

Relazione finale

Fruitore: Dott. Esposito Teresa

Proponente: Dott. Siani Alfonso

Titolo del programma:

Genetica dell'emicrania: analisi molecolare di un cluster di geni candidati X-linked (GABRE-GABRA3-GABRQ) in famiglie Australiane associate al cromosoma X

Obiettivo: l'obiettivo del progetto, è l'identificazione del gene di predisposizione all'emicrania associato al cromosoma X mediante l'analisi molecolare di un cluster di geni codificanti per 3 subunità del recettore inibitorio GABA-A, localizzati vicino al marcatore associato DXS1123. Lo studio verrà condotto su cinque famiglie Australiane affette da emicrania X-linked.

Presupposti

L'emicrania è una patologia neurovascolare complessa che colpisce il 15% della popolazione occidentale. Lo studio delle forme comuni di emicrania ha portato all'identificazione di differenti regioni genomiche di predisposizione tra cui una regione di suscettibilità sul cromosoma X (Xq24). L'obiettivo di questo progetto è l'identificazione di questo gene di predisposizione.

Lo studio è svolto in collaborazione con la Prof. Lyn Griffiths (Genomics Research Centre, Griffith University, Australia) che ha identificato la regione genomica di suscettibilità e che dispone delle uniche famiglie di emicrania associate al cromosoma X. Attraverso analisi bioinformatica della regione candidata abbiamo sviluppato una mappa trascrizionale della regione candidata selezionando in essa 19 geni: *GRIA3*, *FMR2*, *GPR50*, *GABRE*, *GABRA3*, *GABRQ*, *ATP2B3*, *SLC6A8*, *ABCD1*, *PLXNB3*, *L1CAM*, *MECP2*, *FLNA*, *ATP6AP1*, *GDI1*, *PLXNA3*, *F8*, *CLIC2*, *SYBL1*. Alcuni di questi geni sono stati precedentemente isolati dal nostro gruppo (D'Esposito et al. 1996; Esposito et al. 1997) e molti di essi sono stati oggetto di studi precedenti quale, ad esempio, lo studio che ci ha permesso di identificare il gene responsabile della Incontinentia Pigmenti di tipo 2 (Smahi et al. 2000).

La nostra attenzione si è focalizzata su un cluster di geni codificanti per 3 subunità del recettore inibitorio GABA-A localizzati vicino al marcatore più associato (DXS1123). I recettori GABA-A e i loro siti modulatori sembrano essere coinvolti nella patofisiologia dell'emicrania, soprattutto a livello del complesso trigemino-vascolare (Russo et al. 2005). Questo cluster di geni (*GABRE-GABRA3-GABRQ*) copre una regione genomica di circa 700 Mb; i geni *GABRE* and *GABRA3* sono trascritti in direzione centromerica, mentre il gene *GABRQ* è trascritto in direzione telomerica. Di grande interesse sono studi effettuati in ratto che sembrano dimostrare che queste tre subunità sono coesprese in specifiche regioni cerebrali, quali ad esempio il locus ceruleus, di cui è già noto un suo coinvolgimento nell'emicrania (Sinkkonen et al., 2000).

Sulla base di questi presupposti ipotizziamo che questi geni possano essere dei buoni candidati per l'emicrania. Pertanto prima della Short term mobility avevamo sequenziato la regione codificante e le regioni regolative dei tre geni in otto pazienti australiani di emicrania con aura portatori di un aplotipo di rischio per la patologia e in due individui di

controllo forniti dalla Prof.ssa Griffiths. Avevamo identificato diverse variazioni polimorfiche funzionali, sia nella regione codificante che nella regione regolativa, che possono alterare il livello o le attività delle proteine codificate, contribuendo allo sviluppo della patologia. I cambi più importanti da noi identificati sono: S102A, A193A e P437L nel gene *GABRE*; F478I nel gene *GABRQ*. Uno di questi cambi (P437L) nel gene *GABRE* è una variazione nuova non riportata in nessuna banca dati. Nelle regioni promotrici dei tre geni abbiamo identificato alcuni SNPs localizzati in siti di legame per fattori di trascrizione quali AP-4, GATA-1, GATA-2. Questi siti sono presenti in numerosi promotori per geni espressi in cellule neuronali, quindi noi ipotizziamo che essi possano eliminare il sito di legame per il fattore di trascrizione causando una alterazione dell'espressione del gene in esame.

