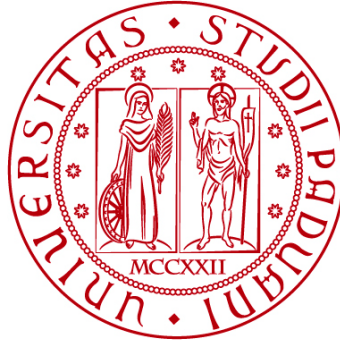


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**VALIDAZIONE DI VARIANTI IPOMORFE SULLO
SPLICING MEDIANTE MINIGENI IBRIDI**

Tutor: Dott. Eva Trevisson

Genetica Clinica – Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Laureando: Sebastiano Saccon

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

1. Introduzione

- 1.1. Il meccanismo di splicing
- 1.2. Lo spliceosoma
- 1.3. Meccanismi di regolazione dello splicing
- 1.4. Mutazioni che alterano lo splicing
- 1.5. La Neurofibromatosi di tipo I
- 1.6. Minigene ibrido

2. Materiali e Metodi

- 2.1. Analisi *in silico*
- 2.2. Mutagenesi
- 2.3. Trasformazione dei batteri
- 2.4. Inoculi, Miniprep e sequenziamento
- 2.5. Trasfezione in cellule umane e analisi dei trascritti

3. Discussione

1. Introduzione

1.1 Il meccanismo di Splicing

Lo splicing è un processo di maturazione post-trascrizionale dell' RNA, che avviene nel nucleo delle cellule eucariotiche, mentre è quasi sempre assente nei procarioti. Un gene può contenere tratti di sequenza interposti che non compaiono nel suo trascritto maturo: tali sequenze sono definite introni, mentre le sequenze che vanno a formare l'mRNA maturo sono gli esoni. Lo splicing è il meccanismo che permette la rimozione degli introni dal pre-mRNA, in modo da ottenere l'mRNA maturo, attraverso un'ordinata sequenza di eventi che prevede la rottura e la formazione di legami fosfodiesterici. Alcuni pre-mRNA possono essere soggetti a splicing in modi diversi: lo splicing alternativo è il meccanismo grazie al quale dallo stesso trascritto precursore si possono ottenere potenzialmente molti mRNA maturi. Questo implica che dallo stesso gene possono avere origine molte proteine diverse, e si stima che il 90% o più dei geni umani codificanti per proteine siano soggetti a splicing alternativo. Il numero di prodotti alternativi che originano da un gene sono solitamente due, ma possono arrivare ad essere anche centinaia o migliaia. Per questo motivo, lo splicing alternativo consente di aumentare la complessità e la specializzazione delle cellule senza dover aumentare il numero di geni e la dimensione del genoma^{1,2}.

Gli introni presentano al 5' e al 3' delle sequenze dinucleotidiche, GU ed AG, dette rispettivamente sito donatore ed accettore di splicing. Altre sequenze conosciute, presenti in prossimità del sito accettore, sono la regione ricca di pirimidine ed il sito di ramificazione; quest'ultima è una sequenza che contiene un'adenina importante per la rottura e la formazione dei legami fosfodiesterici. Tali sequenze e regioni sono altamente conservate e risultano fondamentali affinché il complesso meccanismo dello splicing avvenga correttamente².

Il processo di splicing prevede due reazioni di transesterificazione che avvengono in successione (Figura 1). La prima consiste nell'attacco nucleofilo da parte del 2'OH dell'adenina presente nel sito di ramificazione al 5' del sito donatore;

successivamente si realizza un taglio che lascia un 3'OH libero all'estremità dell'esone. Infine, il 5'P libero dell'introne lega l'adenina del sito di ramificazione, formando una struttura a cappio (Lariat). Si può notare come l'adenina coinvolta in questo processo sia implicata in tre legami fosfodiesterici, nelle posizioni 2', 3' e 5' del ribosio; è per questo che si definisce come sito di ramificazione. La seconda reazione consiste nell'attacco nucleofilo da parte del 3'OH libero appena formatosi sull'esone, al 5' dell'esone a valle. In questo modo si realizza la concatenazione dei due esoni e l'eliminazione dell'introne ².

1.2 Lo Spliceosoma

Il meccanismo di splicing è catalizzato da un complesso macromolecolare detto spliceosoma. Quest'ultimo è composto da: le small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), le quali contengono uno o due small nuclear RNA (snRNA); i snRNA, denominati U1, U2, U4, U5 e U6, che permettono il riconoscimento di specifiche sequenze di RNA. Lo spliceosoma ha la funzione di permettere il corretto riconoscimento della coppia di siti di splicing e, in seguito, il loro corretto posizionamento ed avvicinamento ².

