

Genetica della sindrome da ipoventilazione centrale congenita: 15 anni di ricerca e di diagnostica a Genova



Isabella Ceccherini
UOC Genetica Medica
IRCCS Istituto G Gaslini
Genova





❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**

- **Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS**
- **Correlazione genotipo-fenotipo**

❑ **Ricorrenza intrafamiliarità di CCHS**

- **Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS**
- **Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B**

❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**

❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**



Ondine, by John William Waterhouse
(1872)

- ❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**
 - Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS
 - Correlazione genotipo-fenotipo
- ❑ **Ricorrenza intrafamiliarità di CCHS**
 - Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS
 - Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B
- ❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**
- ❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**



❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**

- **Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS**
- **Correlazione genotipo-fenotipo**

❑ **Ricorrenza intrafamiliarità di CCHS**

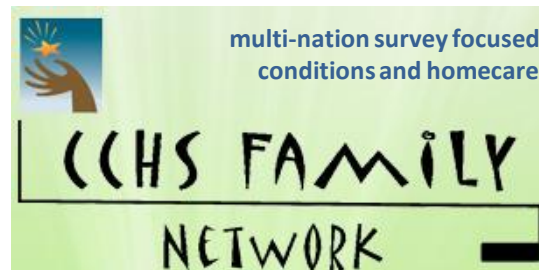
- **Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS**
- **Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B**

❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**

❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**

Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)

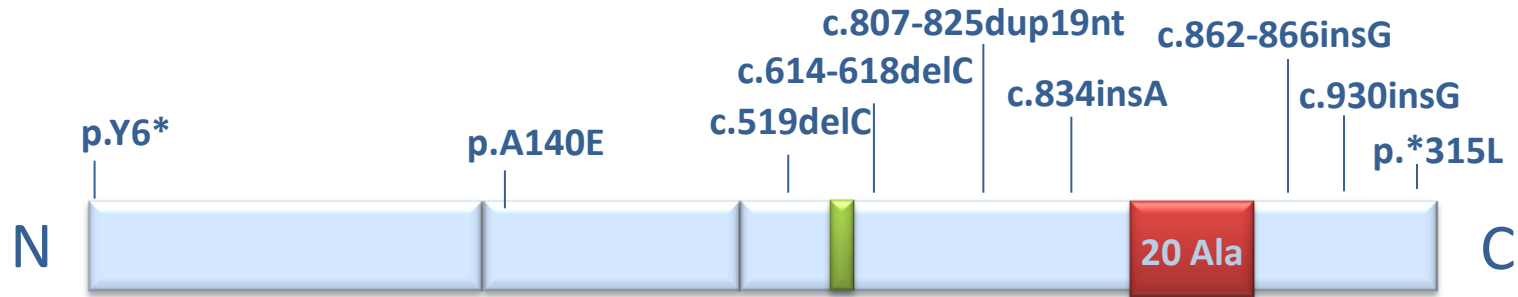
Disordine molto raro caratterizzato dall'assenza di un adeguato controllo della respirazione durante il sonno e dovuto a diminuita sensibilità all'ipossia ed all'ipercapnia



Frequency	1 / 200.000
Females	51%
Males	49%
TRACHEOTOMY	48%
MASK VENTILATION	34%
DIAPHRAGMATIC PACING	18%
24 hrs ventilatory support	8%

Mary Vanderlaan et al.,
CCHS Family Network
Ped Pulmon 37:217-229 (2004)

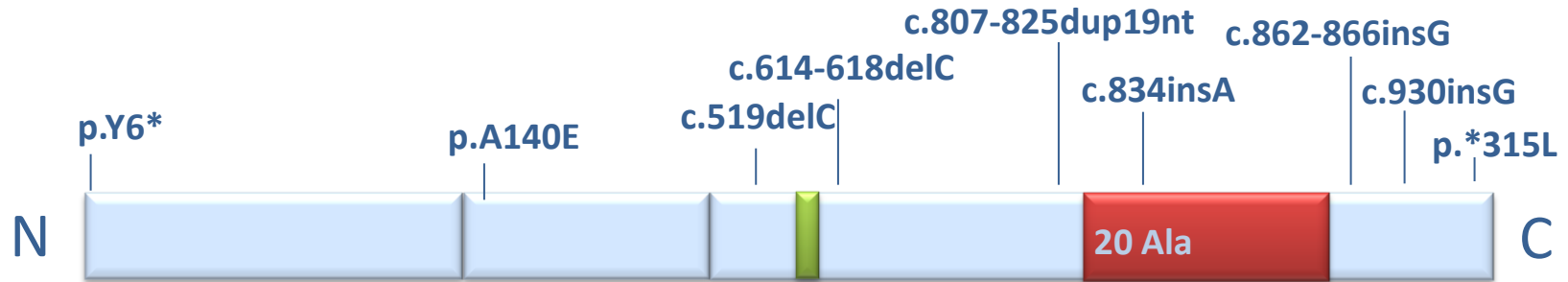
mutazioni PHOX2B associate a CHS



Dimostrata ereditarietà autosomica
dominante con penetranza ridotta, in
associazione a mutazioni specifiche del
gene PHOX2B in >90% dei pazienti

Amiel et al., Nat Genet 2003
Sasaki et al., Hum Genet 2003
Weese-Mayer et al., Am J Hum Genet 2003
Matera et al., J Med Genet 2004

mutazioni PHOX2B associate a CCHS



**Dimostrata ereditarietà autosomica
dominante con penetranza ridotta, in
associazione a mutazioni specifiche del
gene PHOX2B in >90% dei pazienti**

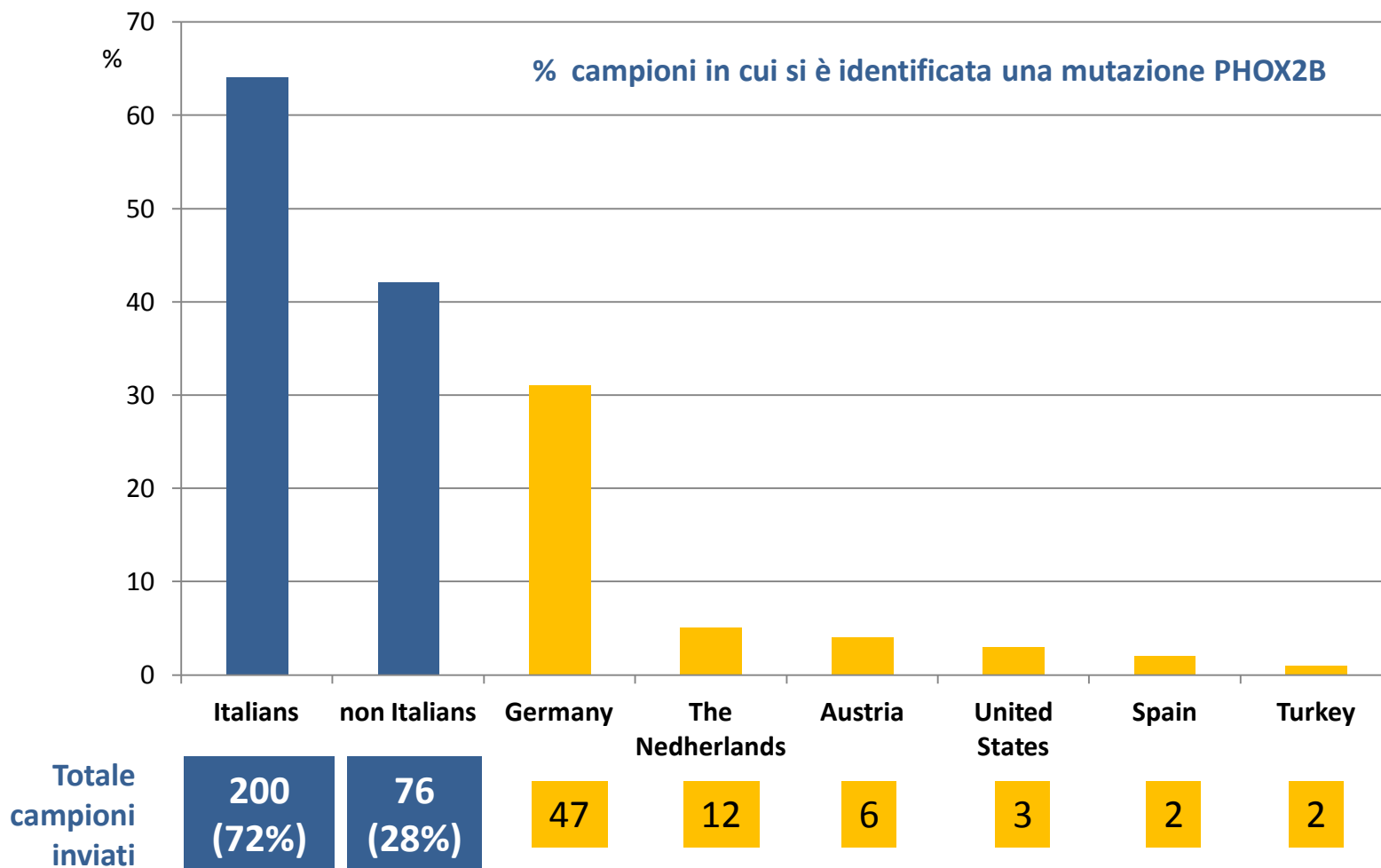
Espansioni poliAla derivano da duplicazioni “in
frame” di lunghezza variabile che avvengono in un
tratto codificante 20 residui Alanina e dunque
ricco nel di-nucleotide GC

+5 Ala
+6 Ala
+7 Ala
+9 Ala
+11 Ala
+12 Ala
+13 Ala

Amiel et al., Nat Genet 2003
Sasaki et al., Hum Genet 2003
Weese-Mayer et al., Am J Hum Genet 2003
Matera et al., J Med Genet 2004

Aggiornamento mutazioni PHOX2B

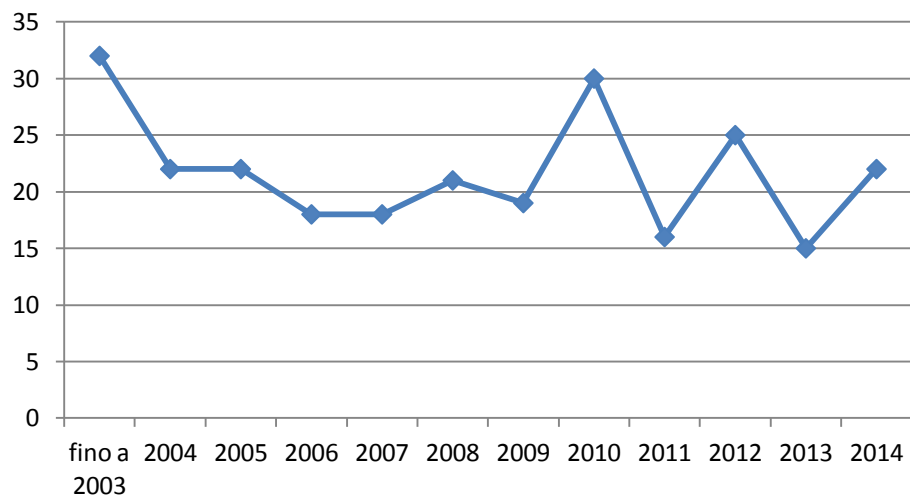
276 pazienti analizzati ad oggi a Genova



