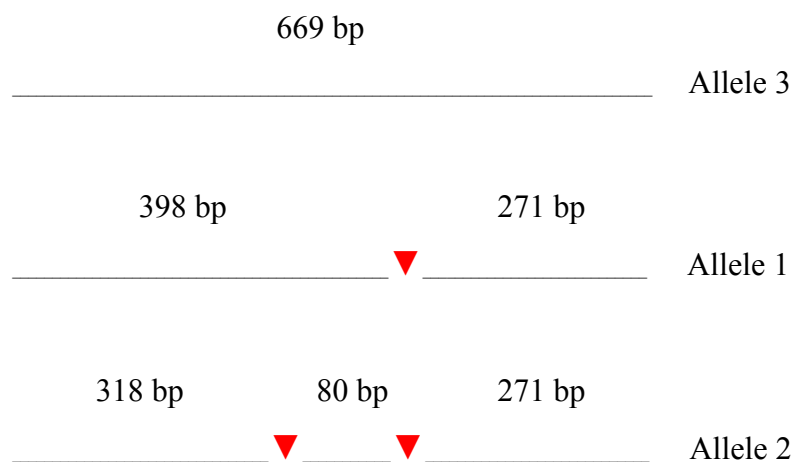


Figura 6: Posizionamento schematico dei siti di taglio nel DNA genomico per *Pst I*, *Bsl I*, *Dpn II* e *BstUI* e relativa dimensione degli amplificati prima e dopo la digestione. I siti polimorfici sono indicati dalle frecce rosse.

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate utilizzando 200 ng di DNA in presenza di una concentrazione di 1.5 mM di $MgCl_2$, 0.2 mM di dNTP mix, 10 pmoli dei primer e 1 unità di Taq Eurobio per un volume finale di 50 μ l, con i seguenti cicli:

Pst I	BstU/Dpn II	Bsl I	
94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	
94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	per 30 cicli
55° per 20''	60° per 20''	58° per 20''	
72° per 20''	72° per 20''	72° per 20''	
72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	

Le PCR sono state successivamente controllate su gel d'agarosio al 2% con una concentrazione di Bromuro d'Etidio di 0.2 μ g/ml.

I prodotti d'amplificazione sono stati quindi digeriti con 10 unità dei sopra citati enzimi (New England Biolabs) nelle seguenti condizioni:

Pst I	37° overnight
Bsl I	55° overnight
BstU I	60° overnight
Dpn II	37° overnight

Le digestioni sono state visualizzate su gel d'acrilammide/bisacrilammide 29:1 all'8% per BstU I e Dpn II e al 10% per Pst I e Bsl I, colorato dopo la corsa elettroforetica con Bromuro d'Etidio 0.8 µg/ml.

Estrazione dell'RNA

L'RNA degli individui risultati eterozigoti per almeno uno dei quattro RFLP è stato estratto a partire da lisati di fibroblasti (2T75 confluenti) sospesi in 4 ml totali di Trizol (Invitrogen). A questi lisati si sono aggiunti 200 µl cloroformio per ogni millilitro di Trizol e si è centrifugato a 12000 rpm a temperatura di 4° per 15', ottenendo così la separazioni di tre fasi: una superiore acquosa contenente l'RNA, una inferiore organica contenente proteine, polisaccaridi, acidi grassi e altri detriti cellulari, e una intermedia semisolido contenente il DNA. Dalla fase acquosa si è precipitato l'RNA aggiungendo 0.5 ml di Isopropanolo per ogni millilitro di Trizol, e centrifugando nuovamente a 12000 rpm a temperatura di 4° per 10'. Il pellet così ottenuto è stato lavato con 1 ml di Etanolo al 75% e quindi centrifugato nuovamente a 10000 rpm a 4° per 5'. Il precipitato così ottenuto è stato risospeso in 60 µl di acqua milliQ e l'RNA è stato quantificato allo spettrofotometro.

RT-PCR e analisi del cDNA

Una quantità di RNA totale isolato pari a 2.5 µg è stata retrotrascritta utilizzando 250 unità di M-MLV Retrotrascrittasi (Invitrogen), in presenza di 40 unità di RNase Out (Invitrogen), di una concentrazione di 0.5 mM di dNTP mix, 10 mM di DTT, di 0.1 µg/µl di BSA e di 50 pmoli di primer reverse in un volume finale di 25 µl. La reazione avviene a 37° per 1 ora, in seguito l'enzima viene

inattivato portando la temperatura a 95° per 5'. Nel caso dei polimorfismi nell'esone 66 l'aliquota di RNA da retrotrascrivere è stata preventivamente incubata con 1.5 unità di DNasi I (Invitrogen), onde evitare l'amplificazione di eventuali contaminazioni di DNA genomico, dal momento che i primer usati per la RT-PCR non discriminano il template genomico e quello sul cDNA.

I campioni di cDNA così ottenuti sono stati a questo punto amplificati utilizzando i seguenti primer:

- polimorfismo Pst I (primer disegnati in laboratorio usando il programma *Primer Designer ver. 2.0*):

5A1 475 F GTCTCCATCTACAACGAGCA

5A1 1129 R TGCCGACGTCCTCTTCCTTC

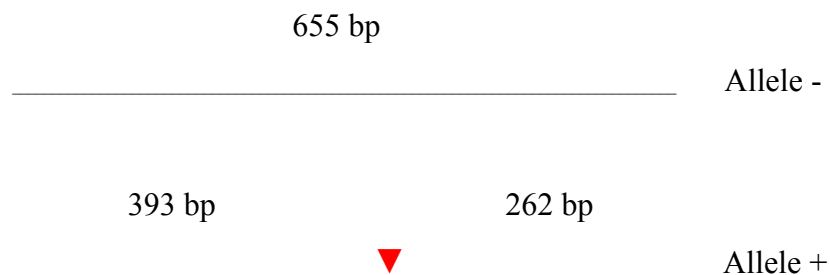
- polimorfismo Bsl I (Schwarze et al. 2000):

4482 C/G F CAGGCCTGATCGGGCTCATCCGT

5A1 EX 62A CGTAGTCCACGTAGTTCTCGCCATT

- polimorfismi BstU I e Dpn II: si sono utilizzati i primer genomici COL5A1 F e COL5A1 R.

Pst I



Bsl I

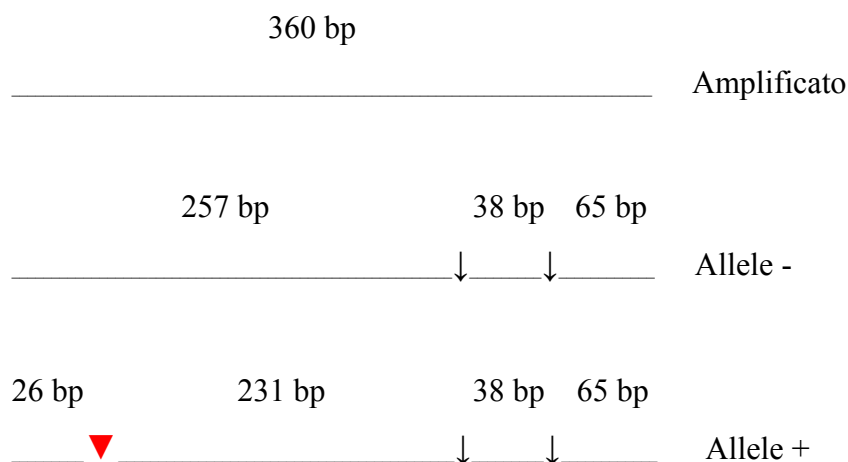


Figura 7: Posizionamento schematico dei siti di taglio nel cDNA per Pst I, Bsl I (le posizioni relative a Dpn II e BstUI sono le stesse sul genomico) e relativa dimensione degli amplificati prima e dopo la digestione. I siti polimorfici sono indicati dalle frecce rosse.

Le reazioni di amplificazione sono state allestite a partire da 5 µl di cDNA in presenza di una concentrazione di 1.5 mM di MgCl₂, 0.2 mM di dNTP mix, 10 pmoli di ciascun primer e 1 unità di Taq Eurobio per un volume finale di 50 µl; le temperature di annealing sono rispettivamente di 62°, 61° e 62° per Pst I, BstU/Dpn II e Bsl I. Le PCR sono state successivamente verificate su gel d'agarosio al 2% con una concentrazione di Bromuro d'Etidio di 0.2 µg/ml.

I prodotti di PCR da sottoporre a digestione sono stati quindi purificati su unità Millipore Microcon PCR 50 ed infine digeriti alle stesse condizioni di cui sopra per gli amplificati genomici, e in seguito visualizzati su gel d'acrilammide/bisacrilammide 29:1 all'8% per BstU I e Dpn II e al 10% per Pst I e Bsl I, colorato con Bromuro d'Etidio 0.8 µg/ml.