Il funzionamento dello spliceosoma consiste in una serie ordinata di eventi detta ciclo dello spliceosoma (Figura 2). Il primo evento è il legame tra snRNP U1 e il sito donatore; quindi, la proteina Branch point Binding Protein (BBP) lega il sito di ramificazione, mentre il fattore U2AF lega il tratto polipirimidinico e il sito accettore; queste interazioni assicurano il corretto riconoscimento dell'introne. A questo punto interviene la snRNP U2, che scalza BBP dal sito di ramificazione; questa interazione permette all'adenina del sito di ramificazione di rendersi accessibile alla prima reazione di transesterificazione. Successivamente, le snRNP U4/U6 e U5 interagiscono con le snRNP già presenti, permettendo l'avvicinamento del sito di ramificazione con il sito di splicing al 5'. Vengono rilasciate anche la snRNP U1, che viene rimpiazzata dalla snRNP U6 nel sito donatore, e la snRNP U4. Questi scambi permettono l'interazione delle snRNP U2 e U6, che attiva la capacità catalitica dello spliceosoma. A questo punto, viene catalizzata la prima reazione di transesterificazione, si forma l'intermedio intronico a forma di cappio e viene

catalizzata la seconda reazione di transesterificazione. Gli introni rimossi vengono prima linearizzati e poi degradati, e le componenti dello spliceosoma si distaccano².

Molti geni delle cellule eucariotiche codificano per pre-mRNA che può essere soggetto a splicing alternativo. Gli eventi che permettono questa variabilità sono: l'esistenza di esoni facoltativi o mutualmente esclusivi, la ritenzione di introni e l'esistenza di siti al 5' e al 3' alternativi. L'assortimento combinatorio di eventi di splicing può portare alla generazione di un numero incredibilmente grande di trascritti².

1.3 Meccanismi di regolazione dello splicing

La regolazione dello splicing coinvolge elementi in *cis* costituiti da motivi sul pre-mRNA e da elementi in *trans*, ossia proteine che interagiscono in modo specifico con gli elementi in *cis*. Questa interazione permette di modulare l'efficienza con cui vengono riconosciuti i siti di splicing in modo che, a seconda della condizione e delle necessità cellulari, ne venga usato uno specifico assortimento, che esprima le isoforme trascrizionali più appropriate in un dato momento. Gli elementi in *cis* sono classificati come *enhancer* e *silencer* esonici oppure come *enhancer* e *silencer* intronici, a seconda della loro posizione. Questi elementi facilitano o impediscono il riconoscimento dei siti di splicing. Gli *exonic splicing enhancers* (ESE) sono riconosciuti da proteine della famiglia SR, che prendono questo nome a causa di un dominio proteico ricco in arginina (R) e serina (S), e la loro interazione favorisce l'assemblaggio dello spliceosoma. Le sequenze ESE riconosciute dalle proteine SR sono spesso ricche in purine, ma non hanno una sequenza ben definita; questo può indicare l'esistenza di numerose classi funzionali di *enhancers* e che le proteine SR riconoscono sequenze degenerate. Gli *exonic splicing silencers* (ESS) interagiscono con le proteine heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (snRNP), ed agiscono in vari modi: se sono sovrapposti a elementi ESE, silenziano l'esone per competizione diretta per il legame di elementi in *trans*; oppure, due elementi ESS posti nei due introni che includono l'esone da silenziare possono dimerizzare, creando un loop di RNA che non sarà considerato dallo spliceosoma³.

1.4 Mutazioni che alterano lo Splicing

Con mutazioni che alterano lo splicing ci si riferisce alle mutazioni che avvengono nelle sequenze consenso in *cis*, che alterano la capacità del complesso di splicing di riconoscere correttamente le giunzioni esone-introne. La conseguenza di queste mutazioni è la creazione di un trascritto aberrante del gene.

Le mutazioni che alterano lo splicing (Figura 3) possono essere divise in cinque categorie:

- Mutazioni nei siti canonici di splicing che causano exon skipping;
- Mutazioni introniche che, formando nuovi siti di splicing, causano l'inclusione di uno pseudo-esone;
- Mutazioni esoniche che, formando nuovi siti di splicing, risultano nella perdita di un frammento dell'esone;
- Mutazioni nei siti canonici di splicing che causano l'utilizzo, nel processo di splicing, di siti criptici di splicing esonici o intronici;
- Mutazioni esoniche che coinvolgono elementi regolatori ESE ed ESS ⁴.

