



Associazione
italiana
sindrome di
Wolf Hirschhorn



ANALISI DEL TRASCRITTOMA SU LINEE CELLULARI DI PAZIENTI CON WHS

Paolo Niccolò Doronzio

IL CANDIDATO 1 (WHSC1, MMSET, NSD2)

❑ Candidato per:

- Ritardo di crescita
- Caratteristiche facciali
- DI

❑ Funzione:

- Metil-transferasi istonica (H3K36, H4K20)
- Sviluppo embrionale
- DSB repair
- Regolazione fattori di trascrizione e *splicing*
- Progressione del ciclo cellulare



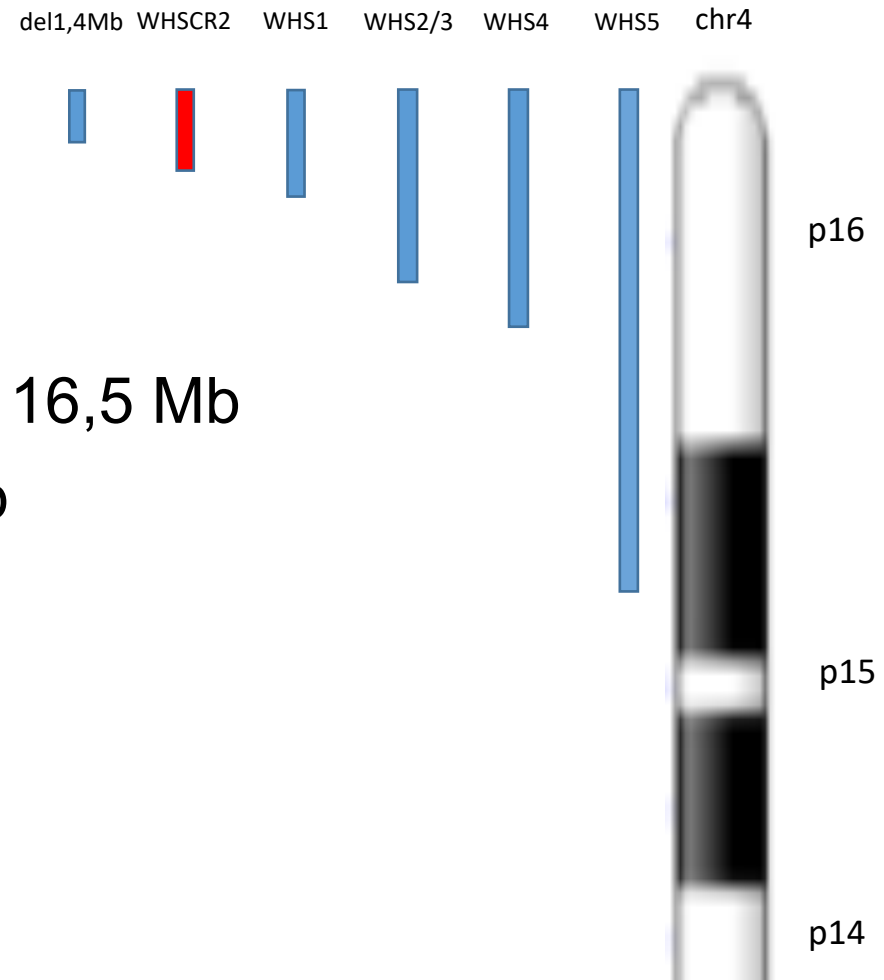
OBIETTIVO DELLO STUDIO (WHSC1)

Indagare effetti aploinsufficienza *WHSC1* su linee cellulari WHS:

- Profilo di espressione genica**
- Individuazione di pathways e cluster di geni alterati, con particolare riferimento ai geni per il neurosviluppo**
- Individuare quali geni sono regolati da WHSC1**
- Studiare WHSC1 nella riparazione del danno al DNA

MATERIALI E PAZIENTI

- WHS1: 46,XY del(4)(p16.3) 3,1 Mb
- WHS2: 46,XX del(4)(p16.3) 6,5 Mb
- WHS3: 46,XX del(4)(p16.3) 6,5 Mb
- WHS4: 46,XX del(4)(p16.3) 7,9 Mb
- WHS5: 46,XY del(4)(p15.33-->p16.3) 16,5 Mb
- del1.4Mb: 46,XX del(4)(p16.3) 1,4 Mb
- Ctrl1
- Ctrl2
- Ctrl3