Stabilizzazione dell'RNA messaggero

In alcuni individui l'analisi degli RFLP a livello di cDNA ha evidenziato la scomparsa o la significativa riduzione dell'espressione di uno dei due alleli. In

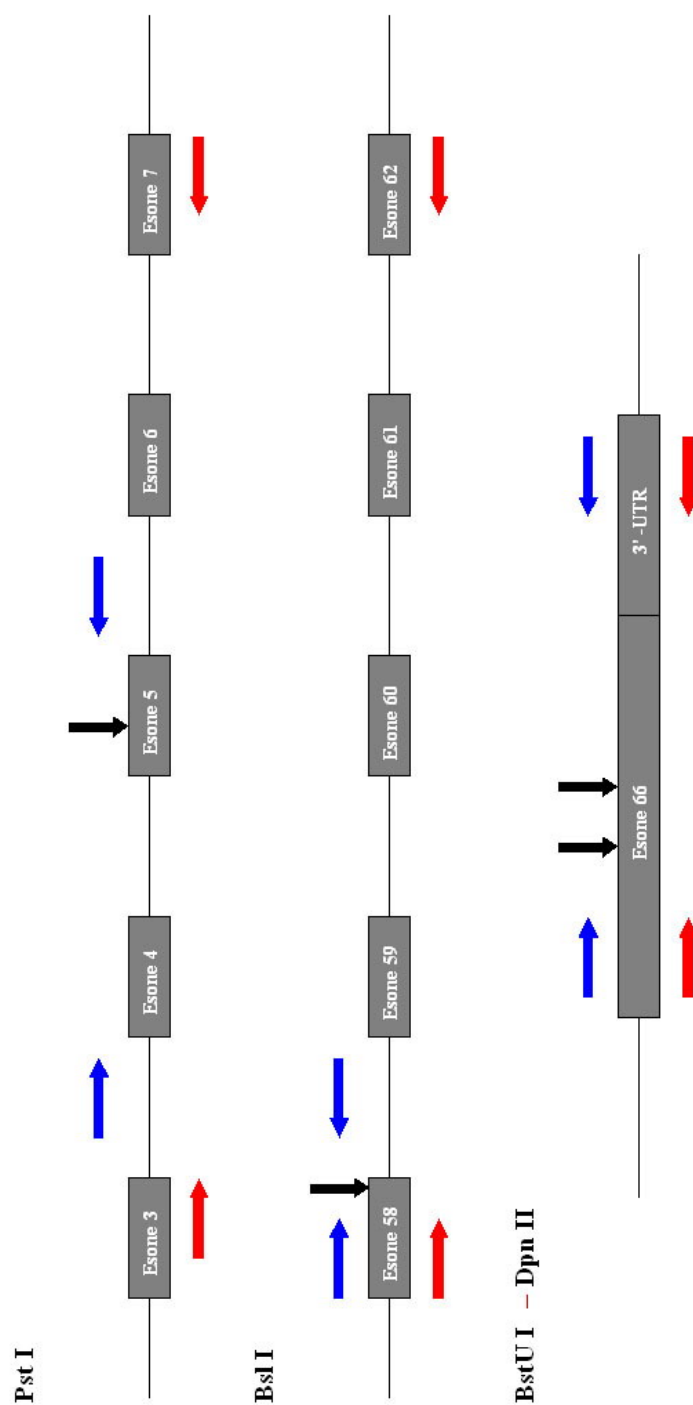


Figura 8: Rappresentazione schematica della distribuzione dei primer per amplificazione del DNA genomico (frecche blu) e dei primer per RT-PCR (frecche rosse), con i relativi siti di taglio (frecche verticali nere) per i quattro polimorfismi analizzati sul gene COL5A1.

questi individui si è quindi proceduto a stabilizzare l'RNA messaggero tramite incubazione delle colture di fibroblasti con 100 µg/ml di cicloesimide per sei ore. Con i metodi sopra descritti si è quindi estratto e retrotrascritto l'RNA, e quindi analizzato il cDNA. L'analisi dei profili di restrizione ha messo in evidenza l'effettivo ripristino dell'espressione dell'allele silente.

Protein Truncation Test

Una volta verificato il ripristino dell'espressione dell'allele silente si è quindi proceduto alla ricerca della mutazione nel gene COL5A1 tramite *protein truncation test* [Roest et al., 1993]. Tramite un sistema di trascrizione/traduzione *in vitro* (Promega TnT Quick Coupled Transcription/Translation System) che combina in un unico mix un lisato di reticolociti di coniglio, RNA polimerasi, nucleotidi, tampone di reazione e inibitore di ribonucleasi, si sono potute efficacemente trascrivere e tradurre le RT-PCR degli individui risultati allele nullo per poi verificare la presenza di mutazioni non senso tramite SDS PAGE.

La retrotrascrizione e l'amplificazione dell'intero cDNA sono state effettuate utilizzando tre coppie di primer disposti opportunamente lungo le sequenze esoniche del gene, a dare tre frammenti parzialmente sovrapposti. Il primer forward è stato disegnato appositamente in modo da contenere alla sua estremità 5':

- una sequenza promotrice della RNA-polimerasi T7 (indicata sotto come {T7}, [van der Luijt et al., 1994]);
- uno spaziatore di 5 – 7 paia di basi;
- una sequenza iniziatrice di traduzione (sequenza di *Kozak M.*, 1986, *Cell* 44, 283 – 292), contenente un codone d'inizio ATG.

La sequenza è stata disegnata opportunamente affinché nell'amplificato venga mantenuta la fase dal codone ATG di inizio; i primer utilizzati sono stati tratti dai lavori di Schwarze et al. [2000] (C5A1 EX1S e C5A1 EX17A), Nicholls

et al. [1996] (C5A1 EX16S, C5A1 2168A e C5A1 1956S) e Greenspan et al. [1994] (C5A1 UTRA):

Framm. A: C5A1 EX1S {T7}-GTCCATACCCGCTGGAAAGCGA
(1902 bp) C5A1 EX17A TTGTCCAGGCATTCCTCTGGCTCC

Framm. B: C5A1 EX16S {T7}-CAAGCCATTCTCCAGCAGGCCA
(2265 bp) C5A1 2168A CACTGCACCAGGGTTTCCTATTCC

Framm. C: C5A1 1956S {T7}-CAGAAAGGTGATGAAGGTCCCAGAG
(2472 bp) C5A1 R GAAGGCACCTGCAGAATGAC

La retrotrascrizione è stata effettuata a partire da 2.5 µg di RNA, utilizzando 200 unità di Superscript II (Invitrogen) in presenza di 2 pmoli di primer reverse, e di una concentrazione di 0.5 mM di dNTP mix, 10 mM di DTT e 40 unità di RNase Out (Invitrogen) per un volume finale di 20 µl, a 42° per 50' e in seguito a 70° per 15' per inattivare l'enzima. Successivamente si sono trattati i campioni con 2 unità di RNase H (Invitrogen) a 37° per 20' per eliminare l'RNA ibridizzato al cDNA.

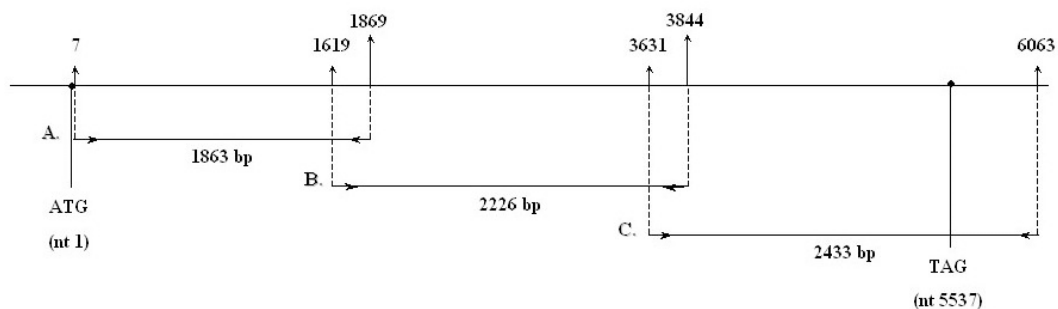


Figura 9: Posizionamento sulla coding sequence di COL5A1 dei frammenti utilizzati per il PTT e loro relativa dimensione (la discrepanza con le dimensioni delle amplificazioni è dovuto all'inserimento dei primer forward di 39 nucleotidi necessari per la traduzione in vitro).