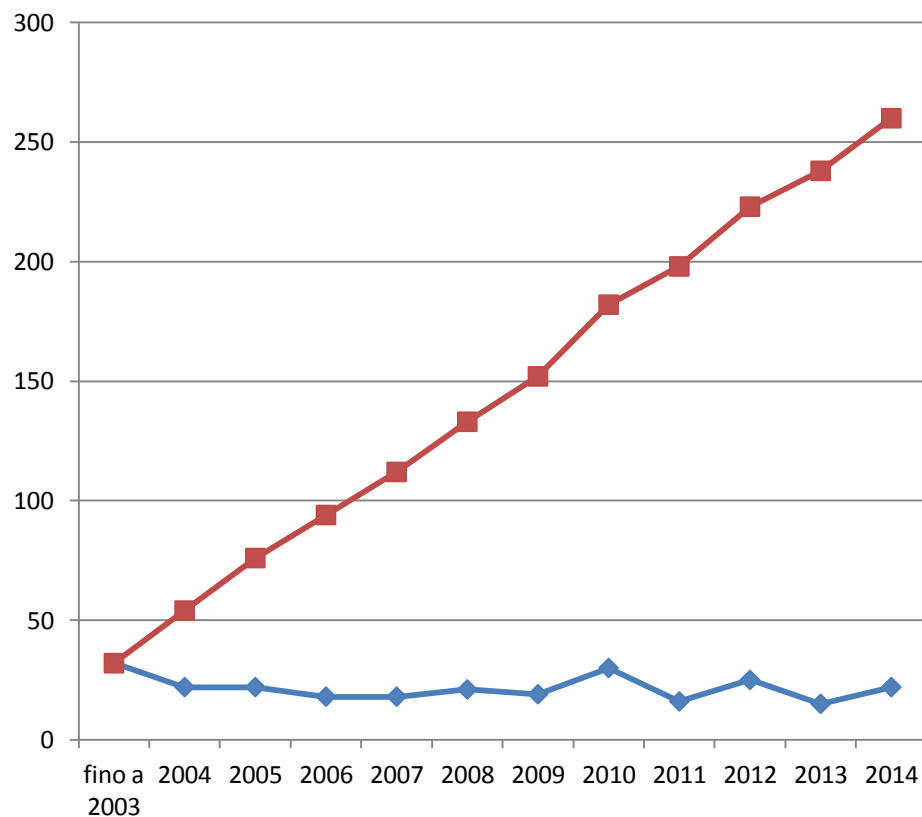
Aggiornamento mutazioni PHOX2B

276 pazienti analizzati ad oggi a Genova

Pazienti reclutati/anno



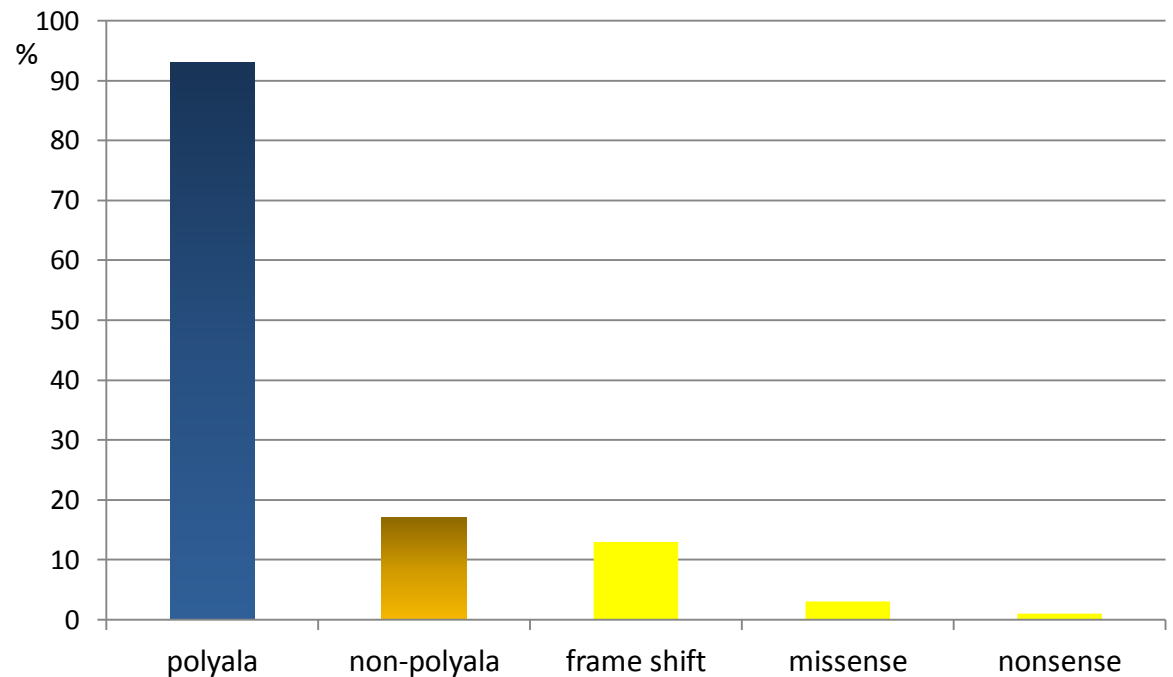
Andamento temporale del totale pazienti



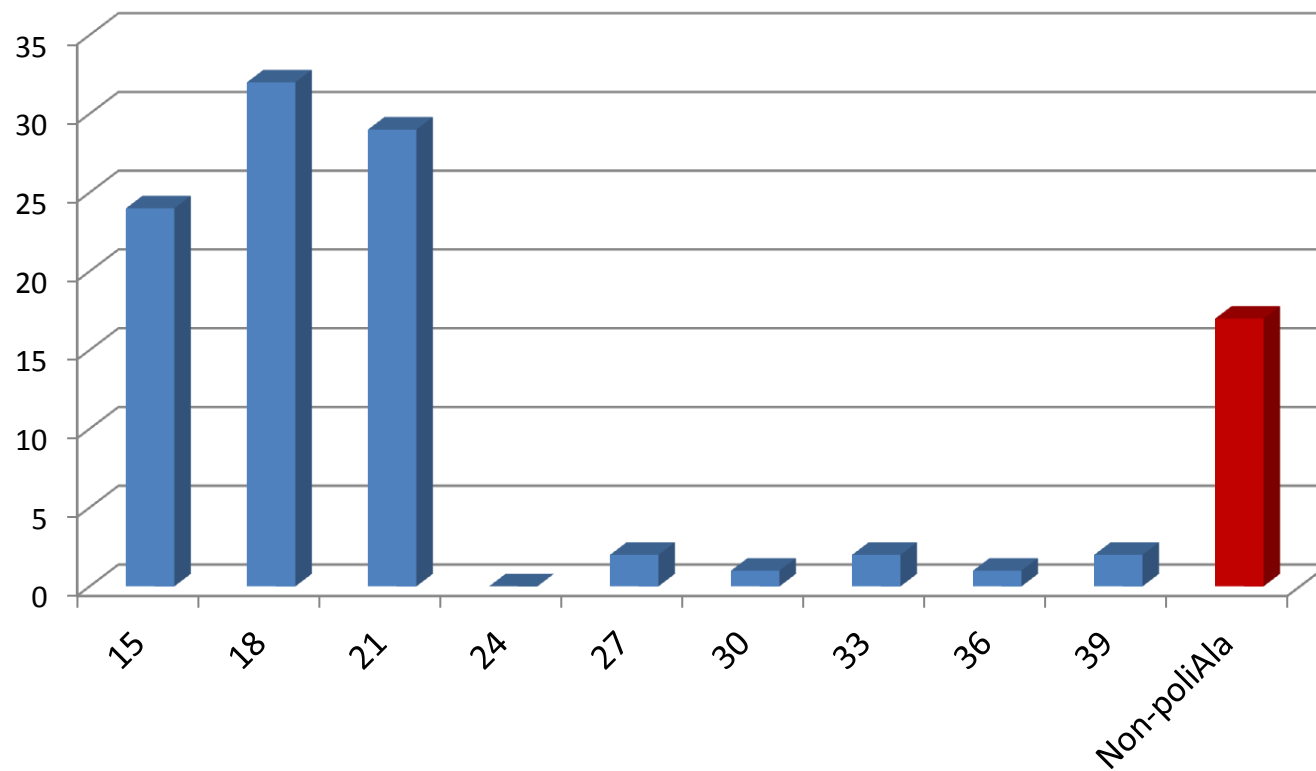
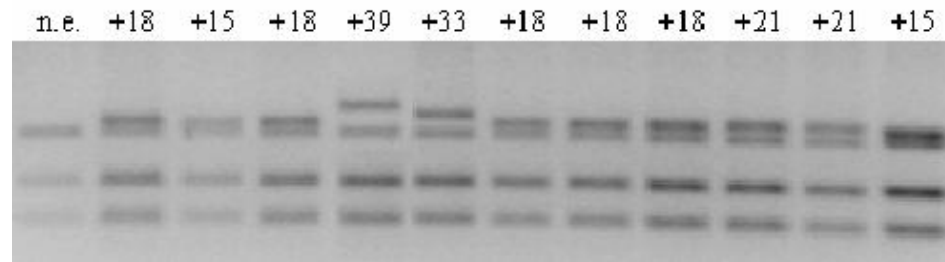
Aggiornamento mutazioni PHOX2B