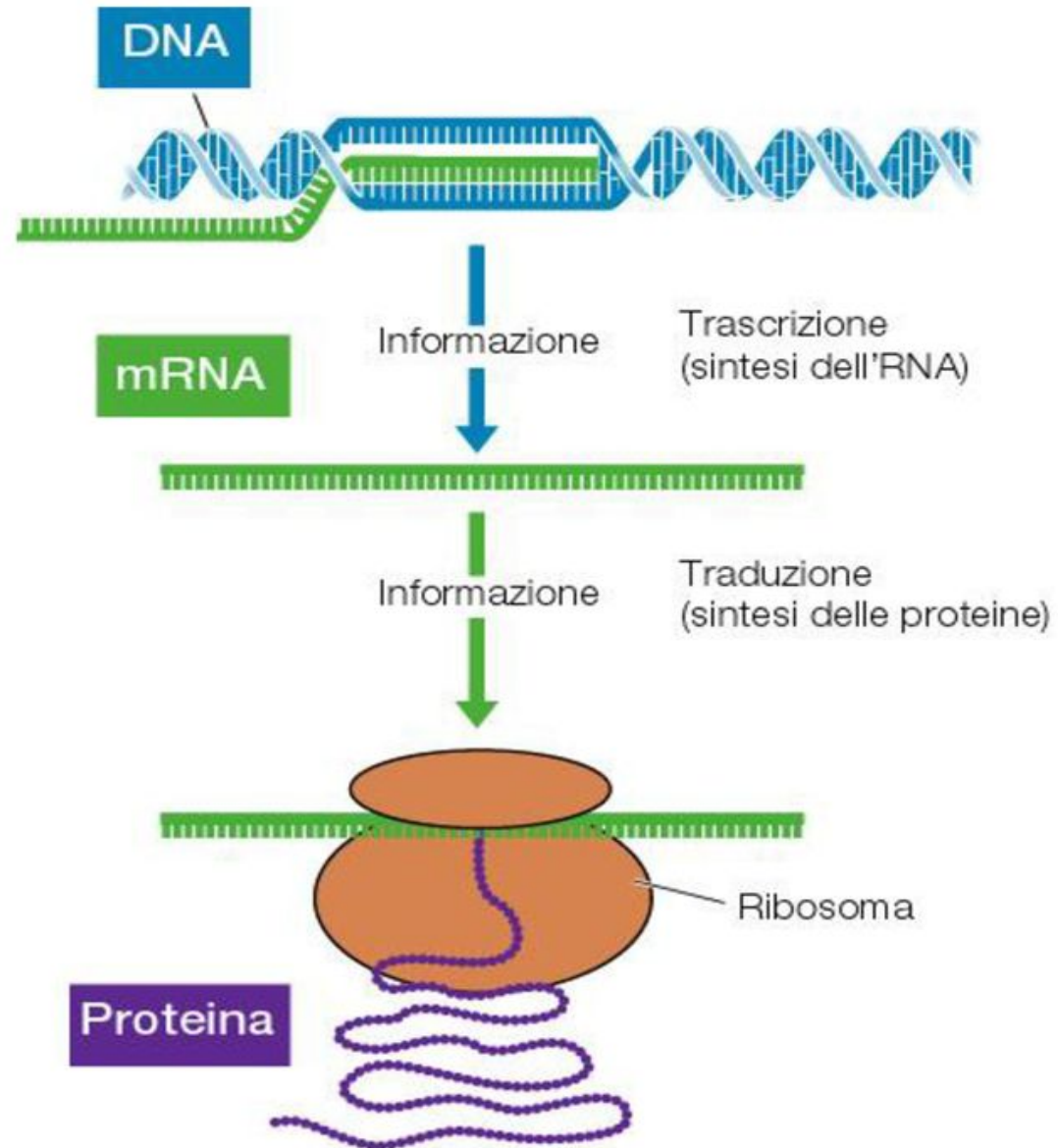


MATERIALI E PAZIENTI II

Linee cellulari:

- ❑ Linfoblasti: WHS1, WHS2, WHS3, WHS4, del1.4Mb + 3CTRL
- ❑ Fibroblasti: WHS1, WHS2, WHS3, del1.4Mb + 3CTRL
- ❑ Mioblasti: WHS1, WHS2, WHS5 +3CTRL