1 o 2 µl di cDNA così ottenuto sono stati quindi amplificati usando 1 µl per campione di Elongase Enzyme Mix (Invitrogen) in presenza di 10 pmoli di

primer forward e reverse, e di una concentrazione di 0.2 mM di dNTP mix e 1.5 mM di MgCl₂ in un volume finale di 50 µl, con i seguenti cicli:

Per gli amplificati C5A1 EX 1S – C5A1 EX 17A e C5A1 EX 16S – C5A1 2168 A:

94° per 2'	
94° per 30''	per 40 cicli
68° per 2'30''	
72° per 5'	

Per gli amplificati C5A1 1956 S – C5A1 UTR A:

94° per 2'	
94° per 30''	per 10 cicli
66° per 20''	
68° per 2'30''	
94° per 30''	per 30 cicli
62° per 20''	
68° per 2'30''	
72° per 5'	

I prodotti di amplificazione sono stati quindi purificati su unità Millipore Microcon PCR 50 e quantificati su gel di agarosio per confronto con marcatore MWM III (Boehringer). Il processo di trascrizione/traduzione è stato quindi effettuato a partire da 100 – 800 ng di RT-PCR per ogni 500 paia di basi di lunghezza del frammento amplificato, come consigliato dalle istruzioni del kit Promega, usando per ciascun campione 40 µl di TnT-T7 Quick Master Mix in presenza di 1 µl di lisil-tRNA biotinilato trascend tRNA (Promega) che permetterà successivamente la visualizzazione dei prodotti della traduzione. Questi ultimi sono stati poi fatti correre tramite SDS PAGE in parallelo su tre gel

a diverse concentrazioni di acrilammide/bisacrilammide 29:1 (resolving gel al 6%, 10% e 18%, con stacking gel al 4%, Sambrook et al., 2001); i campioni sono stati denaturati a 99° per 4' e caricati con tampone di caricamento Laemli assieme ad un marcatore di pesi molecolari biotinilato (SDS-6B, Sigma) e a un MWM di proteine (See Blue Plus 2, Invitrogen) .

Successivamente è stato effettuato un western blotting dei gel; dopo aver equilibrato in metanolo le membrane PVDF (Roche) e in transfer buffer (Sambrook et al., 2001) sia le membrane che i gel, è stato effettuato il trasferimento in campo elettrico a 2.5 mA/cm². Le membrane sono quindi state incubate con Streptavidina – POD per rendere luminescente la lisina biotinilata precedentemente incorporata nelle traduzioni, e infine esposte su lastre autoradiografiche (BioMax XAR film Kodak) in camera oscura.

Sequenziamento delle RT-PCR positive al PTT

Per gli individui risultanti avere prodotti di traduzione prematuramente troncati si è quindi proceduto a retrotrascrivere, amplificare e sequenziare il cDNA del tratto di gene interessato. I prodotti di amplificazione sono stati poi quantificati tramite elettroforesi su gel di agarosio con marcatore di pesi molecolari MWM III Boehringer. In seguito, per ogni segmento da sequenziare, una quantità di DNA pari a 2-4 ng per ogni 100 paia di basi di lunghezza è stata purificata incubando con ExoSAP (USB) a 37° per 15', poi inattivato a 80° per 15': in questo modo si eliminano i primer, che vengono digeriti dall'esonucleasi I, e i dNTP vengono defosforilati dalla Shrimp Alkaline Phosphatase. In ogni tubino sono stati quindi aggiunti 6.4 pmoli dei primer usati per amplificare:

Per il frammento A (sequenza di EDS 866, C5A1 EX 1S – C5A1 EX 17 A, tratti da Schwarze et al. [2000]):

Framm. 1:	C5A1 EX1S	GTCCATACCCGCTGGAAAGCGA
(1050 bp)	C5A1 EX7A	CTCACTGGGCACGTCATAGTCC

Framm. 2: C5A1 EX5S GATTACTGTGAGCACTACAGCCCT
 (1167 bp) C5A1 EX17A TTGTCCAGGCATTCCTCTGGCTCC

Per il frammento B (sequenza di EDS 769, C5A1 EX 16S – C5A1 2168 A, tratti da Nicholls et al. [1996]):

Framm. 4: C5A1 686S CTACCCAGGTCCTCGAGGAGTCAA
 (868 bp) C5A1 1553A ATTGCCTTTCAGTCCAAGAGCTCC

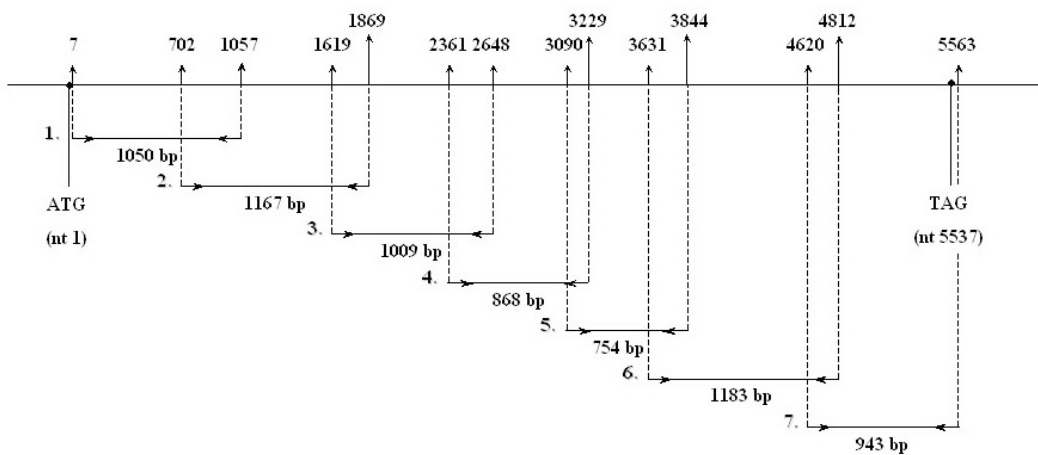


Figura 10: Posizionamento sulla coding sequence di COL5A1 dei frammenti utilizzati per i sequenziamenti e loro relativa dimensione.

Le condizioni di PCR utilizzate sono state:

Framm. 1	Framm. 2	Framm. 4	per 30 cicli
94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	
94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	
64° per 20''	64° per 20''	62° per 20''	
72° per 1'	72° per 1'	72° per 1'	
72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	

I campioni così preparati sono stati quindi essiccati a 65° e spediti al BMR Genomics di Padova per il sequenziamento (<http://www.bmr-genomics.it/>).

Ricerca di *exon skipping*

Nei soggetti in cui ancora non sono state individuate mutazioni si è quindi proceduto a ricercare eventuali *exon skipping*; un eventuale *exon skipping* sarebbe potuto sfuggire all'analisi con PTT in quanto gli esoni più piccoli di COL5A1 sono lunghi 45 paia di basi, e darebbero luogo a una differenza di soli 15 amminoacidi nel prodotto di traduzione. Per fare ciò, l'RNA è stato retrotrascritto e amplificato usando Superscript II ed Elongase Enzyme Mix (Invitrogen) nelle stesse condizioni descritte per il PTT. Sono state utilizzate sette coppie di primer, disposti in modo da ottenere frammenti amplificati parzialmente sovrapposti della dimensione massima di circa una chilobase, che coprono tutto il cDNA (primer per i frammenti 1, 2 e 7 da Schwarze et al. [2000], primer per i frammenti dal 3 al 6 da Nicholls et al. [1996], cfr. fig. 10):

Framm. 1: (1050 bp)	C5A1 EX1S C5A1 EX7A	GTCCATACCCGCTGGAAAGCGA CTCACTGGGCACGTAGTCATAGTCC
Framm. 2: (1167 bp)	C5A1 EX5S C5A1 EX17A	GATTACTGTGAGCACTACAGCCCT TTGTCCAGGCATTCCTCTGGCTCC
Framm. 3: (1009 bp)	C5A1 EX16S C5A1 972A	CAAGCCATTCTCCAGCAGGCCA CTTTGGTCCTTGTCTTCCTGGAT
Framm. 4: (868 bp)	C5A1 686S C5A1 1553A	CTACCCAGGTCCTCGAGGAGTCAA ATTGCCTTTCAGTCCAAGAGCTCC
Framm. 5: (754 bp)	C5A1 1415S C5A1 2168A	CCTTGCTGGAAAAGAAGGGACGAA CACTGCACCAGGGTTTCCTATTCC

Framm. 6: C5A1 1956S CAGAAAGGTGATGAAGGTCCCAGAG
(1183 bp) C5A1 3138A CGTAGTCCACGTAGTTCTCGCCATT

Framm. 7: C5A1 EX60S TCCAAAAGGTGCTAAGGGCTCCT
(943 bp) C5A1 UTRA TGCTGAGGTACGAGGTTGCTCTC

I cicli utilizzati sono stati i seguenti:

Framm. 1	Framm. 2	Framm. 3	Framm. 4	Framm. 5	Framm. 6	Framm. 7	
94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	94° per 2'	
94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	94° per 30''	per 30 cicli
64° per 20''	64° per 20''	60° per 20''	62° per 20''	62° per 20''	66° per 20''	63° per 20''	
72° per 1'	72° per 1'	72° per 1'	72° per 1'	72° per 1'	72° per 1'	72° per 1'	
72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	72° per 5'	

I prodotti di amplificazione sono quindi stati corsi su gel di agarosio allo 0.8% di lunghezza adeguata a risolvere bande con una differenza minima attesa di circa 45 paia di basi e con una concentrazione di Bromuro d'Etidio di 0.2 µg/ml.