276 pazienti analizzati ad oggi a Genova

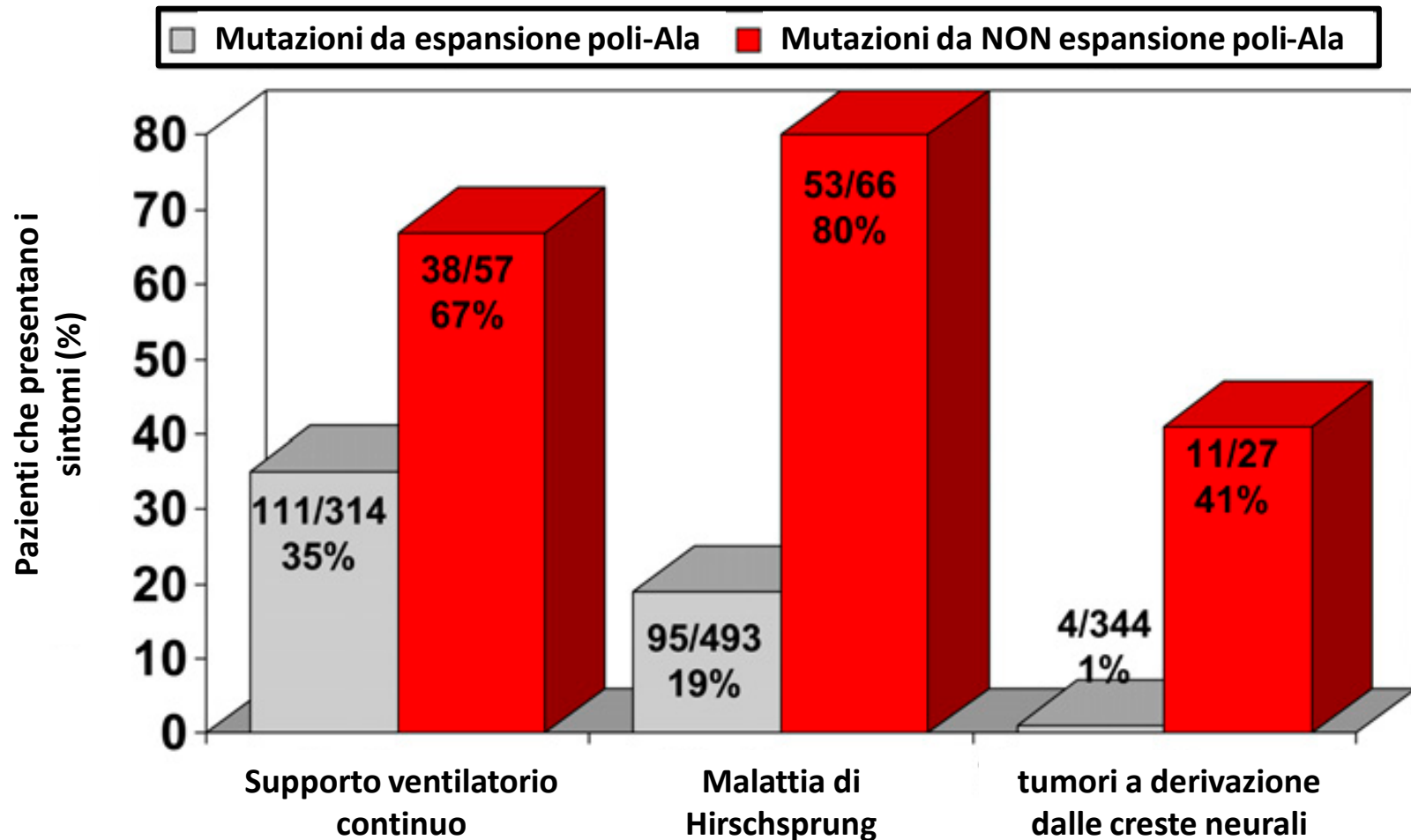
Senza mutazioni PHOX2B	166
Con mutazioni PHOX2B	110
polyAla	93
non polyAla	17
frameshift	13
missense	3
nonsense	1



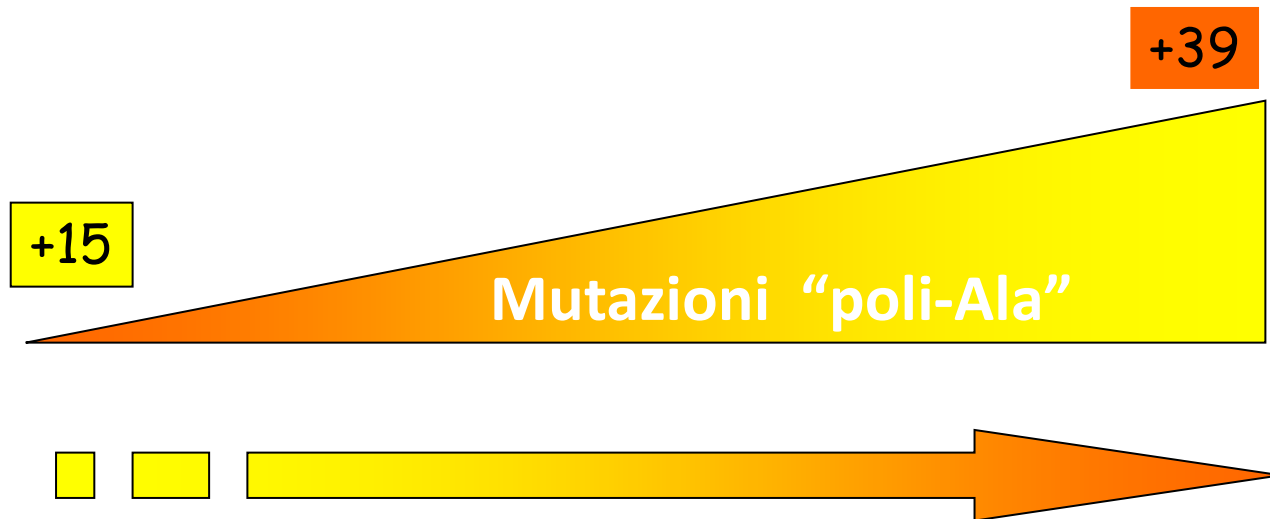
Analisi di mutazioni di PHOX2B in CCHS



Correlazione genotipo-fenotipo



Correlazione genotipo-fenotipo



Ipoventilazione solo durante il sonno

insorgenza tardiva piuttosto frequente

Sintomi intestinali associati sono di lieve entità

Ipoventilazione anche durante le ore diurne

Insorgenza della malattia non ritarda mai

Frequente associazione con la malattia di Hirschsprung

Mutazioni "frameshift"

Ipoventilazione variabile

Insorgenza ritardata molto rara

Frequente associazione con Neuroblastoma



❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**

- **Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS**
- **Correlazione genotipo-fenotipo**

❑ **Ricorrenza intrafamiliare di CCHS**

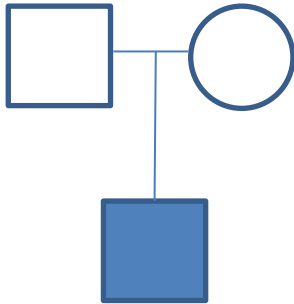
- **Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS**
- **Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B**

❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**

❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**

Ricorrenza di CCHS

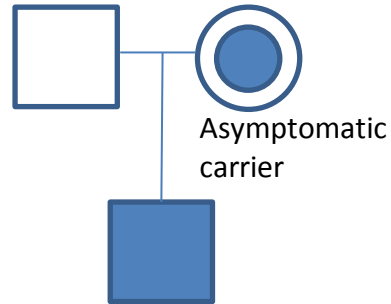
sporadica



de novo

Nessun rischio di ricorrenza*

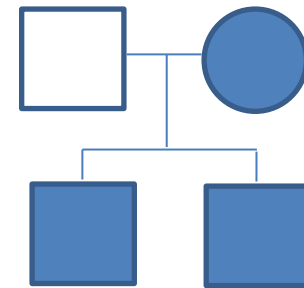
sporadica



ereditata

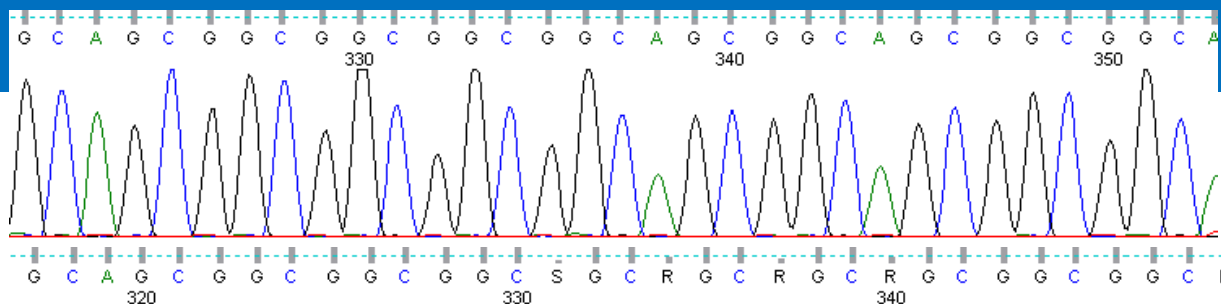
Rischio di ricorrenza $\leq 50\%$

familiare

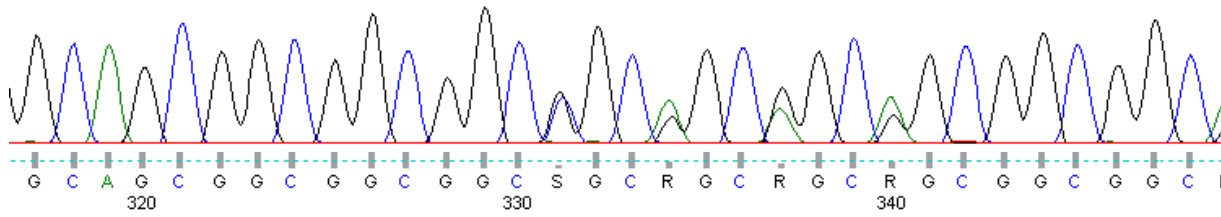


ereditata

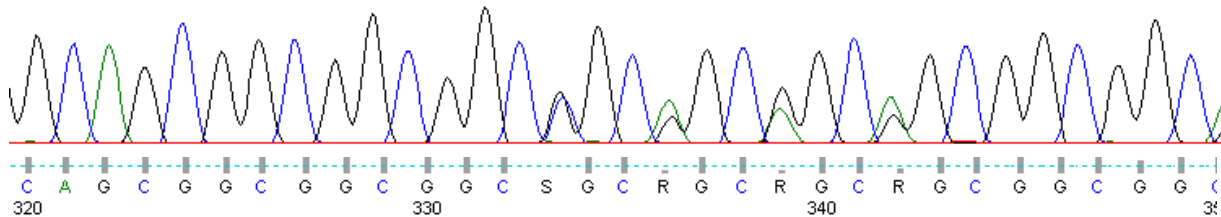
Analisi di genitori di pazienti portatori di mutazioni da espansione di poli-Ala di PHOX2B



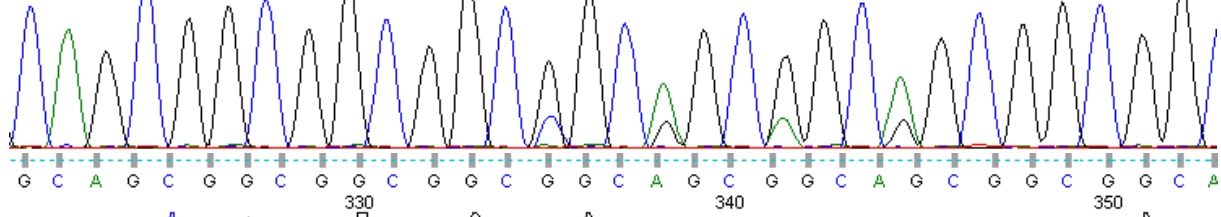
Controllo, NO MUT



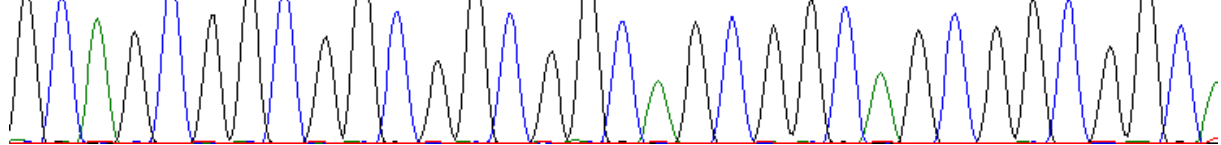
Paziente portatore di mutazione PHOX2B +18bp (+6Ala)