Risultati attività svolta

L'attività svolta dal fruitore del progetto presso il laboratorio della Prof. L. Griffiths alla Griffith University Australia è stata la genotipizzazione di tre varianti nucleotidiche S102A, A193A e P437L nel gene *GABRE* in tutti gli individui delle famiglie australiane e nel caso-controllo Australiano (275 casi e 300 controlli).

La genotipizzazione delle tre varianti è stata effettuata mediante PCR-RFLP in quanto le tre varianti cambiano un sito di legame per enzimi di restrizione BglII, HpaII e AvaII rispettivamente. Il DNA dei pazienti e dei controlli è stato amplificato mediante PCR utilizzando le stesse coppie di primers utilizzate precedentemente per il sequenziamento degli esoni. Il prodotto di ciascuna amplificazione è stato sottoposto ad idrolisi enzimatica mediante lo specifico enzima di restrizione. L'analisi del pattern di digestione ha permesso di stabilire il genotipo di ciascun campione. Le frequenze dei genotipi e degli alleli per le tre varianti sono state confrontate mediante il test di analisi statistica del chi-quadro.

Come mostrato dalla tabella allegata le frequenze dei genotipi e degli alleli per le tre varianti nel gene *GABRE* non sembrano differire tra i casi e i controlli come anche dimostrato dai valori di chi-quadro che non danno significatività statistica. L'analisi statistica di linkage genetico e lo studio degli aplotipi è ancora in corso nel laboratorio della Prof. Griffiths.

La presenza della Dott. Esposito presso il laboratorio della Prof. Griffiths ha permesso di consolidare la collaborazione scientifica tra i due gruppi. La Prof. Griffiths ha fornito alla Dott. Esposito tutti i DNA delle 5 famiglie associate al cromosoma X che al momento sono condivise tra i due gruppi. Questo consente alla Dott. Esposito di continuare lo studio di altri geni e varianti del cromosoma X in Italia in stretta collaborazione del gruppo australiano.

1-Distribution of the GABRE gene exon 3 mutation (Ser102Ala) in migraineurs and controls of original sample (MO migraine without aura, MA migraine with aura).

Group	N (alleles)	Alleles		Genotypes		
		G	T	GG	TG	TT
Migraine 24 (12.5%)	384	282 (73.4%)	102 (26.6%)	114 (59.3%)	54 (28.2%)	
Male	112	84 (75%)	28 (25%)			
Female	272	198 (73%)	74 (27%)	72 (53%)	54 (39.7%)	10
(7.3%)						
MA (7.8%)	254	194 (76.4%)	60 (23.6%)	77 (60.6%)	40 (31.5%)	10
MO (21.5%)	130	88 (67.7%)	42 (32.3%)	37 (57%)	14 (21.5%)	14
Control (11.2%)	374	285 (76.2%)	89 (23%)	119 (63.6%)	47 (25.1%)	21
Male	90	60 (67%)	30 (33%)			
Female	284	225 (79.2%)	59 (20.8%)	89 (62.6%)	47 (33 %)	6 (4.4 %)

Total Case Vs Control $\chi^2 = 0.33$ $p = 0.56$ $\chi^2 = 0.73$ $p = 0.695$

Subtype MA vs cont: $\chi^2 = 0.00$ $p = 0.99$

$\chi^2 = 2.09$ $p = 0.35$

MO vs cont: $\chi^2 = 3.63$ $p = 0.06$

$\chi^2 = 4.3$ $p = 0.11$

Female Mig vs cont: $\chi^2 = 3.16$ $p = 0.07$

$\chi^2 = 3.15$ $p = 0.21$

Male Mig vs cont: $\chi^2 = 1.69$ $p = 0.19$

2-Distribution of the GABRE gene exon 5 mutation (Ala 193Ala) in migraineurs and controls of original sample (MO migraine without aura, MA migraine with aura) in MAP I and MAP II.