Sequenziamento dell'intero cDNA

Negli individui risultanti negativi alle precedenti indagini si è a questo punto proceduto a sequenziare l'intero cDNA. Questo è stato retrotrascritto e amplificato, utilizzando le stesse condizioni e gli stessi primer usati per le amplificazioni per la ricerca di exon skipping; i prodotti amplificati così ottenuti sono stati quindi trattati con ExoSAP (USB) come nei casi precedenti, seccati e spediti al BMR Genomics di Padova per il sequenziamento.

Sequenziamento dell'esone 64

Per alcuni individui, risultanti avere un'anomalia nella sequenza dell'esone 64 (presenza in eterozigosi di una forma alternativa di esone 64), si è proceduto a sequenziare la regione attigua per ricercare mutazioni che possano alterare lo

splicing nelle giunzioni introne 63 – esone 64 ed esone 64 – introne 64 e visualizzare il tratto intronico in questione. I primer usati sono stati appositamente disegnati con il programma *Primer 2.0*:

C5A1 IN63F1	CTGGAGGCCGGAGAAGTAAC
C5A1 IN64R1	CACACCTAGCTGAGTCTTGC

I campioni sono stati amplificati, puliti con ExoSAP (USB), essiccati e spediti al BMR Genomics, come effettuato nei precedenti sequenziamenti.

Ricerca di mutazioni della regione 3' terminale trascritta non tradotta

Negli individui che non hanno mostrato alcun codone di terminazione prematuro con il PTT si è quindi proceduto a sequenziare, sul DNA genomico, la regione 3'UTR alla ricerca di eventuali mutazioni nel sito di poliadenilazione o di terminazione della traduzione. Si è utilizzata una coppia di primer appositamente disegnata usando il programma *Primer Designer ver. 2.0*:

C5A1 EX66 F	CAATGACTTCGGTGAAGCGT
C5A1 3'UTR R	AAGCCAGGCACACTTAACAT

I campioni sono quindi stati preparati trattando con ExoSAP (USB) come descritto sopra, seccati e spediti al BMR Genomics di Padova.

Sequenziamento della regione 5' trascritta non tradotta

Nei soggetti ancora risultanti negativi si è quindi verificata la regione 5'UTR per la ricerca di eventuali mutazioni che creino 5' upstream ORF; il primer forward è stato posizionato 754 nucleotidi a monte del codone d'inizio della trascrizione rispetto al trascritto di riferimento NM_000093.2 di NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. L'amplificazione di tale frammento è risultata particolarmente ostica a causa dell'elevata percentuale di GC, risultata essere del 74%; per effettuare la PCR si è quindi messo a punto un protocollo particolare che

utilizzava DMSO al 5%, una denaturazione iniziale a 98° per 3' e l'aggiunta dell'enzima in condizioni di hot start. I primer utilizzati sono stati appositamente disegnati con il programma *Primer 2.0*:

C5A1 UPSF	CACTGGTTCTTGGAGCATGG
C5A1 IN1R	GTGCATTCCACAGGCCAAGG

I cicli utilizzati sono stati:

95° per 5'	
98° per 10''	per 45 cicli
62° per 10''	
72° per 1'40''	
72° per 5'	

I campioni sono stati amplificati, puliti con ExoSAP (USB), essiccati e spediti al BMR Genomics.

RISULTATI

Alleli silenti in COL5A1

La genotipizzazione dei dieci individui EDS è stata effettuata tramite l'analisi di quattro polimorfismi intragenici (cfr. Figura 11 per esempi). Di questi individui, nove sono risultati eterozigoti per almeno un RFLP, nella fattispecie 5 per Pst I, 6 per Bsl I, 7 per BstU I e 4 per Dpn II, mentre uno è risultato omozigote per tutti e quattro i polimorfismi (cfr. tabella 4). La successiva analisi a livello di cDNA ha evidenziato la perdita o la significativa riduzione nell'espressione di uno dei due alleli in sette dei nove individui eterozigoti.

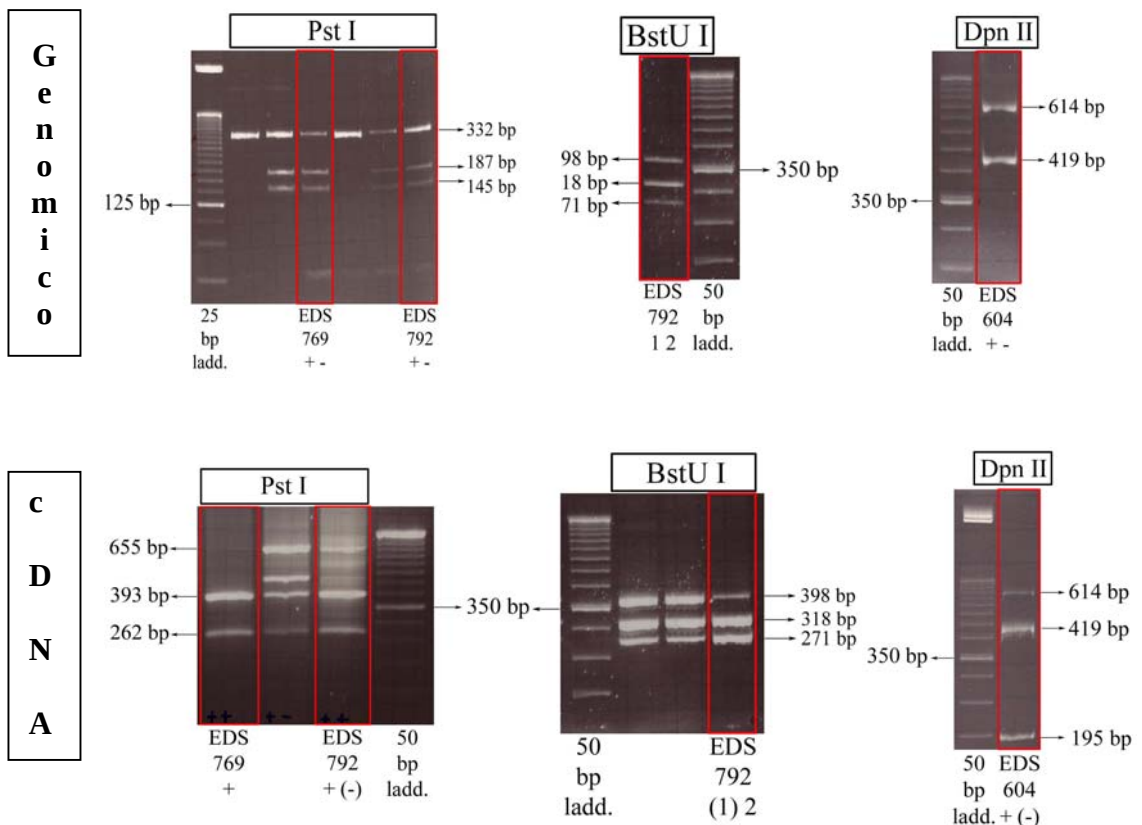


Figura 11: Esempi di genotipizzazione per i quattro polimorfismi dei frammenti di restrizione sul DNA genomico (in alto e a sinistra) e su cDNA (in basso); si può osservare come nelle genotipizzazioni su DNA genomico gli individui risultano eterozigoti per l'RFLP in questione, mentre nelle digestioni effettuate su cDNA il segnale relativo a uno dei due alleli è notevolmente attenuato, e in un caso (Pst I, EDS 769) appare completamente assente.

	Pst I		Bsl I		BstU I		DpnII		Polimorfismi informativi
	Genomico	mRNA	Genomico	mRNA	Genomico	mRNA	Genomico	mRNA	
EDS 604	++	/	+-	+(-)	12	1(2)	+-	+(-)	3
EDS 625	--	/	+-	+(-)	12	1(2)	++	/	2
EDS 626	+-	+	++	/	12	1	++	/	2
EDS 769	+-	+	+-	-	11	/	++	/	2
EDS 792	+-	+(-)	+-	+(-)	12	(1)2	+-	(+)-	4
EDS 793	+-	+-	++	/	11	/	++	/	1
EDS 799	++	/	++	/	11	/	++	/	0
EDS 819	--	/	--	/	12	12	+-	+-	2
EDS 866	+-	(+)-	+-	(+)-	12	(1)2	+-	(+)-	4
EDS TE	--	/	+-	-	12	(1)2	++	/	2

Tabella 4: Schema dei risultati della genotipizzazione e della successiva verifica dell'RNA stabilizzato con cicloesimide negli undici pazienti in analisi. In particolare si sono evidenziati gli individui risultanti allele silente. I simboli in parentesi indicano mancata, ma non totale riduzione dell'espressione dell'allele silente.