Il flusso dell'informazione nella cellula



RNA-SEQ WORKFLOW

Colture cellulari



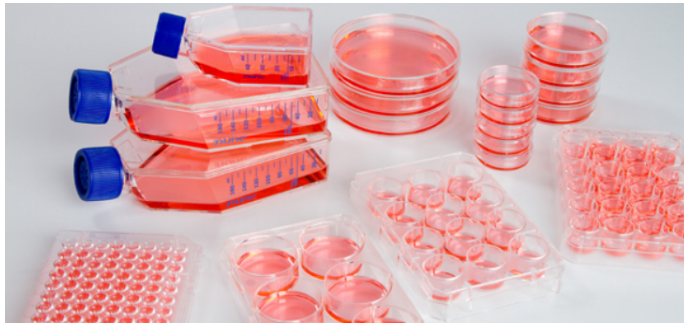
RNA



Sequenziamento



Analisi bioinformatica



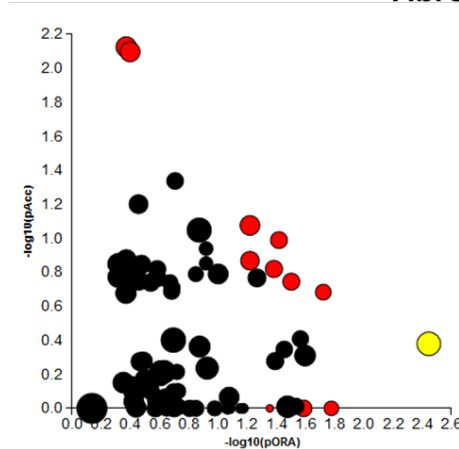
RNA-SEQ: IDENTIFICAZIONE PATHWAYS

Pathways deregolati nei fibroblasti

Term	P-Value	Benjamini
PI3K-Akt signaling pathway	1,9E-5	3,0E-3
Pathways in cancer	1,0E-3	7,9E-2

Processo Biologico	Geni
Via di segnalazione PI3K-Akt	<i>CHRM2, COL4A1, COL4A2, COL4A5, FLT1, GNG2, HGF, IL6, IL7, IL7R, LAMA3, NR4A1, PDGFD, PRKAA2, TEK, TNC, TLR4</i>
Adesione e migrazione cellulare	<i>ADCY4, B4GALT1, BMP4, CASS4, CGREF1, COL4A1, COL4A2, COL15A1, CYP1B1, DRD1, EDN1, EFS, FAM83H, FLT1, FOXF1, GJA1, HAS1, HAS2, HGF, HAPLN1, IL32, ISLR, LAMA3, LRRC15, NEGR1, PCDHB2, PDGFD, PODXL, POSTN, RHOB, SEMA7A, SSX2IP, SVEP1, TINAGL1, TUBB2A, TNC, VCAMI, VCAN</i>

Fibroblasts gene set enrichment



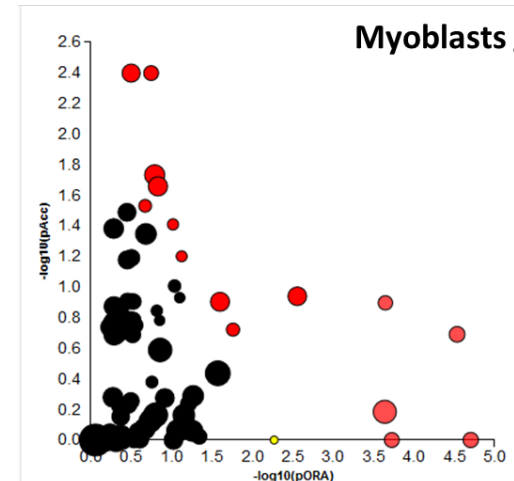
PI3K-Akt signaling pathway	0.011
Lysine degradation *	0.017
Transcriptional misregulation in cancer	0.022
Tight junction	0.022
Small cell lung cancer	0.026
Gastric acid secretion	0.026
Protein digestion and absorption *	0.026
Jak-STAT signaling pathway	0.032
Amoebiasis	0.035
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.038
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate *	0.044
Relaxin signaling pathway	0.048

