



# AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA SENESE



U.O. Genetica Medica Direttore Prof. Alessandra Renieri  
Policlinico “Le Scotte” – viale Bracci – 53100 SIENA Tel. – 0577/585316 – 233303–233259  
Fax 0577/233325 E-Mail: geneticamed@unisi.it – renieri@unisi.it

Studio Genomico mutazionale e funzionale nelle Malformazioni Vascolari per delineare appropriate strategie terapeutiche progetto GeVaMa\_2015

Commissionato e finanziato da: ILA - Associazione Italiana Angiodisplasie ed Emangiomi Infantili

## Composizione del Gruppo di Studio

- a) *Prof. Alessandra Renieri*, Direttore UOC Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, responsabile dello studio;
- b) *Dr. Massimo Vaghi*, Dipartimento di Chirurgia, Ospedale Salvini di Garbagnate Milanese;
- c) *Dr. Luca Primo* – Laboratorio Oncologia Univ. Torino – c/o IRCCS Candiolo;
- d) *Prof. Marina Ziche* - Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena;

## Stato avanzamento dello Studio al 30 settembre 2018

### La patologia oggetto della Ricerca

Le malformazioni vascolari sono dovute ad un processo di sviluppo dismorfogenico e si possono manifestare come malformazioni a carico del solo distretto capillare o come malformazioni a carico del distretto arterioso e/o venoso o infine come malformazioni a componente sia arteriosa che venosa che linfatica. Le malformazioni arterovenose a trasmissione autosomica dominante o recessiva sono generalmente congenite con segni di compromissione vascolare tipo angiomatosi diffusa o teleangectasie associate o meno ad ipertrofia degli arti. Le forme da mutazione somatica localizzata solo nel tessuto coinvolto o quelle a trasmissione paradominante con meccanismo a due hit (mutazione costitutiva + mutazione somatica) possono avere un'insorgenza più tardiva variabile nei primi mesi o anni di vita del soggetto.

Benché alcune vie molecolari coinvolte nella patogenesi inizino ad essere chiarite, nella maggior parte dei casi, l'agente causativo o la mutazione non sono note. L'identificazione di mutazioni genetiche causative permette lo sviluppo di modelli cellulari ed animali che, replicando il fenotipo descritto nei pazienti, rappresentano un prezioso aiuto per lo studio delle malformazioni vascolari. Inoltre, modelli *in vitro* e *in vivo* consentono non solo di testare farmaci anti-angiogenici esistenti ma anche di sviluppare nuovi approcci terapeutici, utilizzando come bersaglio diretto la molecola identificata come implicata nella via di segnale pato-fisiologica. Recentemente, la tecnologia di sequenziamento massivo parallelo in pazienti affetti da

sindrome di Klippel-Trénaunay, ha permesso di identificare la presenza di mutazioni somatiche attivanti nel gene *PIK3CA*, che risulta mutato anche in numerose neoplasie, aprendo la via all'utilizzo di inibitori del pathway di PI3K anche nel trattamento di alcune anomalie vascolari.

## L'attività di ricerca

Lo scopo dello studio, finanziato dall'associazione ILA ed in corso dal 2015, consiste nell'identificare mutazioni costitutive o localizzate esclusivamente nei tessuti affetti, definirne la patogenicità attraverso modelli cellulari *ad hoc* e identificare possibili target terapeutici. I pazienti, su segnalazione del Dott. Vaghi, vengono indirizzati alla UOC di Siena per effettuare oltre alla consulenza genetica le eventuali procedure previste dallo studio: somministrazione del consenso informato e prelievo di materiale biologico (sangue, urine, tampone buccale).

Tranne il prelievo ematico, necessario per la diagnosi molecolare, gli altri prelievi rappresentano una procedura extra-routine, valutabile in sede di consulenza. Per i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico è prevista anche la raccolta di parte del tessuto vascolare da asportazione chirurgica, che rappresenta materiale di scarto e la cui raccolta non pregiudica le normali procedure di analisi. In casi selezionati e dove possibile viene valutata la possibilità di effettuare una biopsia cutanea a livello del tessuto lesionale per analisi molecolare del tessuto affetto.