Genitore portatore di mutazione costitutiva PHOX2B +18bp (+6Ala)



Genitore portatore di mutazione PHOX2B a mosaico +18bp (+6Ala)



Genitore non portatore della mutazione PHOX2B presente nel figlio CCHS

Parental Origin and Somatic Mosaicism of PHOX2B Mutations in Congenital Central Hypoventilation Syndrome

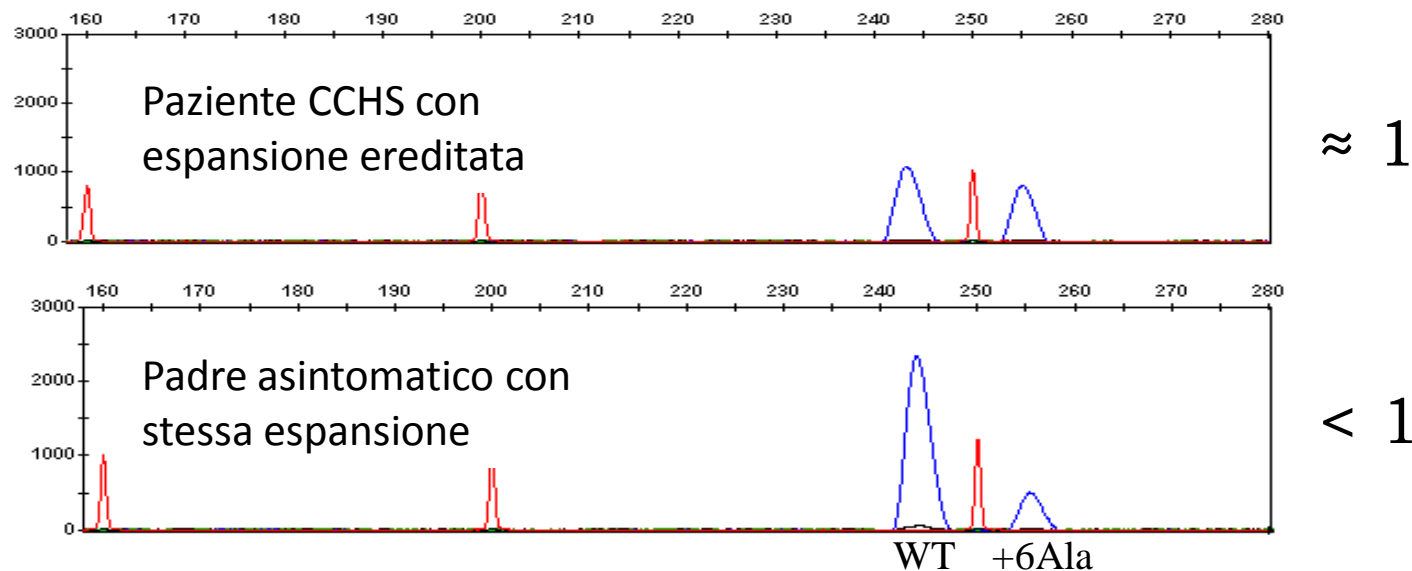
Sara Parodi^{1,2}, Tiziana Bachetti¹, Francesca Lantieri^{1,3}, Marco Di Duca⁴, Giuseppe Santamaria¹, Giancarlo Ottonello⁵, Ivana Matera^{1,5}, Roberto Ravazzolo^{1,2}, and Isabella Ceccherini¹

Analisi del possibile mosaicismismo somatico in genitori apparentemente NON portatori dell'espansione di poli-Ala di PHOX2B presente nel figlio CCHS

- frammento di 258bp contenente la ripetizione poli-Ala amplificato da DNA genomico
- uno dei due primers marcato con fluorocromo FAM
- prodotto di amplificazione caricato su sequenziatore automatico di DNA

allele espanso (E)

 allele normale (N)



Mosaicismo somatico in genitori di pazienti con espansioni PHOX2B

J Mol Med (2011) 89:505–513
DOI 10.1007/s00109-010-0718-y

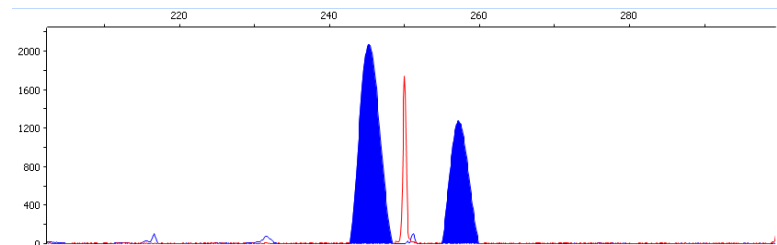
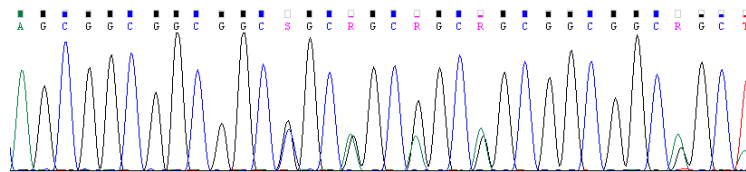
ORIGINAL ARTICLE

Low amounts of *PHOX2B* expanded alleles in asymptomatic parents suggest unsuspected recurrence risk in congenital central hypoventilation syndrome

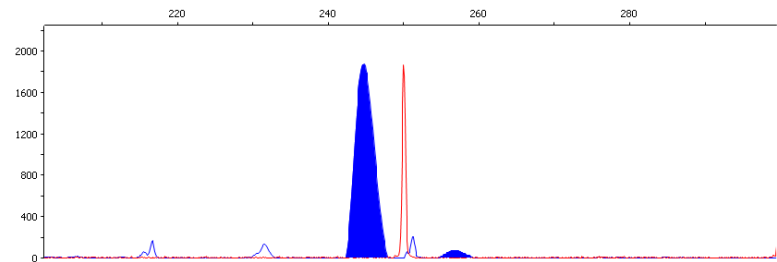
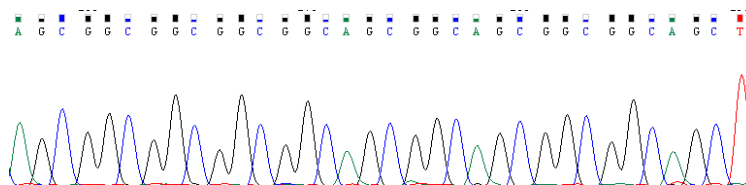
Tiziana Bachetti · Sara Parodi · Marco Di Duca ·
Giuseppe Santamaria · Roberto Ravazzolo ·
Isabella Ceccherini

Rivalutate le coppie di genitori risultati NON mutati tramite metodo “Sanger”

affetto

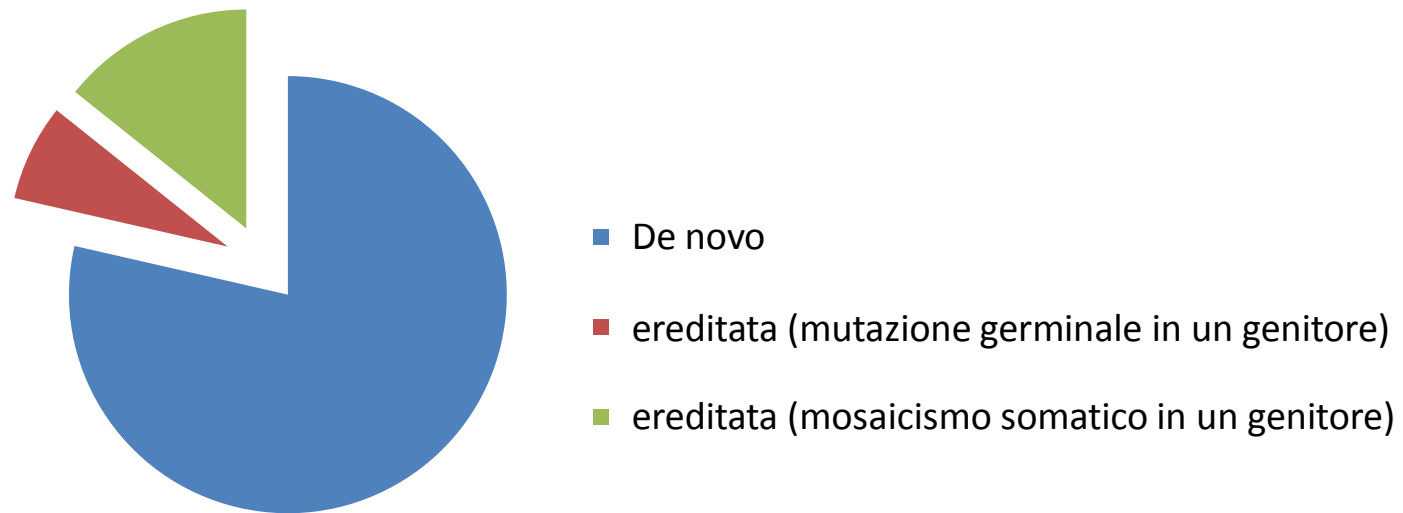


Genitore
asintomatico



≈ 25% delle mutazioni poli-Ala di PHOX2B che si presentano in un paziente sono ereditate da un genitore portatore costitutivo o a mosaico, per lo più asintomatico

Come si verifica la circostanza di una mutazione PHOX2B di tipo poli-Ala in un paziente



≥ 75% di mutazioni poli-Ala insorgono *de novo*

≈ 10% sono ereditate da un genitore portatore della mutazione a livello germinale (costitutivo)

≈ 15% sono ereditate da un genitore che è un mosaico somatico (e dunque germinale) per la mutazione

Penetranza delle espansioni poli-Ala germinali e a mosaico di PHOX2B

HUMAN MUTATION Mutation in Brief #987 (2007) Online

MUTATION IN BRIEF

Parental Origin and Somatic Mosaicism of PHOX2B Mutations in Congenital Central Hypoventilation Syndrome

Sara Parodi^{1,2}, Tiziana Bachetti¹, Francesca Lanfieri^{1,3}, Marco Di Duca¹, Giuseppe Santamaria¹, Giancarlo Ottonello², Ivana Matera^{1,4}, Roberto Ravazzolo^{1,2}, and Isabella Ceccherini¹

	+5Ala	> +5Ala
Mutazione germinale	Può essere asintomatica (penetranza ridotta)	affetto (penetranza completa)
Mosaicismo somatico (e germinale)	asintomatico	Riportati rari casi con sintomi lievi