Le mutazioni che alterano lo splicing hanno conseguenze di diversi tipi:

- Exon skipping. Le mutazioni al sito di splicing al 5' determinano l'esclusione dell'esone a monte, mentre le mutazioni al sito di splicing al 3' determinano l'esclusione dell'esone a valle. Anche le mutazioni agli ESE possono portare all'esclusione di un esone. Questo fenomeno può determinare l'interruzione della Open Reading Frame (ORF), solitamente causando l'inserimento di un codone di stop prematuro e quindi l'eventuale formazione di una proteina tronca ⁴.
- Ritenzione dell'introne. Questo fenomeno avviene nel caso in cui le mutazioni portino a una totale assenza di splicing ³.
- Formazione di siti criptici di splicing. I siti criptici di splicing sono sequenze simili alle sequenze consenso dei siti di splicing canonici. Solitamente, sono ignorati dallo spliceosoma perché privi degli elementi regolatori in *cis* ESE, ma le mutazioni possono attivarli. Ad esempio, se un sito canonico di splicing è debole e

una mutazione intronica attiva un sito criptico di splicing, causandone l'aumento dell'affinità alle componenti dello spliceosoma, questo sito alternativo sarà usato nel processo di splicing. I siti criptici di splicing possono esistere sia negli esoni che negli introni, causando rispettivamente l'inclusione di un frammento di introne e l'esclusione di un frammento di sequenza codificante³.

L'analisi delle mutazioni che alterano lo splicing che si basa sul sequenziamento del DNA genomico non è ottimale, in quanto l'effetto che la mutazione avrà sull'mRNA maturo non può essere accuratamente predetta dagli algoritmi che utilizzano il DNA genomico come dato. È necessario determinare sperimentalmente l'espressione dell'mRNA e i pattern di splicing. Un modo in cui l'uso del DNA genomico come dato porta a trarre conclusioni errate sugli effetti delle mutazioni, è dato dall'assunzione a priori di quale effetto abbiano le mutazioni missenso, nonsense o silenti sulla proteina espressa da un dato gene. Le mutazioni missenso provocano la sostituzione di un amminoacido; le mutazioni nonsense generano un codone di stop prematuro e le mutazioni silenti, pur modificando un nucleotide, codificano per lo stesso amminoacido del trascritto wild-type. L'assunzione a priori che queste mutazioni, avvenute su un dato gene, abbiano solo le conseguenze appena descritte sulla relativa proteina, non si rivela sempre vera quando si fa l'analisi dei trascritti di RNA. È possibile, ad esempio, che una mutazione silente sia una mutazione esonica che coinvolge elementi regolatori ESE, portando a *exon skipping*. Quindi, per evitare di classificare in modo errato una mutazione di un paziente affetto da una malattia genetica, è importante determinare sperimentalmente l'espressione dell'mRNA e i pattern di splicing³.

1.5 La Neurofibromatosi di Tipo I

La Neurofibromatosi di Tipo 1 (NF1) è una condizione autosomica dominante causata da mutazioni nel gene *NF1*. I più frequenti sintomi includono alterazioni nella pigmentazione della pelle, noduli iridei di Lisch, multipli neurofibromi benigni. Altre possibili manifestazioni cliniche per le persone affette da *NF1* sono disabilità legate all'apprendimento, displasia scheletrica, problemi di

vascolarizzazione, insorgenza di tumori nel sistema nervoso centrale (CNS) e tumore maligno della guaina dei nervi periferici ⁷.

Il gene *NF1* è lungo circa 350 kb, è composto da 60 esoni e codifica per almeno tre trascritti diversi originanti in seguito a splicing alternativo, che coinvolge in totale 7 esoni, la cui inclusione è modulata con meccanismi diversi. Sono state individuate mutazioni lungo l'intero gene *NF1*. Le mutazioni finora caratterizzate sono di diversa natura: sostituzioni di singoli nucleotidi, delezioni ed inserzioni *in-frame* ed *out-of frame*, ampie micro-delezioni e duplicazioni o delezione di singoli o multipli esoni ^{5,7}.

Il gene *NF1* codifica per la Neurofibromina, che è espressa in diverse cellule: neuroni, cellule gliali e cellule di Schwann. La sua funzione non è ancora del tutto compresa, ma uno dei suoi ruoli è quello di attivare la Ras GTPasi. Quest'ultima promuove l'idrolisi della proteina Ras-GTP attiva nella sua forma inattiva Ras-GDP. La forma attiva di Ras influenza diverse cascate di segnale, incluse quelle che coinvolgono la Mytogen Activated Protein Kinase (MAPK), la Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) e altre proteine. L'attivazione di queste cascate di segnale porta generalmente alla sopravvivenza e alla proliferazione cellulare. Nella Neurofibromatosi c'è una perdita o una diminuzione di funzionalità della Neurofibromina, compromettendo la regolazione di Ras e portando a proliferazione cellulare incontrollata ⁸.

I test effettuati per studiare gli effetti delle mutazioni su *NF1* si possono dividere in due categorie, ciascuna con alcune criticità:

- Test condotti direttamente sull'RNA del paziente: includono ad esempio saggi molecolari basati sull'RNA e metodi per individuare modificazioni nel numero di trascritti. I campioni di RNA, tuttavia, non sempre sono disponibili, e la loro manipolazione è complessa per le ragioni discusse in precedenza;
- Test che fanno uso di tecniche di screening delle mutazioni attraverso il sequenziamento massivo del DNA genomico, e metodi basati sul cDNA per l'analisi. Lo studio del DNA genomico ha il limite principale nella difficoltà di

interpretazione delle mutazioni sui trascritti, in particolare quando si tratta di mutazioni puntiformi che potrebbero alterare lo splicing.