Verifica dell'RNA stabilizzato

Per gli individui risultati allele silente, l'RNA stabilizzato mediante trattamento delle cellule in coltura con cicloesimide è stato quindi analizzato per verificare la ricomparsa dell'allele nullo. Dopo estrazione e retrotrascrizione dell'RNA stabilizzato e successiva amplificazione tramite RT-PCR si è verificata l'effettiva ricomparsa dell'allele silente in tutti e sette gli individui analizzati.

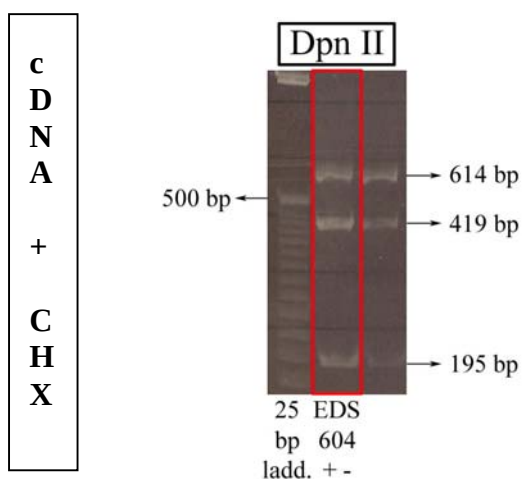


Figura 12: Esempio di genotipizzazione di cDNA retrotrascritto da RNA stabilizzato con cicloesimide; si osserva come effettivamente ricompare il segnale relativo all'allele silente (cfr. Figura 11).

Protein Truncation Test

Il fenomeno del decadimento dell'mRNA osservato è spesso riconducibile a mutazioni che inducono comparsa di un codone di terminazione prematura [Byers, 2002]. Per questo è stato utilizzato il PTT per mettere in evidenza tale situazione. In due soggetti, EDS 866 e EDS 769, l'analisi per chemiluminescenza del western blotting ha evidenziato una doppia banda. In un altro soggetto, EDS 626, pare essere presente una seconda banda nel frammento C; poiché il segnale appare però molto debole, si è deciso di procedere con le indagini su questo soggetto, come per i soggetti risultati negativi al PTT.

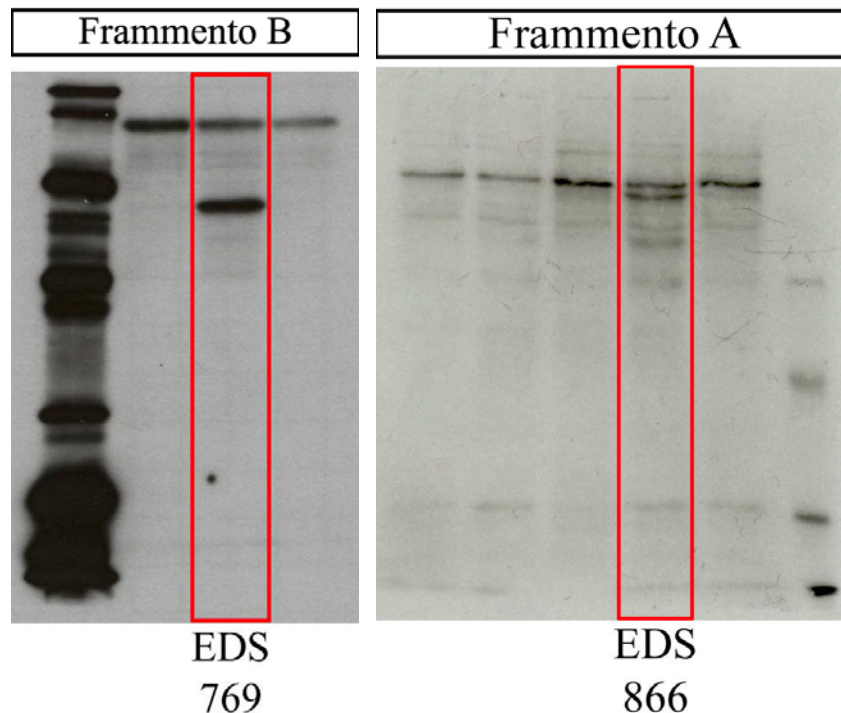


Figura 13: Western blotting del PTT del frammento B di EDS 769 e del frammento A di EDS 866. È ben visibile una banda a minor peso molecolare rispetto alla banda attesa dal prodotto di traduzione normale.

Sequenziamento delle RT-PCR positive al PTT

Le regioni di EDS 769 e EDS 866 che hanno dato risultato positivi al PTT sono quindi state sequenziate. Analizzando tali sequenze, e allineandole con

quelle presenti nel database nr di *Homo sapiens* di NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov], si sono riscontrate due mutazioni nei due pazienti: in EDS 769 la delezione di una singola guanina nell'esone 32, in posizione 3039 sulla sequenza di riferimento per l'mRNA NM_000093.2 [www.ncbi.nlm.nih.gov], causante uno slittamento della fase di lettura che provoca la comparsa di un codone di stop prematuro 187 triplette a valle (p.Gly886AspfsX188); in EDS 866 la delezione di una singola citosina (cfr. figura 14) nell'esone 13, in posizione 1983 sulla sequenza di riferimento per l'mRNA, causante un frameshift che provoca la comparsa di un codone di stop prematuro 23 triplette a valle (p.Gly536AlafsX22).

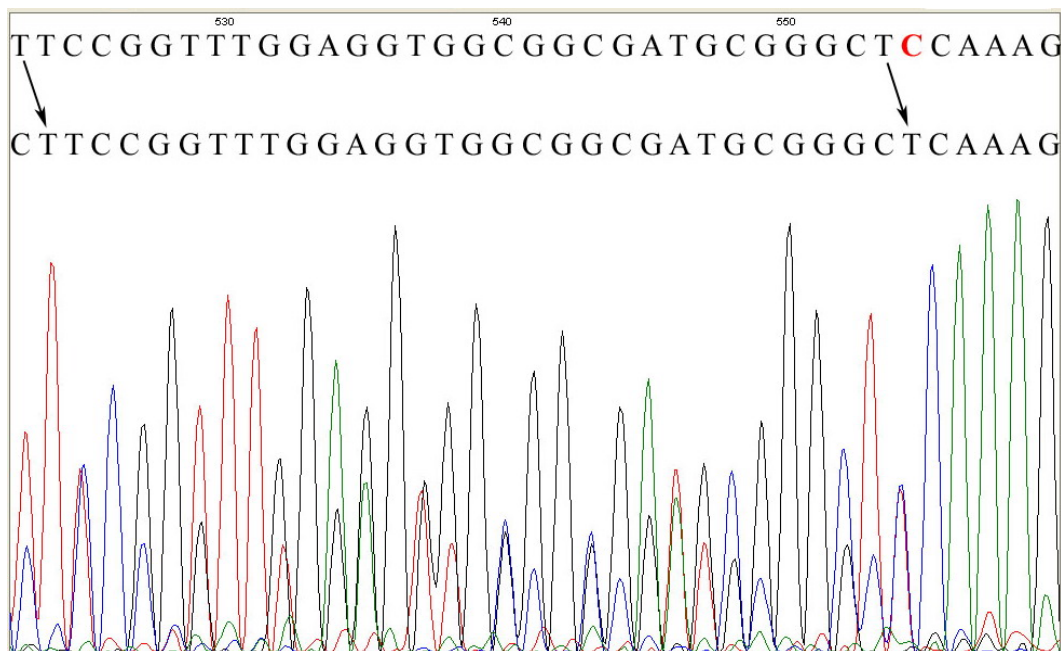


Figura 14: Risultato del sequenziamento del frammento A di EDS 866: si può osservare la zona della sequenza dove è stata riscontrata la delezione. In alto in figura è riportata la sequenza corretta, sotto la quale è riportata la sequenza mutata. È evidenziata la citosina deleta e il conseguente slittamento della sequenza.

Ricerca di exon skipping

La ricerca di exon skipping è stata effettuata su EDS 604, EDS 625, EDS 626, EDS 792 e EDS TE. L'analisi delle RT-PCR su gel di agarosio allo 0.8% non ha rilevato alcuno sdoppiamento nella banda dell'amplificato.

Sequenziamento dell'intero cDNA

Il sequenziamento dell'intera lunghezza del cDNA dei soggetti EDS 604, EDS 625, EDS 626, EDS 792 e EDS TE ha consentito quindi di rivelare in EDS 626 la delezione di una singola guanina (cfr. figura 15) nell'esone 61, in posizione 5041 sulla sequenza di riferimento per l'mRNA NM_000093, causante uno slittamento della fase di lettura che inserisce un codone di terminazione prematuro 65 triplette a valle (p.Lys1554ArgfsX65); questo conferma che la debole banda rilevata nel PTT corrispondeva effettivamente a un tradotto tronco. Negli altri soggetti non si sono riscontrate anomalie che possano giustificare il decadimento dell'mRNA.