Analisi molecolare di PHOX2B

American Thoracic Society Documents

An Official ATS Clinical Policy Statement: Congenital Central Hypoventilation Syndrome Genetic Basis, Diagnosis, and Management

Debra E. Weese-Mayer, Elizabeth M. Berry-Kravis, Isabella Ceccherini, Thomas G. Keens, Darius A. Loghmanee, and Ha Trang, on behalf of the ATS Congenital Central Hypoventilation Syndrome Subcommittee

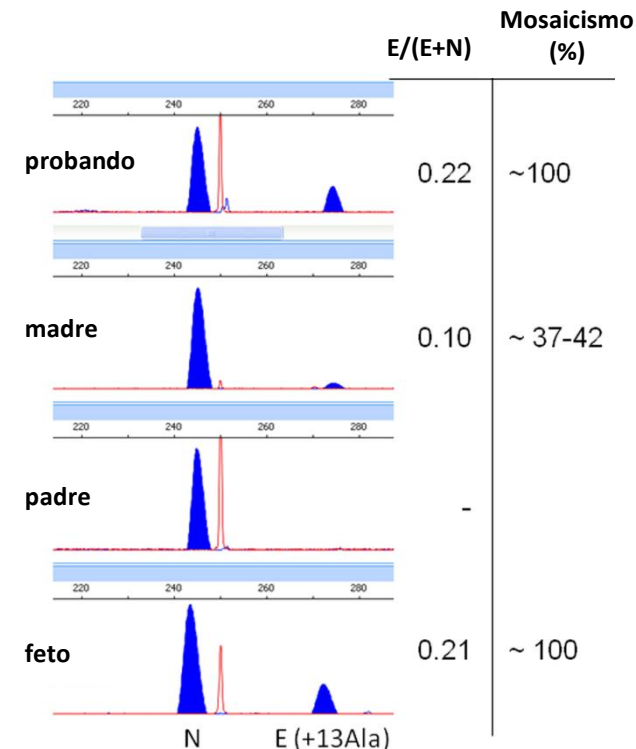
THIS OFFICIAL CLINICAL POLICY STATEMENT OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS) WAS APPROVED BY THE ATS BOARD OF DIRECTORS SEPTEMBER 2009.

Permette di:

- effettuare diagnosi tempestive
- valutare il rischio di ricorrenza della malattia
- predire il grado di gravità dei sintomi respiratori e la possibile presenza di quelli associati

Può essere applicata:

- per sostituire la diagnosi clinica differenziale
- ai parenti a rischio di pazienti già diagnosticati
- diagnosi prenatale





Ondine, by John William Waterhouse
(1872)

- ❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**
 - Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS
 - Correlazione genotipo-fenotipo
- ❑ **Ricorrenza intrafamiliarità di CCHS**
 - Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS
 - Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B
- ❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**
- ❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**

Effetto di espansioni poli-Ala di PHOX2B e di mutazioni frameshift

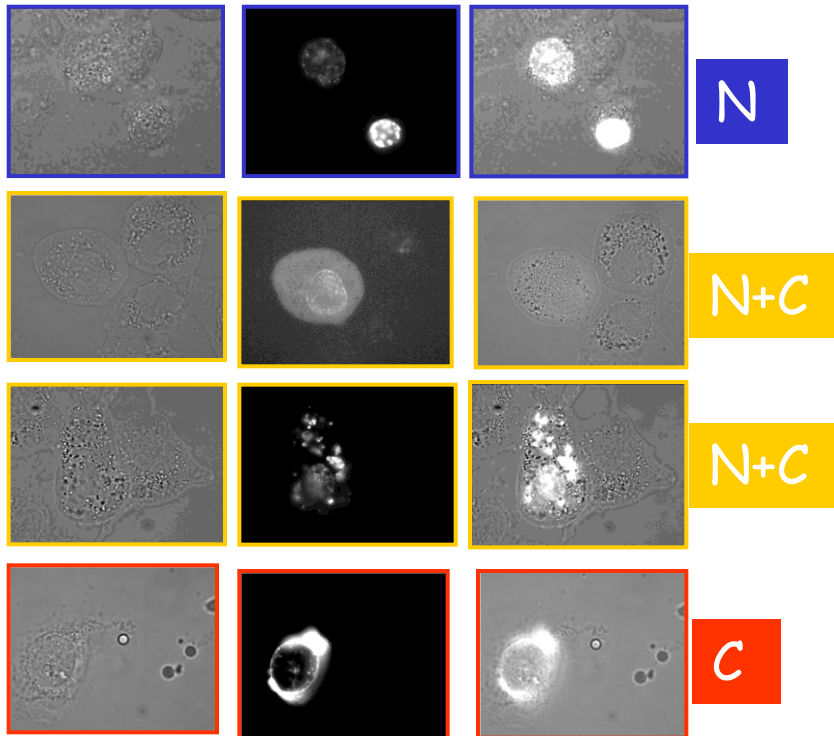
La correlazione tra lunghezza dell'espansione poli-Ala e la gravità del fenotipo CCHS confermata in cellule che esprimono PHOX2B

Distinct pathogenetic mechanisms for *PHOX2B* associated polyalanine expansions and frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome

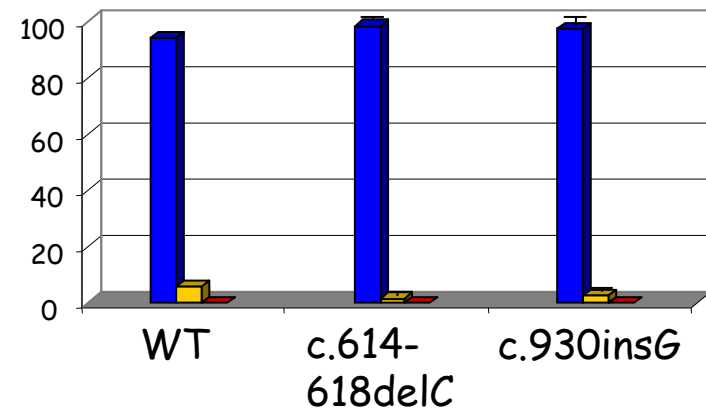
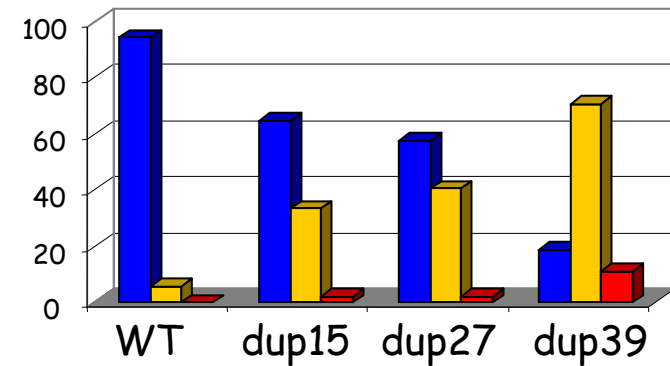
Tiziana Bachetti¹, Ivana Matera^{1,1}, Silvia Borghini¹, Marco Di Duca^{1,2}, Roberto Ravazzolo^{1,3} and Isabella Ceccherini^{1,*}

¹Laboratorio di Genetica Molecolare and ²Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy and ³Dipartimento di Pediatria e CEBR, Università di Genova, Genova, Italy

Received February 23, 2005; Revised April 18, 2005; Accepted May 5, 2005



Retenzione lunghezza-dipendente di aggregati sia dentro il nucleo che nel citoplasma di cellule che esprimono PHOX2B espanso, fuso ad una proteina fluorescente



Nessuna ritenzione citoplasmatica osservata per le mutazioni frame-shift analizzate

Risposta cellulare alle espansioni di PHOX2B

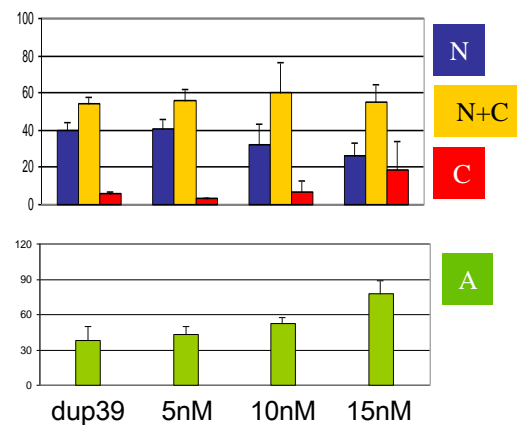
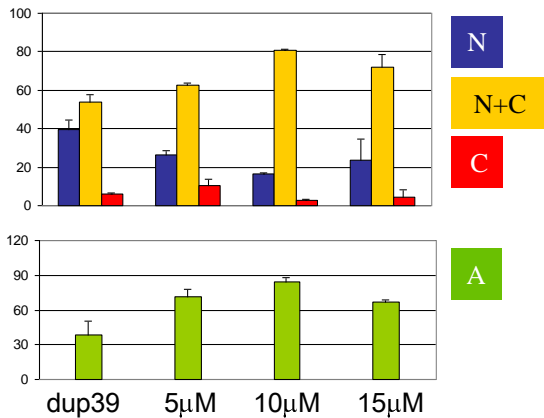
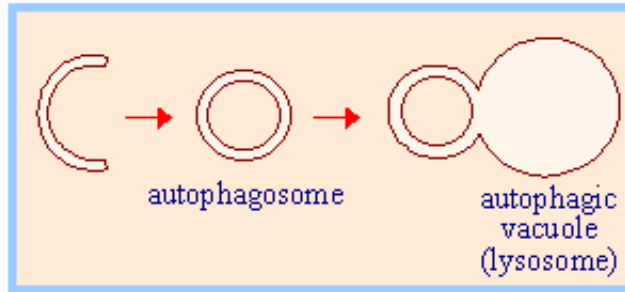
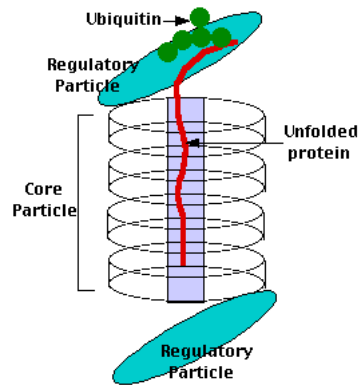
1. Ruolo dei due principali sistemi di degradazione delle proteine

Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)

(inibitore: lactacistina)

Autofagia

(inibitore: 3-MA)



L'inibizione dell'UPS e dell'autofagia conducono ad un'aggregazione extranucleare dose-dipendente della proteina espansa PHOX2B dup39 (+13Ala)

Available online at www.sciencedirect.com
 ScienceDirect
 The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 (2007) 327–339
 www.elsevier.com/locate/ijbc

IJBCB

Geldanamycin promotes nuclear localisation and clearance of PHOX2B misfolded proteins containing polyalanine expansions

Tiziana Bachetti^a, Paola Bocca^b, Silvia Borghini^a, Ivana Matera^{a,1}, Ignazia Prigione^b, Roberto Ravazzolo^{a,c}, Isabella Ceccherini^{a,*}