Il sistema di analisi basato su un minigene ibrido permette di studiare l'effetto delle mutazioni puntiformi che alterano lo splicing di *NF1*, senza il bisogno di ricorrere all'RNA del paziente ⁵.

1.6 Minigene Ibrido

Nell'ambito della diagnosi di malattie genetiche dovute a varianti che influenzano lo splicing dell'mRNA è necessario studiare il trascrittoma del paziente. Utilizzare un campione di RNA, però, è una pratica complicata per diverse ragioni: certi trascritti sono espressi solo in alcuni tessuti o tipi di cellule potenzialmente difficili da ottenere, l'estrazione e la conservazione dell'RNA sono più complesse rispetto al DNA e la manipolazione dell'RNA richiede condizioni particolari per evitare la contaminazione di RNAsi. A causa delle ragioni appena elencate, si preferisce lavorare utilizzando come campione di partenza il DNA genomico del paziente, e un buon sistema di analisi per questo scopo è rappresentato dai minigeni ibridi ⁵.

I minigeni ibridi sono vettori utilizzabili in cellule eucariotiche che contengono un gene o un pezzo di gene. I minigeni consentono di studiare gli effetti della mutazione sull'espressione dell'mRNA e sui meccanismi di splicing. Infatti, all'interno del minigene viene inserita la parte di gene mutato di interesse che è stata ottenuta dal DNA del paziente, e le sue regioni fiancheggianti. Per studiare l'effetto della mutazione sullo splicing, è necessario che il minigene contenga tutti gli elementi in *cis* inclusi nella regolazione dello splicing della regione di interesse. Spesso tutti gli elementi in *cis* che regolano lo splicing di un certo esone si trovano fino a 300 pb a monte e a valle dell'esone; quindi, queste regioni fiancheggianti devono essere incluse nel minigene. A volte gli elementi in *cis* di regolazione dello splicing sono più distanti ed è necessario includere molte più paia di basi, anche includendo altri esoni ⁶.

Nel presente studio si descrivono i procedimenti atti ad analizzare gli effetti sullo splicing di una variante riscontrata, sia a livello somatico che germinale, in una paziente con melanoma nella giunzione ano-rettale.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Analisi *in silico*

Sono stati sviluppati software capaci di predire *in silico* se una mutazione ha effetti sullo splicing. Questi programmi si basano su algoritmi con un livello di affidabilità non ottimale. In particolare, sono più imprecisi per le mutazioni che riguardano sequenze meno conservate. Il software *Human Splicing Finder* (HSF) permette l'identificazione dei segnali di splicing, compresi i siti di splicing accettore e donatore, il sito di ramificazione e gli elementi regolatori ESE ed ESS. HSF presenta un sistema predittivo per le mutazioni introniche ed esoniche, che è in grado di predire, con un certo margine di errore, se ci sarà effetto sullo splicing. L'analisi della variante di interesse con HSF descrive un'alterazione del sito donatore e prevede che molto probabilmente questo avrà effetto sullo splicing. Tuttavia, non si può attribuire a priori un significato funzionale a queste mutazioni solamente con i modelli di bioinformatica, perché non sono del tutto affidabili. L'analisi sperimentale del minigene ibrido servirà a verificare il ruolo patogenetico della mutazione e a determinare le conseguenze della mutazione sul trascritto.

2.2 Mutagenesi

La variante studiata è c.4332+2_4332+3delTG nell'isoforma NM_001042492.2 (TRANSCRIPT VARIANT 1) di *NF* che consiste nella delezione di due nucleotidi TG, nel secondo e terzo nucleotide a valle dell'esone 23a di *NF1*; quindi, colpisce il sito donatore al 5' GT dell'introne 24. È stato utilizzato un minigene già esistente, nel quale erano stati clonati l'esone 23a *wild type* e le regioni fiancheggianti introniche. Nello specifico, una frazione di 435pb dell'introne a monte e una di 378pb di quello a valle. Il costrutto del minigene è stato modificato in modo da contenere la delezione di interesse attraverso una reazione di mutagenesi. È stato utilizzato il *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent

Technologies). Si sintetizza il DNA che presenta la mutazione grazie all'utilizzo di primer che contengono la delezione desiderata. Le condizioni applicate sono state:

Componenti	Reazione in 50ul
Reaction buffer	5ul
DNA templatato	2,5ul (25ng)
Primer forward	1,25ul (125ng)
Primer reverse	1,25ul (125ng)
dNTPs	1ul
QuickSolution reagent	1,5ul
QuickChange Lightning Enzyme	1ul
H2O	A volume

Il termociclatore è stato impostato con il seguente programma:

Segmento	Cicli	T(°C)	Tempo
1	1	95	2'
2	18	95	20''
		55	10''
		68	30'/kb
3	1	68	5'

I primers sono stati disegnati utilizzando *QuickChange Lightning Design Program*.