Name	# genes (DE/ALL)	p-value
cell adhesion	14 / 1122	1.200e-4
biological adhesion	14 / 1126	1.200e-4
collagen-activated tyrosine kinase receptor signaling pathway	2 / 8	4.500e-4
regulation of receptor activity	7 / 368	6.900e-4
collagen-activated signaling pathway	2 / 10	7.200e-4
positive regulation of developmental process	12 / 1041	8.100e-4
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	5 / 195	0.001
regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	2 / 16	0.002
regulation of calcineurin-mediated signaling	2 / 16	0.002
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	4 / 133	0.002
regulation of calcium-mediated signaling	3 / 64	0.002
gland development	6 / 371	0.004
calcineurin-NFAT signaling cascade	2 / 23	0.004

RNA-SEQ: IDENTIFICAZIONE PATHWAYS

Pathways deregolati nei mioblasti

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	RT		10	2,9	3,1E-5	5,5E-3
MAPK signaling pathway	RT		16	4,7	2,5E-4	2,2E-2
PI3K-Akt signaling pathway	RT		19	5,6	2,7E-4	1,6E-2
Calcium signaling pathway	RT		13	3,8	3,3E-4	1,5E-2
Dilated cardiomyopathy	RT		9	2,6	3,4E-4	1,2E-2
Focal adhesion	RT		14	4,1	3,4E-4	1,0E-2
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	RT		11	3,2	8,9E-4	2,2E-2
Cardiac muscle contraction	RT		8	2,3	9,0E-4	2,0E-2
Regulation of actin cytoskeleton	RT		13	3,8	1,4E-3	2,8E-2