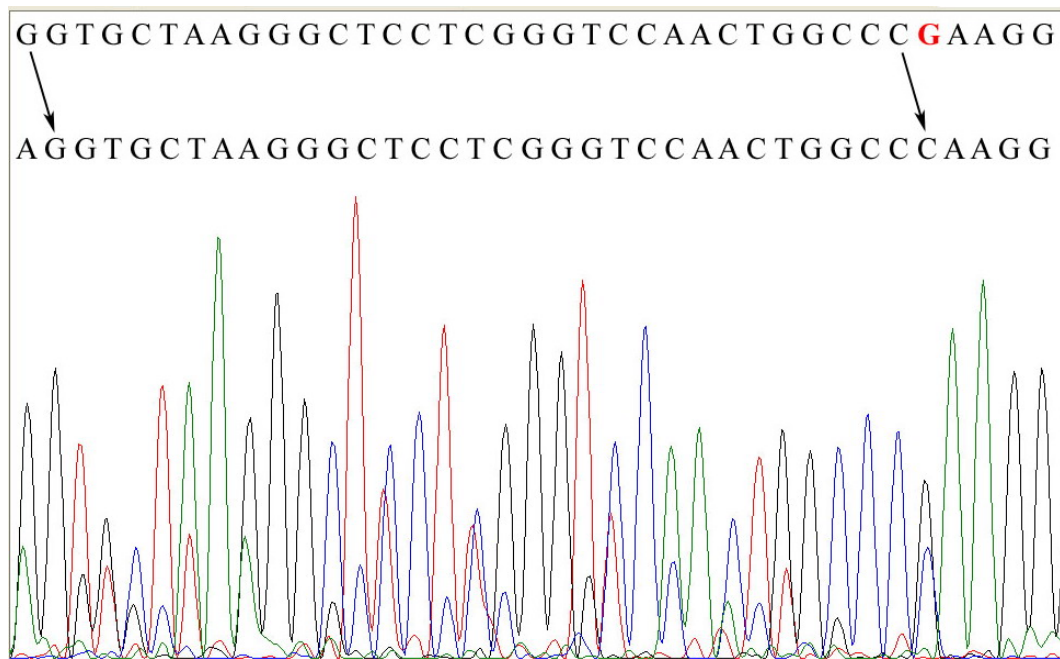


Figura 15: Sequenza relativa al frammento 6 di EDS 626: si può osservare la zona della sequenza dell'esone 61 dove è stata riscontrata la delezione. In alto in figura è riportata la sequenza corretta, sotto la quale è riportata la sequenza mutata. È evidenziata la guanina deleta e il conseguente slittamento della sequenza.

Dal sequenziamento del cDNA è stata messa in evidenza un'anomalia nell'esone 64 di EDS 625, EDS 792 e EDS TE; in questi soggetti la sequenza del frammento 7 presentava, per l'intera lunghezza del suddetto esone, una sovrapposizione di picchi, come se in tale regione fossero in realtà presenti due diverse sequenze della medesima lunghezza, una delle quali, tramite *blast* su

database nr di *Homo sapiens* di NCBI, corrispondeva effettivamente alla sequenza dell'esone 64 (lungo 69 nucleotidi). Estrapolando dai risultati del sequenziamento la seconda sequenza, e effettuando un *blast* di questa, si è riscontrato che corrispondeva ad un tratto di 69 nucleotidi dell'introne 64. Si è quindi ipotizzato un errore di splicing, da verificare sequenziando una regione includente i siti accettore e donatore di splicing fiancheggianti l'esone 64.

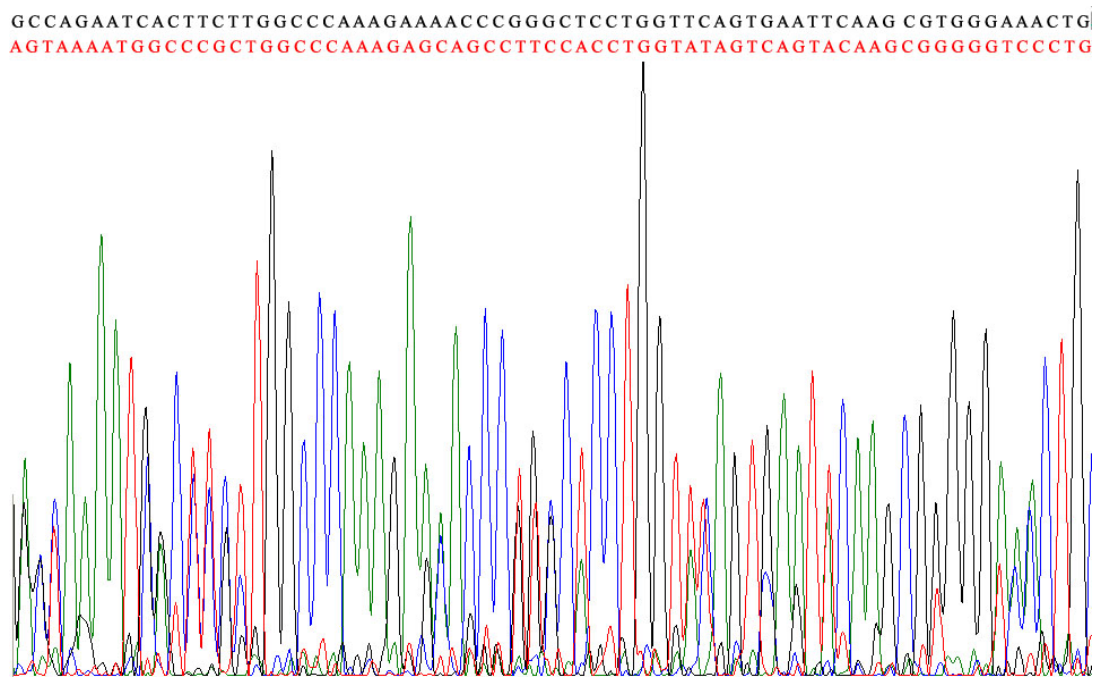


Figura 16: Sequenza relativa al frammento 7 di EDS TE: è riportato in figura il tratto di sequenza relativo all'esone 64, la cui sequenza di 69 nt è riportata in alto scritta in nero. Si può notare una seconda serie di picchi la cui sequenza, riportata in alto scritta in rosso, corrisponde a un tratto di esattamente 69 nt contenuto nell'introne 65.

L'analisi della sequenza delle regioni fiancheggianti l'esone 64 non rivela mutazioni nei siti donatore ed accettore di splicing, né nel *branch site* dell'introne 63. Non appare quindi evidente la causa di splicing anomalo.

Per cercare di stabilire se la presenza di questo trascritto anomalo potesse essere causa di instabilità dell'mRNA, il cDNA del frammento 7 (comprendente l'esone 64) è stato amplificato in EDS TE non stabilizzato, in EDS 866 stabilizzato e non, e in un soggetto *wild type*; queste sequenze hanno confermato in tutti i campioni la sovrapposizione di picchi precedentemente rilevata. Questo

risultato pone in evidenza che ci si è trovati di fronte ad una condizione evidentemente non patogenica di uno splicing alternativo non riportato in letteratura.

Sequenziamento della regione 3' terminale trascritta non tradotta

L'analisi della sequenza 3'-UTR in EDS 604, EDS 625, EDS 626, EDS 792 e EDS TE non ha rivelato nessuna anomalia in queste zone.

Sequenziamento della regione non trascritta 5' trascritta non tradotta

La ricerca di mutazioni in questa zona ha dato risultati negativi per tutti e quattro i soggetti (EDS 604, EDS 625, EDS 792, EDS TE).

DISCUSSIONE

Un campione rappresentato da dieci pazienti con diagnosi clinica di Ehlers–Dahnlos di tipo classico, è stato analizzato a livello di DNA genomico per quattro polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP). Nei nove individui risultati eterozigoti per almeno un RFLP si è quindi proceduto a genotipizzare il cDNA; in tal modo si è evidenziata in sette di questi nove soggetti, la totale scomparsa o la significativa riduzione di uno dei due trascritti (EDS 604, EDS 625, EDS 626, EDS 769, EDS 792, EDS 866, EDS TE).

Tale condizione di aploinsufficienza è stata presa in esame nel presente lavoro, essendo dimostrato che questa è una causa piuttosto frequente dell'insorgere nel fenotipo patologico, dal momento che ricorre nel 30% dei casi di EDS di tipo classico [Schwarze et al., 2000; Wenstrup et al., 2000; Malfait et al., 2005]. Questo campione di dieci soggetti rappresenta un sottogruppo della casistica raccolta nel nostro laboratorio, costituita da un totale di 46 soggetti con diagnosi o sospetto di EDS classico. Di questi 46 individui, 8 sono risultati non informativi e 7 allele nullo.