Le sequenze sono le seguenti:

Primer reverse:

5'-GAT AGC TAG ATT ATC AAA ATA ATT CCT TTG ACA TTA ACT TCA AGC CCC -3'

Primer forward:

5'-GGG GCT TGA AGT TAA TGT CAA AGG AAT TAT TTT GAT AAT CTA GCT ATC -3'

Una volta terminata la reazione, sono stati aggiunti 2µl dell'enzima DpnI per digerire il DNA templatato; questo enzima è specifico per il DNA metilato ed emimetilato. La reazione richiede 5' a 37°C. Parallelamente è stata preparata una

reazione di controllo per la mutagenesi, mediante l'utilizzo del *pWhitescript 4.5-kb control plasmid*. Questo plasmide di controllo contiene un codone di stop (TAA) nella posizione in cui normalmente appare il codone per la glutammina (CAA), nel gene della β -galattosidasi. La reazione di mutagenesi, fatta con gli appositi primers di controllo, ristabilisce il codone per la glutammina *wild-type*.

2.3 Trasformazione dei batteri

Sono stati trasformati batteri *XL10-Gold ultracompetent cells* (Agilent Technologies) con la tecnica *heat shock*. Sono stati prelevati 45 μ l di cellule e sono stati aggiunti 2 μ l di β -mercaptoetanolo per aumentare l'efficienza di trasformazione, e infine sono stati aggiunti 2 μ l di campione.

Sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- 30' in ghiaccio
- 30'' immergere in acqua a 42°C
- 2' in ghiaccio
- Aggiungere 500 μ l di terreno SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)
- 60' incubare a 37°C e 225rpm di oscillazione

Sono stati piastrati i batteri con terreno LB (Luria-Bertani) agar e incubati a 37°C *over night* (O/N). Sono state piastrate anche le cellule per il controllo positivo e quello negativo:

Tipo di reazione	Volume da piastrare
pWhitescript mutagenesis control	10 μ l
pUC18 transformation control	2,5 μ l
Campione mutagenesi	250 μ l

Le cellule trasformate con il plasmide di controllo in cui è avvenuta la mutagenesi vengono controllate per il fenotipo della β -galattosidasi, ovvero il colore blu. Per essere presentato, il colore blu necessita che nel terreno della piastra siano presenti IPTG e X-gal. Il plasmide di controllo pUC18 è utilizzato per verificare l'efficienza della trasformazione.

2.4 Inoculi, Miniprep e sequenziamento

Sono state prelevate 8 colonie dalle piastre; quindi, sono stati preparati 8 tubi Falcon, contenenti ciascuno:

- 3ml terreno LB
- 3µl di ampicillina
- La colonia d'interesse

Gli inoculi sono stati incubati a 37°C O/N e in agitazione a 225rpm . Successivamente, è stato purificato il DNA plasmidico, utilizzando il *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)*. La procedura consiste in 3 passaggi: preparazione e pulizia del lisato batterico, legame del DNA sulla membrana di silice del kit, ed infine lavaggio ed eluizione del DNA.

Per la Miniprep è stato applicato il seguente protocollo:

- Risospendere le cellule batteriche in 250µl di *Buffer P1* e trasferirle in una Eppendorf da 1,5ml
- Aggiungere 250µl del buffer di lisi P2 e mescolare per inversione del tubo 4-6 volte; lasciar avvenire la reazione di lisi per 5'
- Aggiungere 350µl del buffer di neutralizzazione N3 e mescolare per inversione del tubo 4-6 volte; centrifugare per 10' a 13.000rpm
- Aggiungere 800µl del surnatante appena ottenuto alla *QIAprep 2.0 Spin Column*
- Centrifugare per 30-60'' e disfarsi dell'eluato
- Lavare la colonnina aggiungendo 750ul del buffer di lavaggio PE e centrifugando per 30-60'' e disfarsi dell'eluato
- Centrifugare a vuoto a 13000rpm per 1' per eliminare il buffer residuo
- Posizionare la colonnina in una nuova Eppendorf da 1,5ml
- Per eluire il DNA, aggiungere 50µl di acqua, aspettare 1', e infine centrifugare a 13000 rpm per 1'

È stata misurata la concentrazione del DNA con Nanodrop. Sono stati preparati i campioni al sequenziamento con *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*), il quale fornisce i reagenti necessari alla reazione per il sequenziamento Sanger. Le condizioni applicate sono state:

Componente	Reazione in 20µl
Buffer BigDye3.1	3µl
Primer forward	0,6µl
Primer reverse	0,6µl
Enzima BigDye3.1	3µl
DNA	2ul (150ng)
H2O	A volume

Il termociclatore è stato impostato con il seguente programma:

Segmento	Cicli	T(°C)	Tempo
1	1	96	1'
2	25	96	10''
		50	5''
		60	4'

È stato utilizzato il programma *Chromas* per confrontare il fluorogramma con la sequenza ottenuta: la visualizzazione del fluorogramma permette di valutare la qualità della sequenza a livello del singolo nucleotide. Sono state osservate le sequenze ottenute e ognuna delle colonie analizzate presentava la mutazione desiderata (Figura 4).