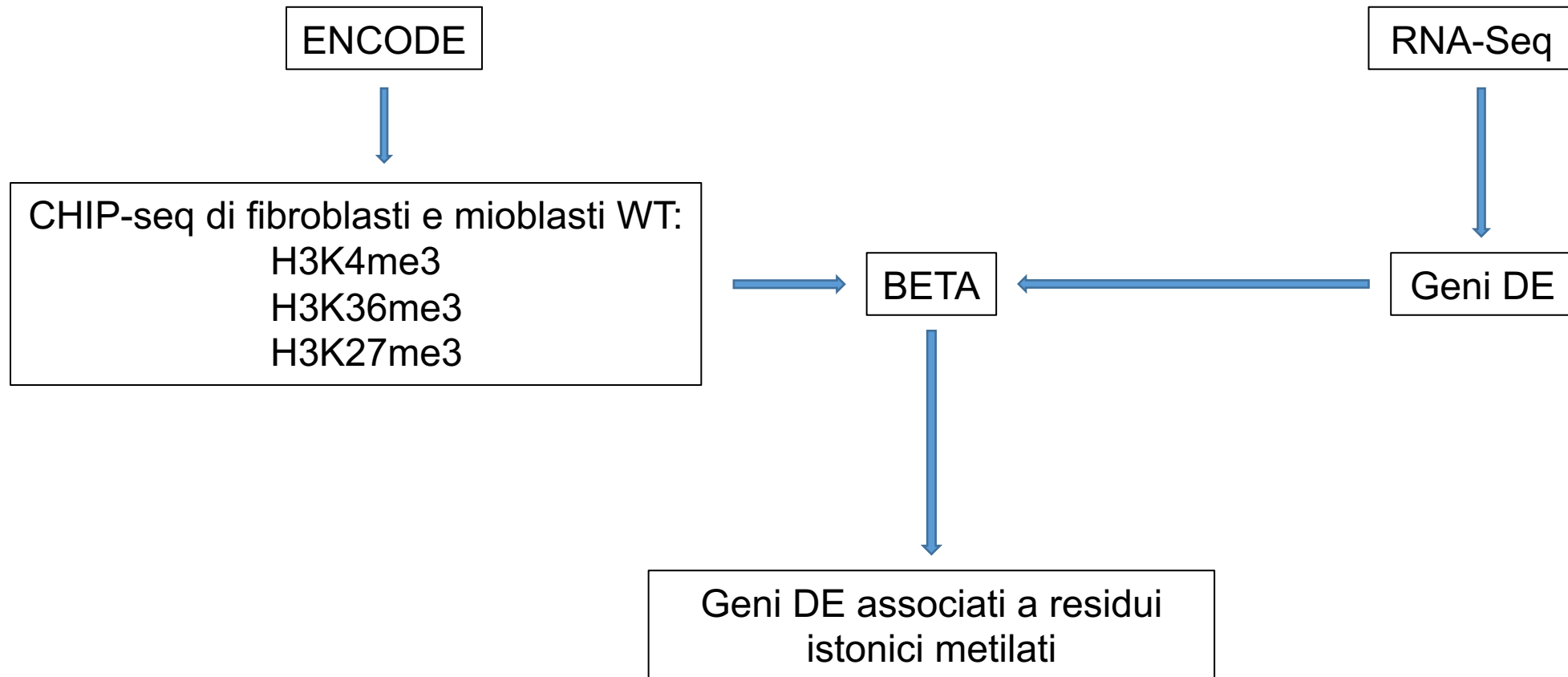


Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) *	1.980e-5
Dilated cardiomyopathy (DCM)	7.769e-5
Cardiac muscle contraction *	1.881e-4
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	3.287e-4
MAPK signaling pathway	0.001
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.003
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis *	0.005
Antigen processing and presentation	0.006
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.010
Transcriptional misregulation in cancer	0.020
Oxytocin signaling pathway	0.021
Cellular senescence	0.022
Viral myocarditis	0.022
Type 1 diabetes mellitus	0.025
Graft-versus-host disease	0.030

heart contraction	7 / 218	9.300e-5
heart process	7 / 220	9.800e-5
regulation of multicellular organismal process	24 / 2361	2.100e-4
regulation of heart contraction	6 / 190	3.300e-4
regulation of ion transport	9 / 501	7.200e-4
muscle contraction	7 / 306	7.300e-4
blood circulation	8 / 413	9.000e-4
regulation of blood circulation	6 / 230	9.100e-4
regulation of system process	8 / 414	9.100e-4
circulatory system process	8 / 416	9.400e-4
multicellular organismal signaling	5 / 166	0.001
glycolipid metabolic process	4 / 108	0.002
liposaccharide metabolic process	4 / 108	0.002
muscle system process	7 / 379	0.002
glycolipid biosynthetic process	3 / 57	0.003
negative regulation of platelet activation	2 / 17	0.003
decidualization	2 / 17	0.003
regulation of hormone secretion	5 / 202	0.003
regulation of transport	16 / 1564	0.003
multicellular organismal process	39 / 5588	0.003
positive regulation of calcium ion-dependent exocytosis	2 / 20	0.004
calcium ion transport	6 / 319	0.005

Processo Biologico	Geni
Via di segnalazione PI3K-Akt	<i>BCL2L11, COMP, CHRM2, F2R, COL4A5, COL5A3, EFNA5, FGF18, FGFR2, FLT4, HGF, ITGA6, ITGA7, LAMA5, NR4A1, PDGFRA, PDGFB, SGK1, THBS4</i>
Via di segnalazione MAPK	<i>FOS, CACNB1, CACNG1, CACNA1A, CACNA1H, CACNA1S, DUSP1, DUSP5, FGF18, FGFR2, GADD45G, MEF2C, NTRK2, NR4A1, PDGFRA, PDGFB</i>
Adesione cellulare	<i>ACTN2, COMP, COL4A5, COL5A3, FLT4, HGF, ITGA6, ITGA7, LAMA5, MYL2, MYLPP, PDGFRA, PDGFB, THBS4</i>
Segnalazione mediata da calcio	<i>ATP2B2, BDKRB1, CACNA1A, CACNA1H, CACNA1S, CAMK2B, CCKAR, CHRM2, F2R, PDGFRA, RYR1, TNNC1, TNNC2</i>
Cardiomiopatia Ipertrofica	<i>CACNB1, CACNG1, CACNA1S, DES, ITGA6, ITGA7, MYL2, PRKAG3, TTN, TNNC1</i>