Presso l'UOC di Genetica Medica dal materiale biologico (sangue, urine, tampone buccale e/o tessuto vascolare da asportazione chirurgica o biopsia) viene estratto il DNA su cui viene effettuata analisi molecolare mediante metodiche di sequenziamento di nuova generazione. Sul DNA di alcuni pazienti selezionati viene inoltre effettuato il sequenziamento dell'intero esoma con lo scopo di identificare nuovi geni causativi o eventuali geni modificatori. Nell'ambito di questo progetto, il ruolo funzionale di mutazioni di significato patogenetico incerto identificate, viene valutato tramite saggi funzionali in modelli cellulari: su cellule endoteliali dal Dip. di Oncologia, Università di Torino (dott. Luca Primo) e su cellule endoteliali e linfatiche, cutanee, cardiache e su periciti e piastrine dal Dip. Scienze della Vita, Università di Siena (Prof. Marina Ziche). I saggi funzionali quali crescita, permeabilità, formazione di strutture simil vascolari, su singole linee cellulari o su co-culture vengono effettuati su cellule modificate per i geni precedentemente identificati come possibilmente causativi di alterata risposta ai fattori angiogenici.

Ad oggi sono stati analizzati circa 100 pazienti con anomalie vascolari tra cui più di trenta con malformazioni vascolari complesse localizzate o ad interessamento sistemico. È stato possibile reperire tessuto lesionale soltanto in 6 casi e questo ha reso difficoltosa la possibilità di identificare un gene causativo in presenza di condizioni caratterizzate dalla presenza di mutazioni somatiche, localizzate a livello del tessuto lesionale. Nel caso di angiodisplasie congenite ad interessamento sistemico in numerosi casi è stato possibile raggiungere una diagnosi di certezza ed inquadrare il fenotipo clinico nell'ambito di condizioni quali la teleangectasia ereditaria emorragica, sindrome HANAC, variante vascolare della sindrome di Ehlers Danlos, sindrome di Loeys Dietz, forma AOS. In una paziente con una rara angiodisplasia, nota come sindrome PHACE, l'analisi molecolare effettuata sia su DNA da sangue periferico che su DNA da tessuto lesionale ha permesso di individuare una mutazione germline in un gene malattia che associata ad una seconda mutazione somatica in un possibile gene candidato potrebbe essere responsabile del quadro clinico. Sono pertanto attualmente in corso studi funzionali sui geni candidati. L'analisi dell'intero esoma effettuata su casi selezionati di sindrome di Klippel Trénaunay sia su DNA da sangue periferico che su DNA da tessuto lesionale, ha evidenziato che mutazioni germline in nuovi gene candidati coinvolti nel pathway di *PI3K* potrebbero dare ragione dei numerosi casi di KTS negativi per mutazioni somatiche in *PIK3CA*. Saggi funzionali in modelli cellulari su cellule endoteliali in corso presso il

Dipartimento. di Oncologia, Università di Torino a cura del dott. Luca Primo sono volti a valutare il ruolo dei geni e delle varianti identificate.

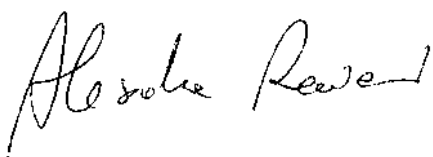
L'analisi dell'esoma su DNA da sangue e da tessuto lesionale per valutare la presenza rispettivamente di varianti costitutive e di varianti somatiche, risulta pertanto un'ottima strategia terapeutica per identificare nuovi geni candidati e/o stabilire un meccanismo a due hit in cui una mutazione a livello del tessuto coinvolto si somma ad una mutazione costitutiva presente in tutte le cellule dell'organismo portando all'insorgenza delle manifestazioni cliniche.

Per tale ragione la disponibilità del tessuto coinvolto nell'angiodisplasia, risulta una **conditio sine qua non**, in particolare per quelle condizioni ad interessamento asimmetrico in cui una mutazione somatica od un meccanismo a due hit possono essere ipotizzati.

Allo stato attuale dello Studio si evidenzia la necessità di utilizzare metodiche di sequenziamento massivo parallelo per poter procedere all'analisi su sangue e su tessuto in circa 15 pazienti e ai conseguenti studi funzionali.

Siena 5 novembre 2018

Prof. Alessandra Renieri

Handwritten signature of Alessandra Renieri in black ink.