2.5 Trasfezione in cellule umane e analisi dei trascritti

Si utilizza il minigene per la trasfezione di cellule umane HEK 293 (*Human Endothelial Kidney*). Si trasfettano le cellule con il plasmide mutato, con *quello wild type* (controllo positivo) e con il vettore vuoto (controllo negativo). Le cellule si fanno crescere O/N. Si effettua l'estrazione dell'RNA. Viene fatta la

retrotrascrizione in cDNA, ed una volta ottenuto viene amplificato mediante PCR. Viene fatta una corsa elettroforetica sul gel d'Agarosio al 2% per analizzare le dimensioni del cDNA. Mediante il confronto tra il cDNA proveniente dal plasmide con la mutazione e quello proveniente dal plasmide *wild type*, si verifica se la mutazione ha avuto effetti sul meccanismo di splicing. Il vettore vuoto, invece, dovrebbe restituire una banda di piccole dimensioni, corrispondente all'esone 2 della β -globina di 400pb. Si esegue il sequenziamento Sanger e con le sequenze ottenute si esegue un confronto *Blast* tra i trascritti mutati e quelli *wild type*, in modo da confermare oppure escludere eventuali alterazioni nel meccanismo di splicing.

3. DISCUSSIONE

L'interpretazione di molte varianti dal significato biologico e clinico sconosciuti ("*unclassified variant*" UV) che vengono trovate in *screening* genetici rappresentano una sfida per la diagnosi di malattie genetiche. Una parte delle UVs possono essere deleterie a causa degli effetti che esercitano sullo splicing dell'mRNA. Il sistema del minigene ibrido è uno strumento rapido ed efficace per testare gli effetti delle mutazioni sullo splicing, ed è stato utilizzato per caratterizzare le varianti di numerosi geni, tra cui *BRCA1*, *BRCA2*, *CFTR* e *CHD7*⁵. Questa tecnica si basa sull'utilizzo di un vettore eucariotico in cui vengono clonati i frammenti genomici da analizzare. Il costrutto viene espresso in cellule umane e ne vengono studiati i trascritti.

Questa tecnica non richiede l'RNA del paziente, cosa che comporta una serie di vantaggi, inoltre la scarsa presenza o l'assenza di trascritto non rappresentano un limite. Infatti, diversi geni vengono espressi solamente in specifici tessuti, rendendone molto complicata l'analisi. Inoltre, lunghi trascritti di RNA, come quello di *NF1*, vanno incontro a splicing illegittimo se non vengono processati rapidamente in seguito all'estrazione. L'RNA implica delle difficoltà tecniche di conservazione: il processo di estrazione è più complicato rispetto al DNA e richiede di essere conservato a -80°C. Si consideri anche il rischio di contaminazione di

RNAsi durante la manipolazione del materiale biologico. I minigeni hanno anche un altro punto di forza: possono essere utilizzati per analizzare le mutazioni eterozigoti dal momento che permettono lo studio dello splicing di un mRNA che è stato generato da un singolo allele, ovvero quello clonato al loro interno. Questa capacità risulta particolarmente utile quando la variante ipomorfa oggetto di analisi permette la parziale produzione del trascritto *wild type* (fenomeno detto “*leakiness*”) oltre al trascritto il cui splicing è alterato. Le analisi standard che utilizzano il cDNA non sono in grado di distinguere tra i trascritti derivanti dall’allele *wild type* e i trascritti derivanti dall’allele mutato. Dato che questa casistica può avere conseguenze sul fenotipo, l’abilità del minigene di rilevare la *leakiness* è di grande importanza ⁵.

Il sistema del minigene ibrido presenta, tuttavia, alcuni limiti. Essendo un’analisi condotta in vitro, è possibile che non sia in grado di identificare alterazioni dello splicing tessuto-specifiche. Tuttavia, se nel minigene *wild type* si osserva che il trascritto viene processato in modo corretto, solitamente questo indica che il minigene contiene tutti gli elementi regolatori necessari per la normale maturazione dell’RNA. Quindi, eventuali alterazioni che si osservino nel minigene con la mutazione sono da attribuirsi molto probabilmente alla mutazione stessa. Il limite dato dal fatto che si tratta di una tecnica in vitro, quindi, è almeno parzialmente compensato dal confronto con il costrutto *wild type*. Un altro limite del sistema del minigene ibrido consiste nella possibilità che anche l’espressione del trascritto *wild type* risulti alterata, ad esempio a causa di fenomeni di *exon skipping* o di ritenzione dell’introne. Questo può succedere nel caso in cui la porzione intronica inserita nel minigene non contenga tutti gli elementi regolatori *cis* necessari al corretto splicing dei trascritti ⁵.