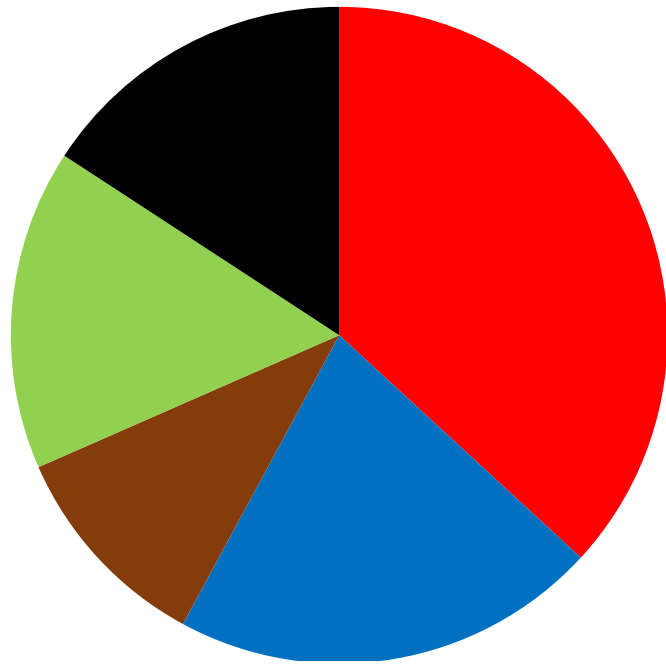
INTERPOLAZIONE DATI CHIP-SEQ



ASSOCIAZIONE RNA-SEQ E CHIP-SEQ

Interpolazione con Chip-Seq

Funzione



- Ciclo Cellulare (36%)
- Adesione e citoscheletro (21%)
- Sviluppo muscolare (11%)
- Metabolismo energetico (16%)
- Altro (16%)

Residuo istonico	Geni differenzialmente espressi associati
H3K4me3	<i>PMAIP1</i> , <i>NPTX1</i> , <i>GDF5</i> , <i>NR4A1</i> , <i>CLIC3</i> , <i>IGFBP4</i> , <i>TMEM129</i> , <i>JPH2</i> , <i>OLFML2A</i> , <i>IL32</i> , <i>ANKRD1</i> , <i>TNNT1</i> , <i>UCP2</i> , <i>HSPB3</i> , <i>SLC2A5</i> , <i>RASD1</i> , <i>CASS4</i>
H3K36me3	<i>GDF5</i> , <i>NPTX1</i> , <i>NR4A1</i> , <i>TMEM129</i> , <i>CASS4</i> , <i>CLIC3</i> , <i>IL32</i> , <i>MN1</i> , <i>JPH2</i> , <i>TNNT1</i> , <i>UCP2</i> , <i>ANKRD1</i> , <i>STC1</i> , <i>IGFBP4</i>
H3K27me3	<i>TNNT1</i> , <i>IL32</i> , <i>ADD2</i> , <i>JPH2</i> , <i>CASS4</i>

La funzione di metil-transferasi istonica di WHSC1 potrebbe essere associata all'espressione di questi geni

OBIETTIVO DELLO STUDIO (WHSC1)

Indagare effetti aploinsufficienza *WHSC1* su linee cellulari WHS:

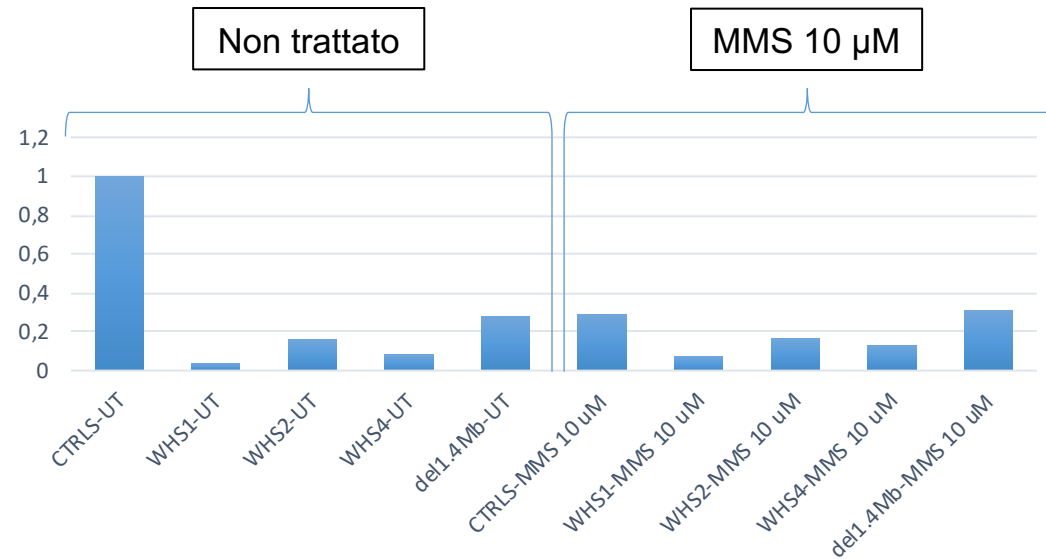
- Profilo di espressione genica
- Individuazione di pathways e cluster di geni alterati, con particolare riferimento ai geni per il neurosviluppo
- Individuare quali geni sono regolati da WHSC1
- Studiare WHSC1 nella riparazione del danno al DNA**