^a Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giussani Gaslini, Largo G. Gaslini 5, 16148 Genova, Italy
^b Laboratorio di Oncologia, Istituto Giussani Gaslini, Largo G. Gaslini 5, 16148 Genova, Italy
^c Dipartimento di Pediatria e CEER, Università degli Studi di Genova, 16148 Genova, Italy

Received 30 May 2006; received in revised form 17 August 2006; accepted 18 August 2006
 Available online 14 September 2006

Risposta cellulare alle espansioni di PHOX2B

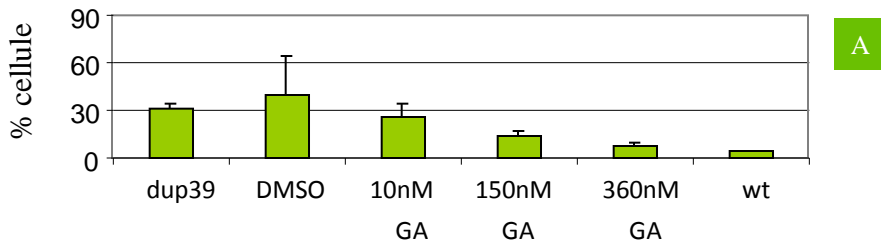
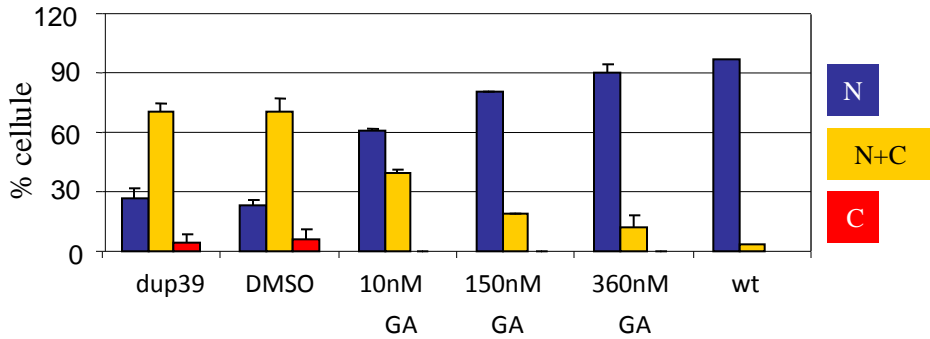
2. Effetto della risposta HS sulla rimozione degli aggregati



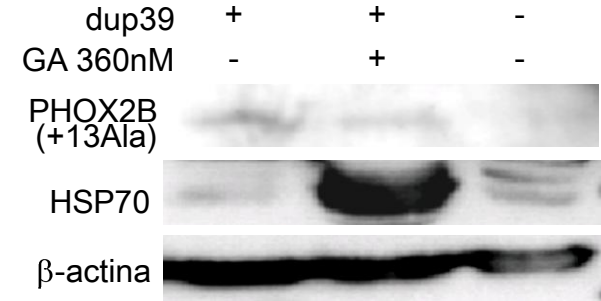
Geldanamycin (GA)

refolding

Eliminazione mediata da UPS



HSP70



Aumento dose dipendente della localizzazione nucleare, e diminuzione della presenza di aggregati, della proteina +13Ala (33 Ala) rispetto a quella selvatica (20 Ala)

Effetto di farmaci in cellule che esprimono PHOX2B +39Ala

HSPs inducers

- 17-AAG
- IBUPROFEN
- CURCUMIN

β-sheet interactors

- CONGO RED
- CHRYSAMINE G
- CURCUMIN

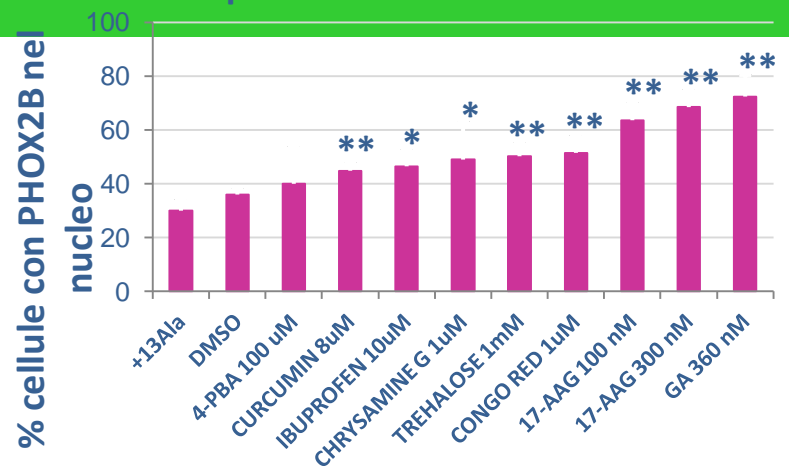
HDAC

4-PHENYLBUTYRATE

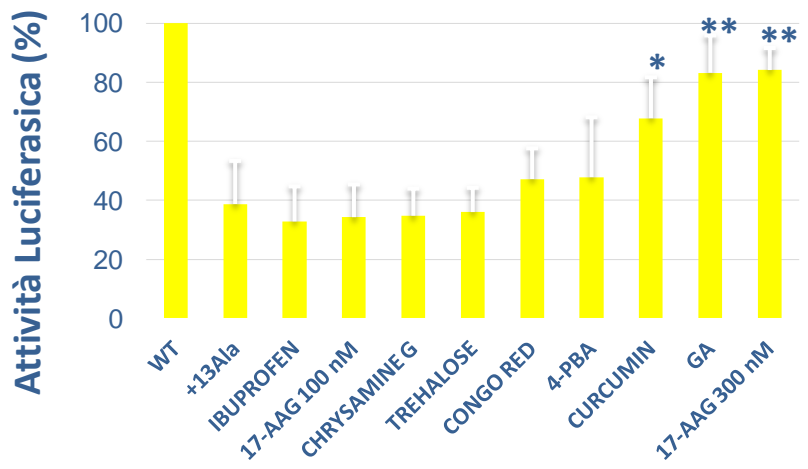
Chemical Chaperons

TREHALOSE

Recupero corretta localizzazione nucleare



Recupero dell'attività trascrizionale



17AAG e CURCUMIN sono risultate tra le molecole più efficaci a contrastare la formazione degli aggregati indotti da poli-Ala, recuperare l'attività trascrizionale di PHOX2B e indurre la via autofagica



Screening di una collezione di farmaci?



❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**

- Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS
- Correlazione genotipo-fenotipo

❑ **Ricorrenza intrafamiliare di CCHS**

- Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS
- Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B

❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**

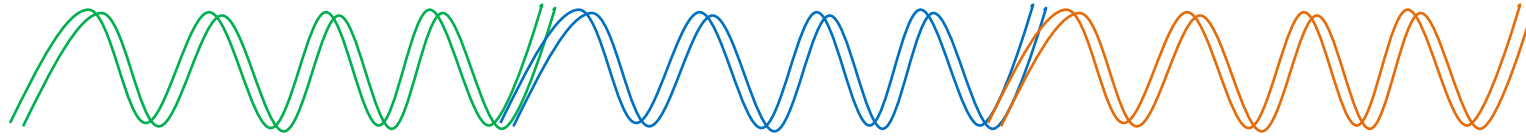
❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**

Screening di librerie di farmaci

Research Article

Identification of novel pathways and molecules able to down-regulate *PHOX2B* gene expression by *in vitro* drug screening approaches in neuroblastoma cells

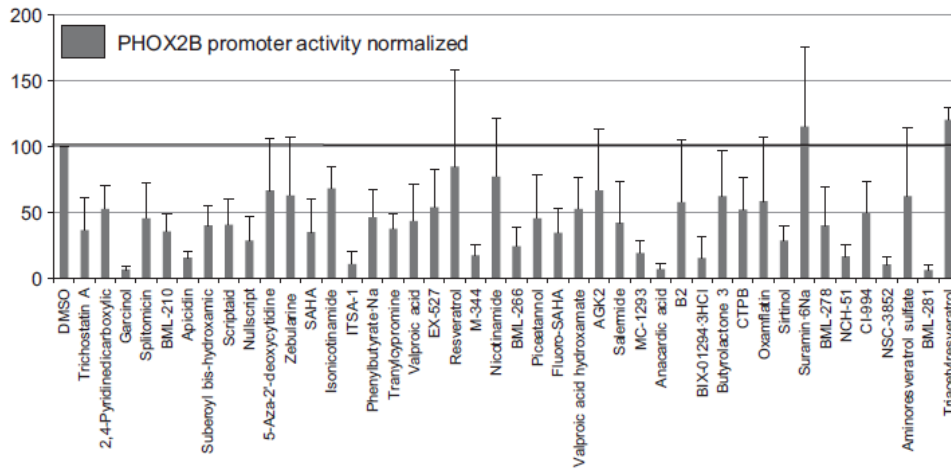
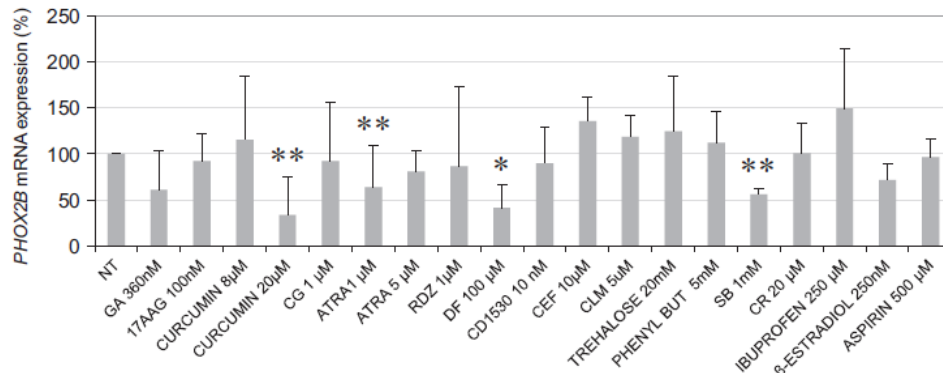
Eleonora Di Zanni^a, Diego Fornasari^b, Roberto Ravazzolo^{a,c},
Isabella Ceccherini^a, Tiziana Bachetti^{d,e,*}



PROMOTORE

RICERCA DI MOLECOLE IN GRADO DI
MODULARE L'ESPRESSIONE DI PHOX2B

3'UTR

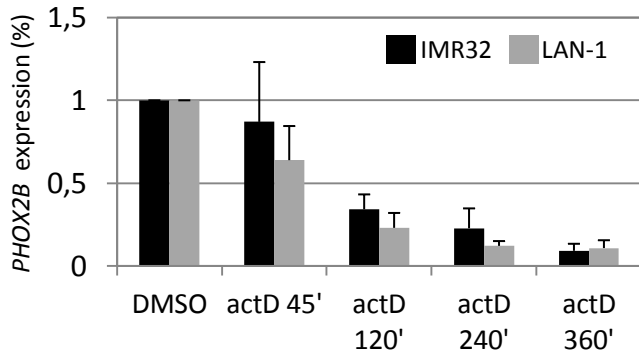


❖ Identificazione di molecole come curcumina, tricostatina A e SAHA che, da sole o in combinazione, possono essere efficaci nel contrastare l'over-espressione di PHOX2B tipica di molti neuroblastomi