Mediante trattamento delle colture di fibroblasti con cicloesimide, noto inibitore della sintesi proteica, in grado quindi di impedire l'innescio del *non-sense mediated mRNA decay* (NMD), si è stabilizzato l'mRNA degli individui sopra citati, ripristinando così l'espressione dell'allele silente. Questo ha permesso di analizzare il cDNA di questi sette soggetti per ricercare la mutazione responsabile dell'aploinsufficienza. Tale indagine è stata effettuata tramite *protein truncation test*; in pratica amplificati che coprivano l'intera lunghezza della sequenza codificante di COL5A1 sono stati tradotti tramite un sistema di trascrizione/traduzione *in vitro*, e i prodotti di traduzione così ottenuti analizzati per verificare la presenza di frammenti troncati, indice quindi della presenza di un PTC.

In tre individui si è riscontrata una mutazione puntiforme di tipo *frameshift* causante la comparsa di un codone di terminazione prematuro a valle di questa (in dettaglio la delezione di una singola guanina nell'esone 32 in EDS 769, la delezione di una singola citosina nell'esone 13 in EDS 866 e la delezione di una singola guanina nell'esone 61 in EDS 626). La posizione di tutti e tre i PTC così

rilevati cade a più di 50 nucleotidi a monte dell'ultima giunzione esone – esone, ed è così in grado di innescare l'NMD [Nagy and Maquat, 1998].

Nei soggetti in cui il test PTT ha dato esito negativo (EDS 604, EDS 625, EDS 792, EDS TE) si è proceduto a ricercare alterazioni del tipo *exon skipping*, essendo descritto in letteratura un caso di *exon skipping* che pur essendo *in frame*, risultava associato ad instabilità del messaggero [Wenstrup et al., 2000]. Queste indagini hanno dato esito negativo, e si è proceduto a questo punto ad analizzare l'intera sequenza del cDNA.

Un'anomalia è stata a questo punto riscontrata nell'esone 64 in EDS 604, EDS 792 ed EDS TE, che sembrava essere un errore di splicing che sostituiva l'esone con un tratto dell'introne successivo. Avendo in seguito verificato, in questi individui, l'assenza di mutazioni nei siti di consenso per lo splicing, e inoltre rilevato che tale anomalia era presente anche in un'individuo la cui mutazione patogenica era già stata individuata (EDS 866), e soprattutto in un individuo sano analizzato per controllo, si è concluso che tale anomalia di sequenza rappresenta uno splicing alternativo non patogenico.

In quattro dei sette soggetti risultati allele nullo non si è quindi riscontrata nella *coding sequence* alcuna anomalia responsabile di instabilità del messaggero. Questa eventualità ricorre anche nei lavori di riferimento in letteratura, complessivamente in circa 1/4 dei casi [Wenstrup et al., 2000; Schwarze et al., 2000; Malfait et al., 2005]. In questi quattro individui (EDS 604, EDS 625, EDS 792, EDS TE) la ricerca di mutazioni è stata quindi allargata alle regioni non tradotte 5' e 3'; l'NMD può essere innescato anche da ORF in 5' al codone d'inizio canonico [Ruiz-Echevarria et al., 2000; Welch et al., 1999] o da mutazioni che cadono nel *polyadenilation site* [Muhlrad et al., 1999], ed inoltre la degradazione dell'mRNA può essere determinata per *nonstop decay* da mutazioni che aboliscono il codone di terminazione [Maquat, 2002]. L'analisi di sequenza di tali regioni non ha messo in evidenza alcuna anomalia.

In conclusione, su sette pazienti aploinsufficienti, dopo sequenziamento dell'intera *coding sequence* e delle regioni 5'UTR e 3'UTR, in quattro non è stata trovata la mutazione causale di tale condizione.

Una prima possibile ipotesi per spiegare la condizione di aploinsufficienza in questi quattro soggetti è che la causa risieda all'interno delle regioni introniche,

la cui sequenza non è stata verificata, in mutazioni in sequenze regolative dello splicing tipo ISE o ISS, o in mutazioni di siti consenso per lo splicing, causali di inclusione di lunghi introni nel trascritto, che sarebbero sfuggiti all'analisi sul cDNA (il frammento sarebbe stato così lungo da non venire amplificato). Per verificare queste due ipotesi gli approcci ipotizzabili sarebbero rispettivamente il sequenziamento genomico completo di COL5A1, che risulterebbe però piuttosto laborioso data la lunghezza degli introni (fino a 48 chilobasi), o il sequenziamento delle giunzioni introne – esone per evidenziare mutazioni nei siti di consenso per lo splicing; a causa dell'alta frammentazione di questo gene, tale indagine comporterebbe comunque la messa a punto e l'analisi di 66 amplificazioni per ogni paziente (tale è infatti il numero degli esoni).

Una seconda possibilità è che la sequenza di riferimento di COL5A1 riportata in database (*refseq* di NCBI NM_000093.2), su cui ci si è basati per analizzare il 5'UTR e il 3'UTR, non rappresenti la totalità dei trascritti e che in realtà tali regioni siano più estese; effettivamente da una ricerca sul database di Ensembl (<http://www.ensembl.org>) risultano riportati trascritti alternativi, uno dei quali presenta una regione 3' terminale più estesa di quasi 2000 bp rispetto alla sequenza di riferimento, in cui sono presenti altre sequenze putative di siti di poliadenilazione. In una simile eventualità, avendo effettuato le amplificazioni basandosi sulle *refseq* di NCBI, non sarebbe stato possibile evidenziare eventuali mutazioni in tali siti.

Si può dire comunque che l'approccio tramite PTT per individuare le mutazioni causali del decadimento dell'mRNA ha effettivamente consentito di rivelare mutazioni comportanti la comparsa di un PTC, anche se in generale non si è rivelato efficace a causa della proporzione, anormalmente alta (quattro soggetti su sette), di individui allele nullo non presentanti mutazioni nella *coding sequence*.

CONCLUSIONI

L'aploinsufficienza si dimostra essere anche nel nostro campione di soggetti causa frequente (7 pazienti su 38) del fenotipo EDS classico.

In tre degli individui allele nullo è stata identificata una delezione di singolo nucleotide che introduceva un codone di stop prematuro entro 50 nt dall'ultima giunzione esone – esone, e di conseguenza causava *nonsense mediated decay*.

Un numero consistente (4/7) dei pazienti allele nullo non hanno mostrato mutazioni nella *coding sequence* né nelle regioni 5' o 3' UTR che potessero spiegare l'instabilità dell'RNA messaggero.

Su questi soggetti sarà opportuno proseguire la ricerca della mutazione analizzando le regioni introniche o estendendo ulteriormente l'analisi delle regioni trascritte non tradotte.

BIBLIOGRAFIA

Andrikopoulos K, Liu, X, Keene D R, Jaenisch R, Ramirez F (1995)

Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during Matrix assembly.

Nature Genet. 9: 31-36

Beighton P, De Paepe A, Danks D (1988)

International nosology of hereditary disorders of connective tissue.

Am J Med Genet 29: 581-594

Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup R J (1998)

Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997.

Am. J. Med. Genet. 77: 31-37

Belgrader P, Cheng J, Maquat LE.

Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15;90(2):482-6

Bornstein, P. (1998)

Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis.

J. Cell Biol. 140: 419-430

Bouma P, Wayne A, Cabral A, William G, Marini J C (2001)

COL5A1 exon 14 splice acceptor mutation causes a functional null allele, haploinsufficiency of $\alpha 1(V)$ and abnormal heterotypic interstitial fibrils in Ehlers-Danlos syndrome II.

J Biol. Chemistry 276, No 16: 13356-13364

Burrows NP, Nicholls AC, Yates JR, Gatward G, Sarathachandra P, Richards A, Pope FM (1996)

The gene encoding collagen alpha1(V)(COL5A1) is linked to mixed Ehlers-Danlos syndrome type I/II.

J Invest Dermatol. 106(6): 1273-6

Byers PH (1997)

Ehlers-Danlos syndrome. In Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE,

Emery and Rimoin's principle and practical genetics, Vol 1: 1067-1081

Carter MS, Doskow J, Morris P, Li S, Nhim RP, Sandstedt S, Wilkinson MF.

A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro.

J Biol Chem. 1995 Dec 1;270(48):28995-9003

Danielson K, Baribault H, Holmes D, Graham H, Kadler K, Iozzo R (1997)

Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and fragility.

*J Cell Biology*136: 729-743

Danielson K, Baribault H, Holmes D, Graham H, Kadler K, Iozzo R (1997)

Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and fragility.

*J Cell Biology*136: 729-743

De Paepe A, Nuytinck L, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Naeyaert JM (1997)

Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II.