STUDIO SUL CONIVOLGIMENTO DI WHSC1 NEI MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

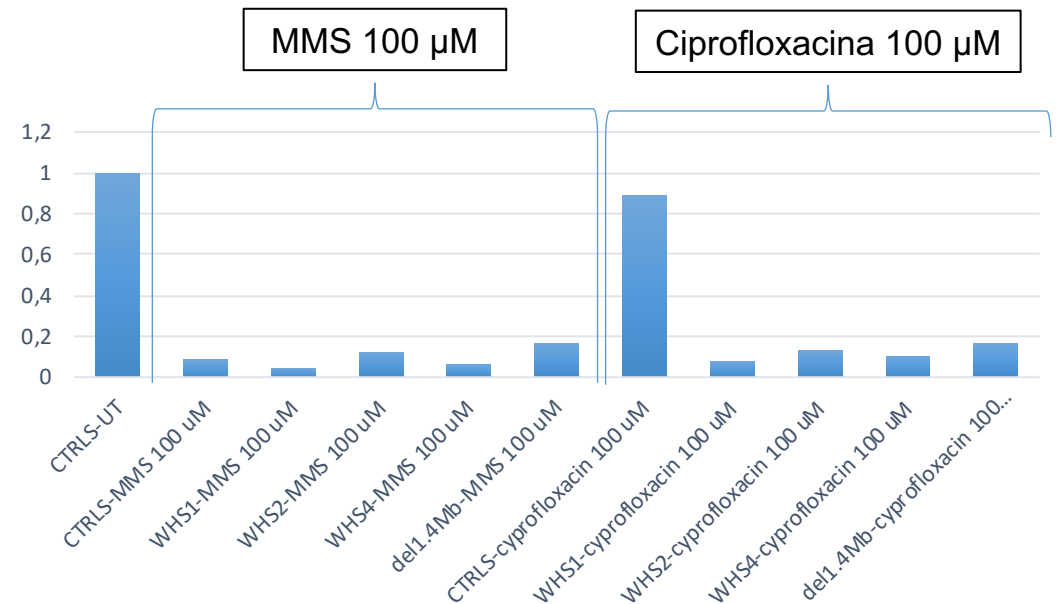
Trattamenti

Sostanza e concentrazione	Meccanismo di azione
Metansolfonato di metile (MMS) 10 μ M e 100 μ M	Agente alchilante, danno al DNA
Cyprofloxacin 100 μ M	Danno DNA
Resveratrolo 100 μ M	Antiossidante, inibitore p450
Ascorbato 5 mM	Danno DNA (in concentrazioni superiori a 1 μ g/ml)
AMP ciclico 100 μ M	Attivatore della via dell'adenilato ciclasi
L-carnitina 100 μ M	Metabolismo della carnitina
5-azacitidina 100 μ M	Inibitore metil-transferasi, danno DNA
Salbutamolo 1 μ M	Inibitore miosina fosforilata
Butirrato di sodio 5 mM	Inibitore proliferazione, induttore differenziazione.
Wortmannina 5 nM	Inibitore PI3K
TG003 20 nM	Inibitore Cdc2-like chinasi (progressione ciclo cellulare)
Idrolazina 500 μ M	Attivatore cAMP
Deguelin 50 nM	Inibitore Akt/PKB
DMSO 6 μ M	Mock
UT	Nessun trattamento

LIVELLI PROTEICI BASALI E IN SEGUITO A ESPOSIZIONE A MUTAGENI (ANALISI ESPRESSIONE PROTEINA WHSC1 MEDIANTE WESTERN BLOT).