MAPI	N (alleles)	Alleles		Genotypes			
		T	C	TT	TC		
Group CC							
Migraine (84.2%)	332	34 (10.3%)	298 (89.7%)	177	6 (3.4%)	22 (12.4%)	149
Male	92	10 (10.9%)	82 (89.1%)				
Female	262	24 (91.2%)	238 (90.8%)	131	1 (0.8%)	22 (15.6%)	108 (82.4%)
MA (84.3%)	204	19 (9.3%)	185 (90.7%)	102	3 (2.9%)	13 (12.8%)	86
MO (82.9%)	152	16 (10.5%)	136 (89.5%)	76	3 (3.9%)	10 (13.2%)	63
Control	374	45 (12%)	329 (88%)	187	10 (5.3%)	25 (13.4%)	152 (81.3%)
Male	104	12 (11.5%)	92 (88.5%)				
Female	270	33 (12.2%)	237 (87.8%)	135	4 (3%)	25 (18.5%)	106 (78.5%)
Total Case Vs Control		$\chi^2 = 0.57$	$P = 0.45$	$\chi^2 = 0.95$ $P = 0.62$			
Subtype MA vs cont:		$\chi^2 = 0.99$	$P = 0.32$	$\chi^2 = 0.92$ $P = 0.62$			
MO vs cont:		$\chi^2 = 0.24$	$P = 0.62$	$\chi^2 = 0.23$ $P = 0.89$			
Female Mig vs cont:		$\chi^2 = 1.30$	$P = 0.25$	$\chi^2 = 1.95$ $P = 0.38$			

Male Mig vs cont: $\chi^2 = 0.02$ $P = 0.88$

MAPII Group CC	N (alleles)	Alleles			Genotypes		
		T	C		TT	TC	
Migraine (76.8%)	510	64 (12.6%)	446 (87.4%)	255	5 (2 %)	54 (21.2%)	196
Male	72	6 (8.3%)	66 (91.7%)				
Female	438	58 (13.2%)	380 (86.8%)	219	2 (0.9%)	54 (24.7%)	163 (74.4%)
MA (77.8%)	424	50 (11.8%)	374 (88.2%)	212	3 (1.4%)	44 (20.8%)	165
MO (72%)	152	14 (10.5%)	72 (89.5%)	43	2 (4.7%)	10 (23.3%)	31
Control	564	63 (11.1%)	501 (89.9%)	282	9 (3.2%)	45 (16%)	228 (80.8%)
Male	84	8 (9.5%)	76 (90.5%)				
Female	478	53 (11.1%)	425 (88.9%)	239	4 (9.5%)	45 (18.8%)	190 (79.2%)

Total Case Vs Control $\chi^2 = 0.49$ $P = 0.48$ $\chi^2 = 3.03$ $P = 0.22$

Subtype MA vs cont: $\chi^2 = 0.09$ $P = 0.76$

$\chi^2 = 3.26$ $P = 0.20$

MO vs cont: $\chi^2 = 1.87$ $P = 0.17$

$\chi^2 = 1.77$ $P = 0.41$

Female Mig vs cont: $\chi^2 = 0.95$ $P = 0.33$

$\chi^2 = 3.21$ $P = 0.20$

Male Mig vs cont: $\chi^2 = 0.07$ $P = 0.80$

4-Distribution of the GABRE gene exon 9 mutation (Pro437Leu) in migraineurs and controls of original sample (MO migraine without aura, MA migraine with aura).

Group	N (alleles)	Alleles		Genotypes		
		T	C	TT	TC	CC
Migraine (91.8%)	316	20 (6.3%)	296 (93.7%)	7 (4.4%)	6 (3.8%)	145
Male	88	6 (6.8%)	82 (93.2%)			
Female (91.2%)	228	14 (6.1%)	214 (93.9%)	4 (3.5%)	6 (5.3%)	104
MA (94%)	198	9 (4.5%)	189 (95.5%)	3 (3%)	3 (3%)	93
MO (88.1%)	118	11 (9.3%)	107 (90.7%)	4 (6.8%)	3 (5.1%)	52
Control (88.6%)	280	23 (8.2%)	257 (91.8%)	7 (5%)	9 (6.4%)	124
Male	80	4 (5%)	76 (95%)			
Female	200	19 (9.5%)	181 (90.5%)	5 (5%)	9 (9%)	86 (86 %)
Total Case Vs Control		$\chi^2 = 0.79$ $P = 0.37$		$\chi^2 = 1.16$ $P = 0.56$		

Subtype MA vs cont:

$\chi^2 = 2.50$ $P = 0.11$

$\chi^2 = 2.06$ $P = 0.36$

MO vs cont: $\chi^2 = 0.13$ $P = 0.72$

$\chi^2 = 0.36$ $P = 0.83$

Female Mig vs cont: $\chi^2 = 1.69$ $P = 0.19$

$\chi^2 = 1.51$ $P = 0.47$

Male Mig vs cont: $\chi^2 = 0.25$ $P = 0.62$

Firma del Proponente

Dr Alfonso Siani