Gli studi di mutazione di pazienti affetti da malattie genetiche e gli studi di *screening* sulla popolazione presentano una grande quantità di varianti, delle quali molte dal significato clinico e biologico sconosciuti. Alcune di queste varianti hanno effetto sullo splicing dell’mRNA. La tecnica del minigene ibrido, con i

vantaggi e i limiti descritti, è un importante strumento perché dà indicazioni sull'effetto patogeno della variante analizzata.

IMMAGINI

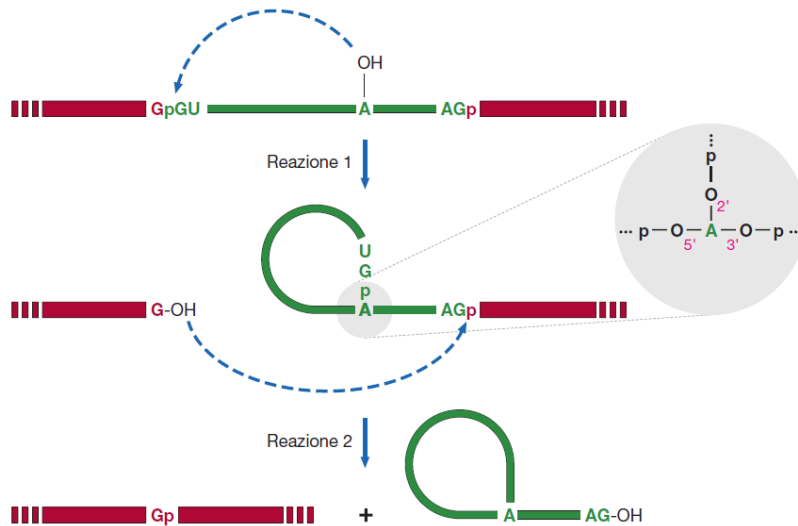


Figura 1. Le due reazioni di transesterificazione che hanno luogo nel processo di splicing. Le frecce tratteggiate indicano gli attacchi nucleofili, ed è evidenziato il ruolo del sito di ramificazione. I prodotti sono gli esoni concatenati e l'introne con struttura Lariat, che sarà eliminato².

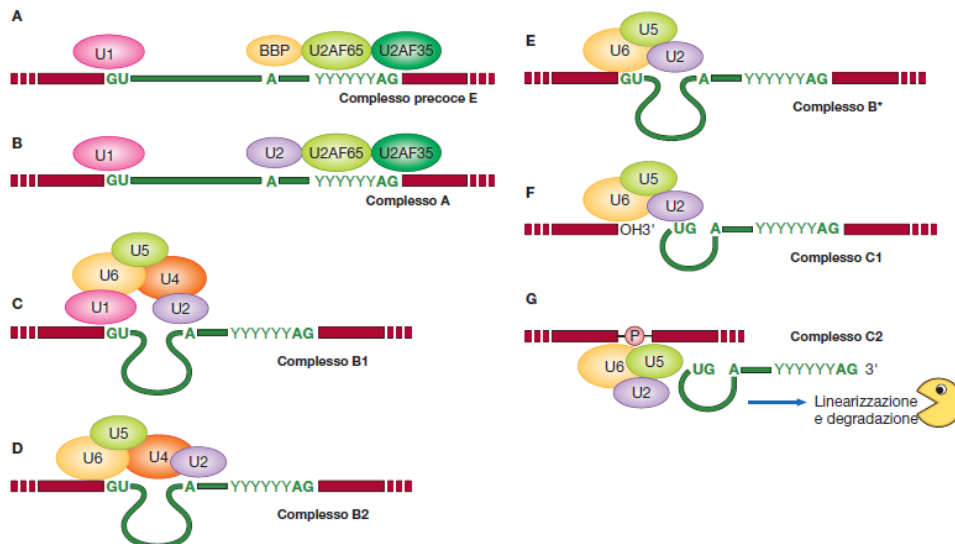


Figura 2. Il meccanismo d'azione dello spliceosoma².