Am J Hum Genet. 60(3): 547-54

Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY, Corson GM, Chalberg SC, Pyeritz RE, Francomano CA.

Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome.
Genomics. 1993 Aug;17(2):468-75

Fasken MB, Corbett AH.

Process or perish: quality control in mRNA biogenesis.
Nat Struct Mol Biol. 2005 Jun;12(6):482-8. Review

Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC.

An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons.
Science. 2002 Mar 22;295(5563):2258-61

Gatfield D, Izaurrealde E.

Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage
in *Drosophila*.
Nature. 2004 Jun 3;429(6991):575-8

Giunta C, Steinmann B (2000)

Compound heterozygosity for a disease-causing G1489E [correction of G1489D] and disease-modifying G530S substitution in COL5A1 of a patient with the classical type of Ehlers-Danlos syndrome: an explanation of intrafamilial variability?
Am J Med Genet. 3;90(1): 72-9

Greenspan DS, Northrup H, Au KS, McAllister K A, Francomano CA, Wenstrup RJ, Marchuk DA, Kwiatkowski DJ (1995)

COL5A1: fine genetic mapping and exclusion as candidate gene in families with nail-patella syndrome, tuberous sclerosis 1, hereditary hemorrhagic telangiectasia, and Ehlers-Danlos syndrome type II.
Genomics 25: 737-739

Hall, G.W. and Thein, S. (1994)

Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia.

Blood, 83, 2031-2037

Iamamura Y, Scott I, Greenspan DS (2000)

The pro $\alpha 3(V)$ collagen chain.

J. Biol.Chemistry 275, No 12: 8749-8759

Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE.

Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20.

Cell. 2001 Sep 7;106(5):607-17

Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G.

Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex.

Science. 2001 Sep 7;293(5536):1832-6

Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE.

Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA

decay.

Cell. 2005 Jan 28;120(2):195-208

Kyriakides T R, Zhu YH, Smith L T, Bain S D, Yang Z, Lin M T, Danielson K G, Iozzo R V, LaMarca M, McKinney C E, Ginns E I, Bornstein, P. (1998)

Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis.

J. Cell Biol. 140: 419-430

Leisenmayer TF, Gibney E, Igoe F, Fitch JM, Fessler LI, Birk DE, (1993)

Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken $\alpha 1(V)$ NH₂ terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis.

J. Cell Biol. 121: 1181-1189

Lejeune F, Maquat LE.

Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells.

Curr Opin Cell Biol. 2005 Jun;17(3):309-15

Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA.

Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1.

Science. 2001 Sep 7;293(5536):1836-9

Malfait F, Coucke P, Symoens S, Loeys B, Nuytinck L, De Paepe A.

The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients.

Hum Mutat. 2005 Jan;25(1):28-37.

Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, Rubin EM, Bristow J.

Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition.

Nat Genet. 2002 Apr;30(4):421-5. Epub 2002 Mar 4.

Maquat, L E.

Skiing toward nonstop mRNA decay.

Science. 2002; 295: 2221 – 2.

Maquat LE.

Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb;5(2):89-99

Maquat LE.

Nonsense-mediated mRNA decay: a comparative analysis of different species.

Curr Genomics 2004;5:175-190

Menon KP, Neufeld EF.

Evidence for degradation of mRNA encoding alpha-L-iduronidase in Hurler fibroblasts with premature termination alleles.

Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1994 Nov;40(7):999-1005

Michalickova K, Susic M, Willing MC, Wenstrup RJ, Cole WG (1998)

Mutations of the alpha-2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce Ehlers-Danlos syndrome type I.

Hum. Molec. Genet. 7: 249-255

Mitchell P, Tollervey D.

An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'-->5' degradation.

Mol Cell. 2003 May;11(5):1405-13

Mitrovich QM, Anderson P.

Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*.

Genes Dev. 2000 Sep 1;14(17):2173-84

Muhlrad D, Decker CJ, Parker R.

Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-->3' digestion of the transcript.

Genes Dev. 1994 Apr 1;8(7):855-66

Muhlrad D, Parker R.

Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance.

RNA. 1999 Oct;5(10):1299-307.

Nagy E, Maquat LE.

A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance.

Trends Biochem Sci. 1998 Jun;23(6):198-9

Nicholls AC, McCarron S, Narcisi P, Pope FM (1994)

Molecular abnormalities of type V collagen in Ehlers Danlos syndrome.

Am. J. Hum. Genet. 55 (suppl.): A233

Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM (1996)

An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome.

J Med Genet. 33(11): 940-6

Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A.

Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen.

Am J Hum Genet. 2000 Apr;66(4):1398-402. Epub 2000 Mar 17.

Oliveira CC, McCarthy JE.

The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem. 1995 Apr 14;270(15):8936-43

Peltz SW, Brown AH, Jacobson A.

mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three cis-acting sequence elements and one trans-acting factor.

Genes Dev. 1993 Sep;7(9):1737-54

Qian L, Theodor L, Carter M, Vu MN, Sasaki AW, Wilkinson MF.

T cell receptor-beta mRNA splicing: regulation of unusual splicing intermediates.

Mol Cell Biol. 1993 Mar;13(3):1686-96

Richards AJ, Martin S, Nicholls AC, Harrison JB, Pope FM, Burrows NP (1998)

A single base mutation in COL5A2 causes Ehlers-Danlos syndrome type II.

J Med Genet. 35(10): 846-8

Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, den Dunnen JT.

Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations.

Hum Mol Genet. 1993 Oct;2(10):1719-21

Ruiz-Echevarria MJ, Peltz SW.

The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames.

Cell. 2000 Jun 23;101(7):741-51

Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers P (2000)

Null Alleles of the COL 5A1 of Type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos Syndrome(type I and II).

Am. J. Genet. 66: 1757-1765

Sambrook – McCallum – Russel, 2001

Molecular Cloning: a laboratory manual, third edition

Serin G, Gersappe A, Black JD, Aronoff R, Maquat LE.

Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4).

Mol Cell Biol. 2001 Jan;21(1):209-23

Takahara K, Sato Y, Okazawa K, Okamoto N, Noda N, Yaoi Y, Kato Y (1991)

Complete primary structure of human collagen alpha 1(V) chains.

J. Biol. Chemistry 266: 13124-13129

Thein, S.L., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I.J., Hutchinson, R.M., Old, J.M., Wood, W.G., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. (1990)

Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia.

Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87, 3924-3928

Thermann R, Neu-Yilik G, Deters A, Frede U, Wehr K, Hagemeyer C, Hentze MW, Kulozik AE.

Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation.

EMBO J. 1998 Jun 15;17(12):3484-94

Toriello HV, Glover TW, Takahara K, Byers PH, Miller DE, Higgins JV, Greenspan DS (1996)

A translocation interrupts the COL5A1 gene in a patient with Ehlers-Danlos syndrome and hypomelanosis of Ito.

Nat Genet. 13(3): 361-5

Utani W, Endo H, Shinkai H. (2001)

Deficiency of the decorin core protein in the variant form of Ehlers-Danlos syndrome with chronic skin ulcer.

J Dermatol Sci 27(2): 95-103

Van der Luijt R, Khan PM, Vasen H, van Leeuwen C, Tops C, Roest P, den Dunnen J, Fodde R.

Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test.

Genomics. 1994 Mar 1;20(1):1-4.

Valkkila M, Melkonieni M, Kvist L, Kuivaniemi H, Tromp G, Ala-Kokko L (2001)

Genomic organization of the human COL3A1 and COL5A2 genes: COL5A2 has evolved differently than the other minor fibrillar collagen genes.

Matrix Biology 20: 357-366

Van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R.

Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon.

Science. 2002 Mar 22;295(5563):2262-4

Vogel A, Holbrook KA, Steinmann B, Gitzelmann R, Byers PH (1979)

Abnormal collagen fibril structure in the gravis form (type I) of Ehlers-Danlos syndrome.

Lab. Invest. 40: 201-206

Vuorio E, and the Crombrugghe B (1990)

The family of collagen genes.

Annu. Rev. Biochem. 59: 837-872

Welch EM, Jacobson A.

An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA.

EMBO J. 1999 Nov 1;18(21):6134-45

Wenstrup RJ, Langland GT, Willing MC, D'Souza VN, Cole WG (1996)

A splice-junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of pro-alpha 1(V) chains results in the gravis form of the Ehlers-Danlos syndrome (type I).

Hum Mol Genet. 5(11): 1733-6

Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, Giunta C, Steinmann B, Young F, Susic M, Cole W G (2000)

COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS.

Am J Genet. 66: 1766-1776

Wordsworth BP, Ogilvie DJ, Sykes BC.

Segregation analysis of the structural genes of the major fibrillar collagens provides further evidence of molecular heterogeneity in type II Ehlers-Danlos syndrome.

Br J Rheumatol. 1991 Jun;30(3):173-7