❖ Nuove informazioni sulle vie molecolari coinvolte nella regolazione trascrizionale di PHOX2B

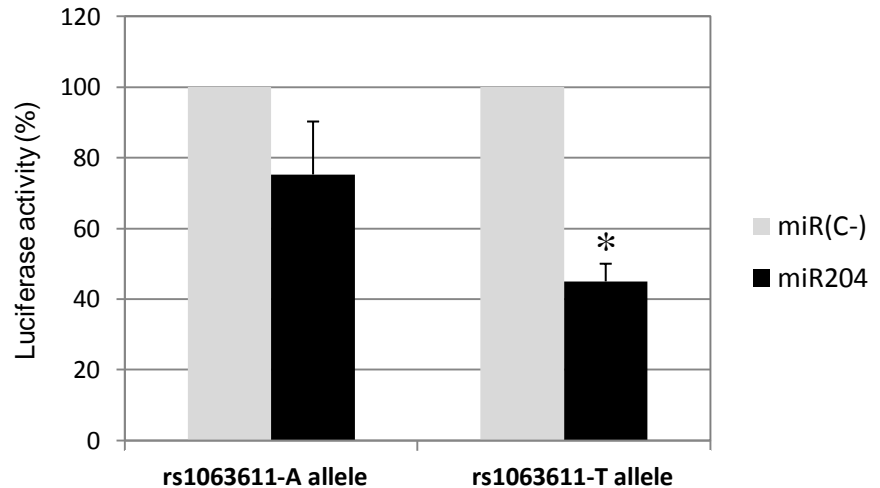
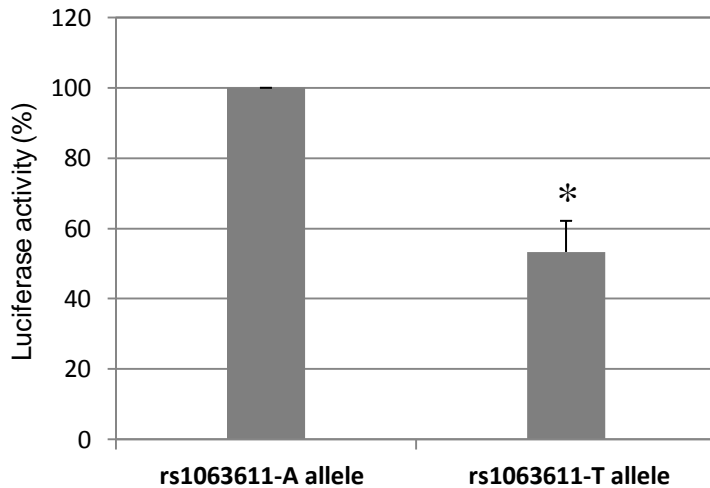
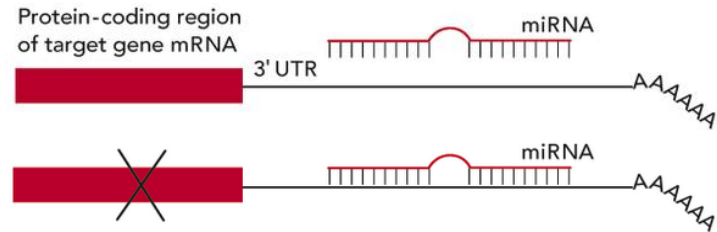
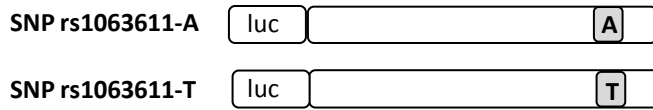
Regolazione post-trascrizionale di PHOX2B

Bachetti *et al.*, miR-204 mediates post-transcriptional down-regulation of *PHOX2B* gene expression in neuroblastoma cells *BBA-GRM*, in press



❖ miRNA-204 partecipa alla regolazione post-trascrizionale di PHOX2B in cellule NB

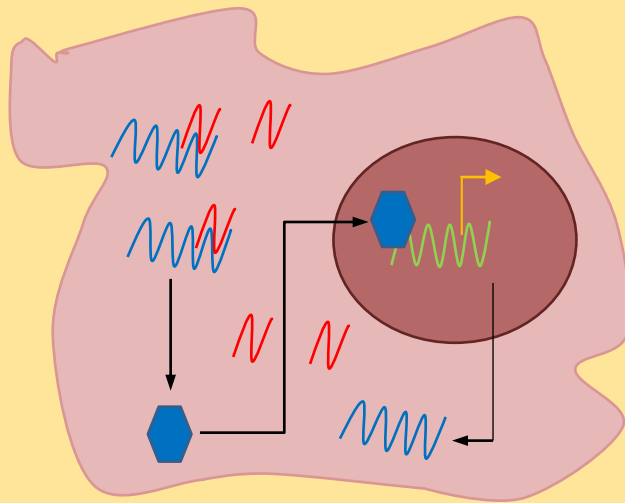
❖ miRNA-204 diminuisce la stabilità del trascritto di PHOX2B con diversa entità a seconda della presenza dei diversi alleli dello SNP rs1063611



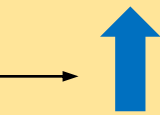
Regolazione post-trascrizionale di PHOX2B

Bachetti *et al.*, miR-204 mediates post-transcriptional down-regulation of *PHOX2B* gene expression in neuroblastoma cells
BBA-GRM, in press

Normal tissue cell

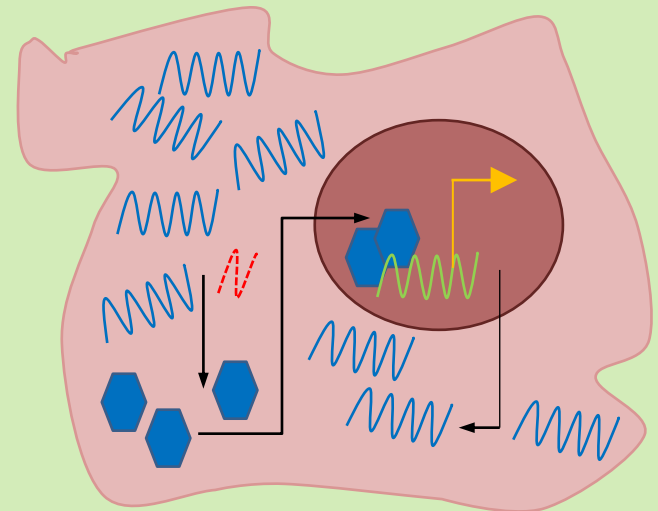


miR-204



PHOX2B mRNA

Neuroblastoma cell



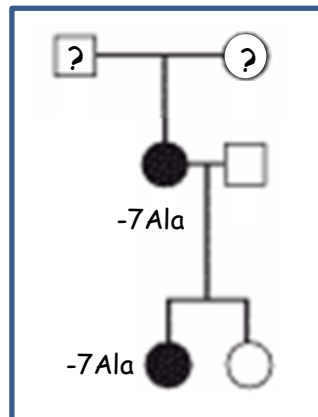
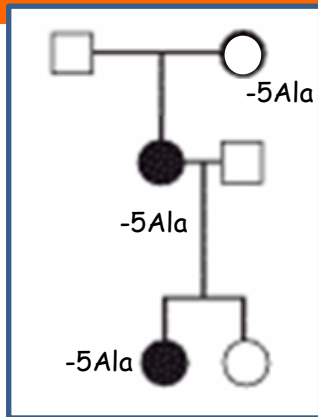
miR-204



PHOX2B mRNA



Difetti diversi di PHOX2B in pazienti atipici: caratterizzazione dello spettro fenotipico di PHOX2B



Varianti di contrazione del tratto di poli-Ala (con 7, 13, 14, o 15 ripetizioni) sono state riportate in:

- rari pazienti CCHS che presentano contemporaneamente anche un'espansione poli-Ala o una mutazione non poli-Ala;
- all'incirca il 3% della popolazione apparentemente normale;
- in una piccola proporzione di genitori CCHS;
- in un piccolo sottogruppo di pazienti che hanno presentano vaghi sintomi suggestivi di disregolazione autonoma e/o ipoventilazione occasionale, o eventi a rischio di vita, ma non la costellazione di sintomi caratteristici di CCHS.



TABLE 2—Phenotypes Associated With *PHOX2B* Whole Gene Deletions

Case	Deletion size (Mb)	Respiratory phenotype	HSCR	Tumor of neural crest	Inheritance	Other
2	2.6	CCHS	U	U	From mother	U
Mother of Case 2	2.6	U	X	U	U	U
3	0.29	Transient neonatal hypoventilation	—	U	U	Apparent-life threatening event
4	0.7	CCHS	—	X	From mother	—
Mother of Case 4	0.7	—	—	—	U	Wolf-Parkinson-White, fixed miotic right pupil
5 ¹	5	—	X	—	U	Developmental delay, hypotonia, facial dysmorphism
Heterozygous knockout mouse ²	Knockout	Transient hypoventilation	—	—	NA	—

U, unknown; X, positive; —, negative; NA, not applicable.