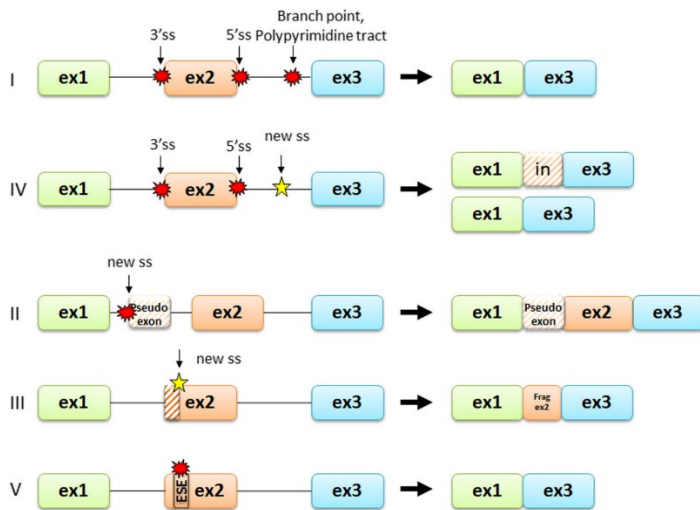


Figura 3. Le mutazioni che alterano lo splicing possono essere divise in cinque categorie: mutazioni dei siti di splicing canonici che portano a exon skipping (I), mutazioni introniche che formano nuovi siti di splicing (II), mutazioni esoniche che creano nuovi siti di splicing (III), mutazioni nei siti di splicing canonici che portano all'utilizzo di siti criptici di splicing (IV) e mutazioni che coinvolgono gli elementi regolatori (V) ⁴.

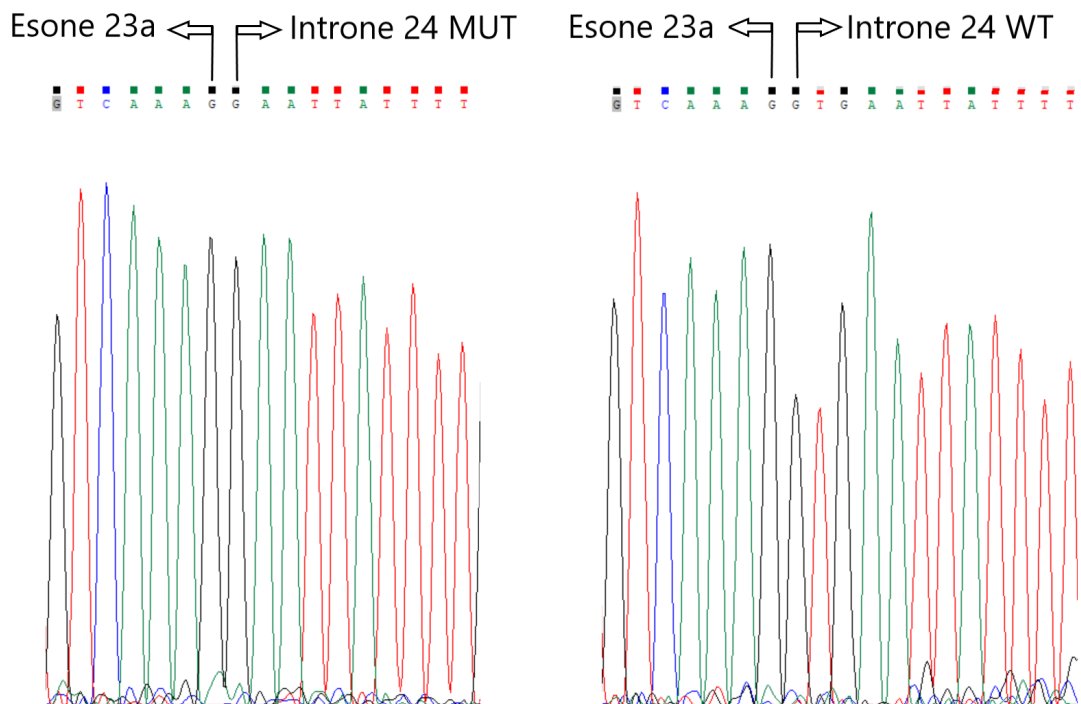


Figura 4. Fluorogramma WT e MUT della mutazione c.4332+2_4332+3delTTG

BIBLIOGRAFIA

1. Watson, J. *et al.* *Molecular Biology of the Gene*. (2013).
2. Amaldi, F., Benedetti, P., Pesole, G. & Plevani, P. *Biologia Molecolare*. (Casa Editrice Ambrosiana, 2018).
3. Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* vol. 3 285–298 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg775> (2002).
4. Anna, A. & Monika, G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of Applied Genetics* vol. 59 253–268 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7> (2018).
5. Morbidoni, V. *et al.* Hybrid minigene assay: An efficient tool to characterize mrna splicing profiles of nf1 variants. *Cancers (Basel)* **13**, 1–26 (2021).
6. Cooper, T. A. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods* **37**, 331–340 (2005).
7. Jett, K. & Friedman, J. M. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genetics in Medicine* vol. 12 1–11 Preprint at <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181bf15e3> (2010).
8. Boyd, K. P., Korf, B. R. & Theos, A. Neurofibromatosis type 1. *Journal of the American Academy of Dermatology* vol. 61 1–14 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.12.051> (2009).