¹Previously reported case.³⁴

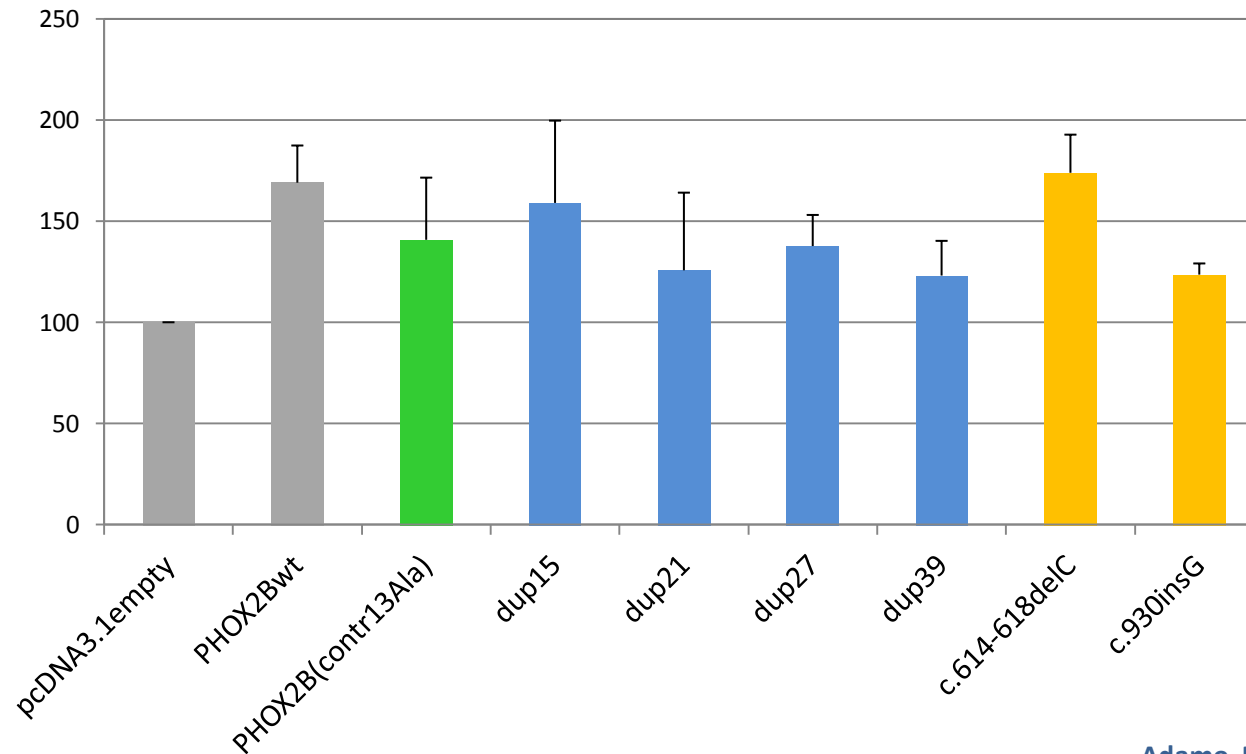
²Previously reported mouse model.^{32,33}

Variable Human Phenotype Associated With Novel Deletions of the *PHOX2B* Gene

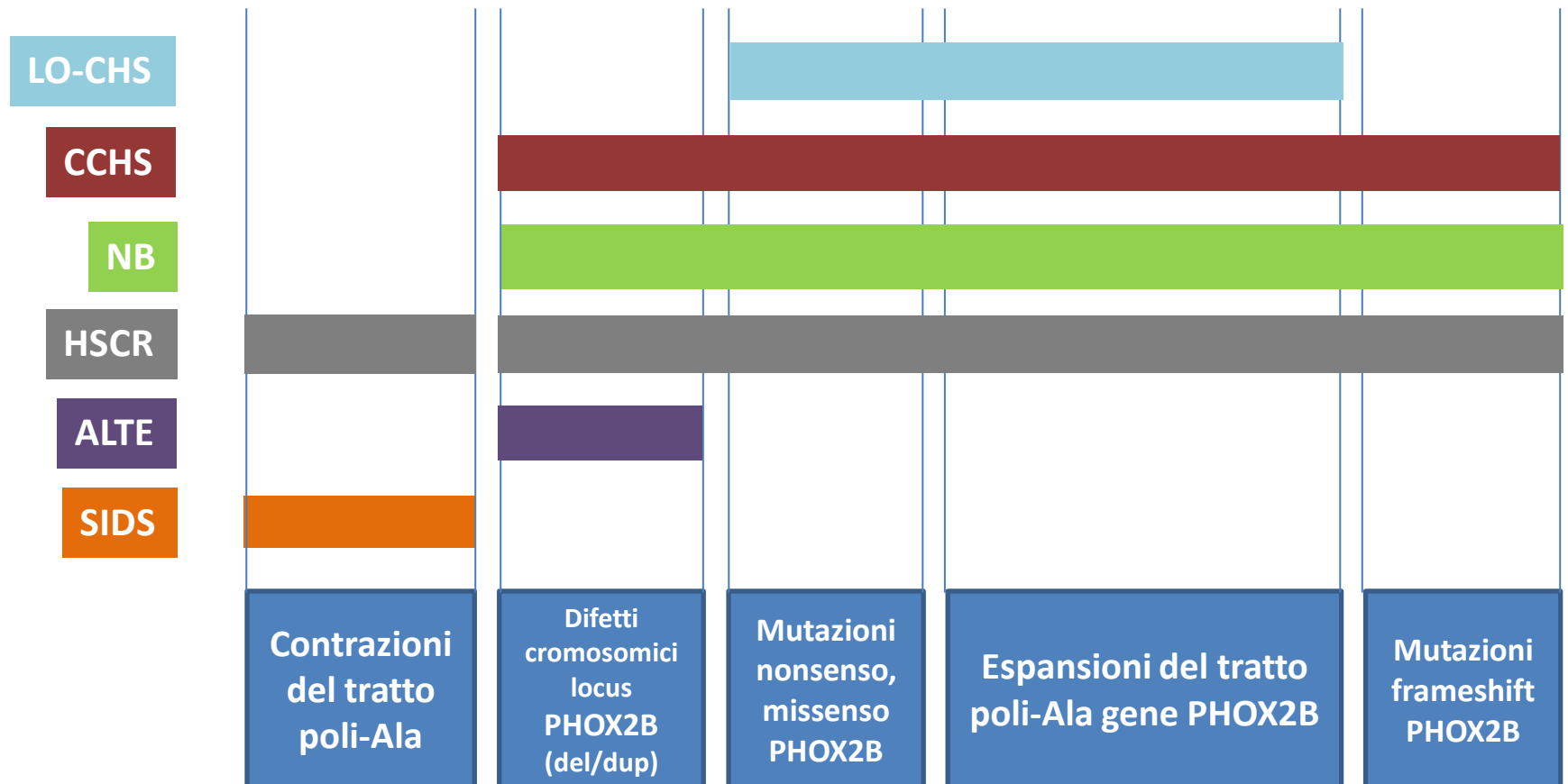
Lawrence J. Jennings, MD, PhD,^{1,2*} Min Yu, MD,¹ Casey M. Rand, BS,³ Nicole Kravis, BS,^{1,3} Elizabeth M. Berry-Kravis, MD, PhD,⁴ Pallavi P. Patwari, MD,^{2,3} and Debra E. Weese-Mayer, MD^{2,3}

Studio funzionale di diverse forme varianti di PHOX2B: attività trascrizionale sul promotore di RET

pazienti CCHS con altra mutazione PHOX2B	97	1 contraz	1/97	≈ 1%
donatori sani (controlli)	265	5 contraz	5/530	0.9%
genitori di pazienti CCHS	192	5 contraz	5/192	1.3%
pazienti Hirschsprung (HSCR)	254	8 contraz	8/508	1.6%



Spettro fenotipico associato a mutazioni PHOX2B

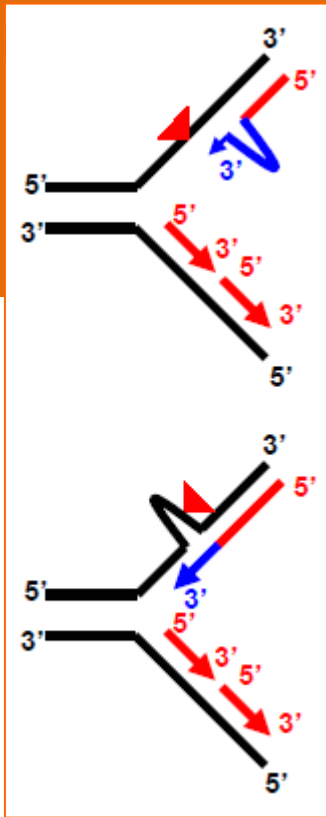




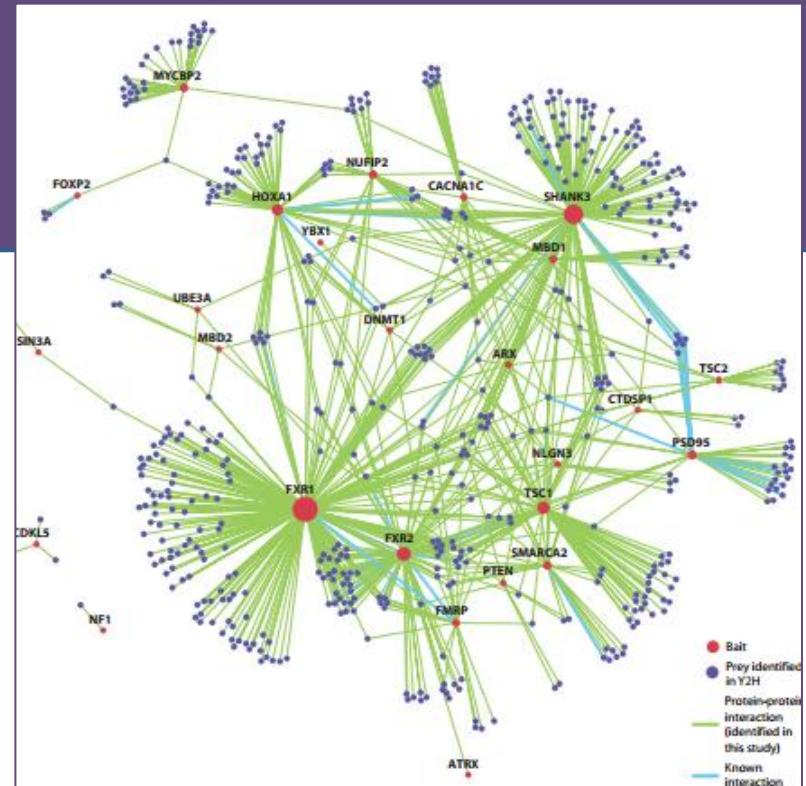
Ondine, by John William Waterhouse
(1872)

- ❑ **Sindrome da Ipoventilazione Centrale Congenita (CCHS)**
 - Mutazioni di PHOX2B associate a CCHS
 - Correlazione genotipo-fenotipo
- ❑ **Ricorrenza intrafamiliarità di CCHS**
 - Origine delle mutazioni PHOX2B in CCHS
 - Come e quando effettuare l'analisi di PHOX2B
- ❑ **Studi funzionali sugli effetti delle mutazioni PHOX2B e efficacia di trattamenti in vitro**
- ❑ **Nuove ricerche nell'UOC Genetica Medica (IGG)**
- ❑ **Cosa ci piacerebbe ancora studiare/sapere**

1. Come, quando e perche' insorgono le espansioni poli-Ala di PHOX2B?



2. Con quali proteine PHOX2B interagisce per svolgere le sue funzioni?
Definizione dell'interattoma di PHOX2B



3. Studio *in vivo* delle mutazioni PHOX2B e recupero del fenotipo da parte di molecole candidate



Acknowledgements

G Ottonello (Genova)
F Morandi (Como)
R Piumelli (Firenze)
M Farina (Padova)
M Paglietti (Roma)
G Scarano (Benevento)
CCHS referring physicians

Tiziana Bachetti
Eleonora Di Zanni

Ivana Matera
Sara Parodi*

Silvia Borghini

Marco Di Duca

Giuseppe Santamaria

Roberto Ravazzolo

Isabella Ceccherini

U.O.C. Genetica Medica,
Istituto Giannina Gaslini, Genova

Diego Fornasari,
Dip Farmacologia, Univ Milano

Associazione Italiana per la Sindrome da Ipoventilazione
Centrale Congenita (AISICC)