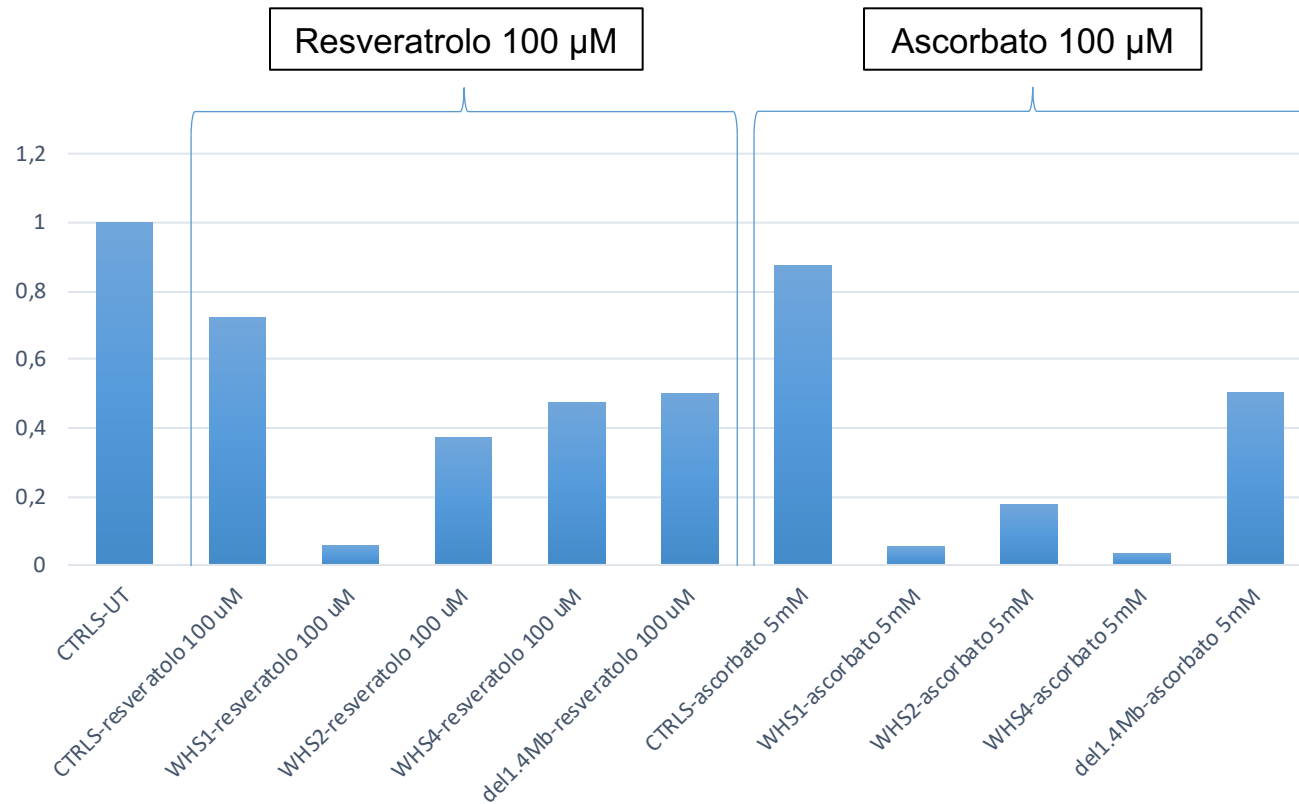
Ratio dell'espressione della proteina WHSC1 nei linfoblasti dei pazienti WHS1, WHS2, WHS4 e nell'individuo non affetto portatore di del1.4Mb rispetto alla media dei controlli nelle linee non trattate e trattate con MMS 10 µM. La normalizzazione è stata effettuata con la proteina GAPDH.



Ratio dell'espressione della proteina WHSC1 nei linfoblasti dei pazienti WHS1, WHS2, WHS4 e nell'individuo non affetto portatore di del1.4Mb rispetto alla media dei controlli nelle linee non trattate e trattate con MMS 100 µM e trattate con Ciprofloxacina 100 µM. La normalizzazione è stata effettuata con la proteina GAPDH.

- In presenza dell'MMS il livello della proteina diminuisce sia nei pazienti sia nei controlli in maniera dose dipendente.
- I trattamenti con la ciprofloxacina in dosi mutagene non alterano i livelli di espressione di WHSC1

LIVELLI IN SEGUITO A ESPOSIZIONE A MUTAGENI E ANTI-OSSIDANTI.



❑ I trattamenti con il resveratrol non alterano i livelli di espressione nei controlli ma aumentano quelli dei pazienti

❑ I trattamenti con ascorbato in dosi mutagene non alterano i livelli di espressione di WHSC1

Ratio dell'espressione della proteina WHSC1 nei linfoblasti dei pazienti WHS1, WHS2, WHS4 e nell'individuo non affetto portatore di del1.4Mb rispetto alla media dei controlli nelle linee non trattate e trattate con Resveratrol 100 µM e trattate con Ascorbato 5 mM. La normalizzazione è stata effettuata con la proteina GAPDH.

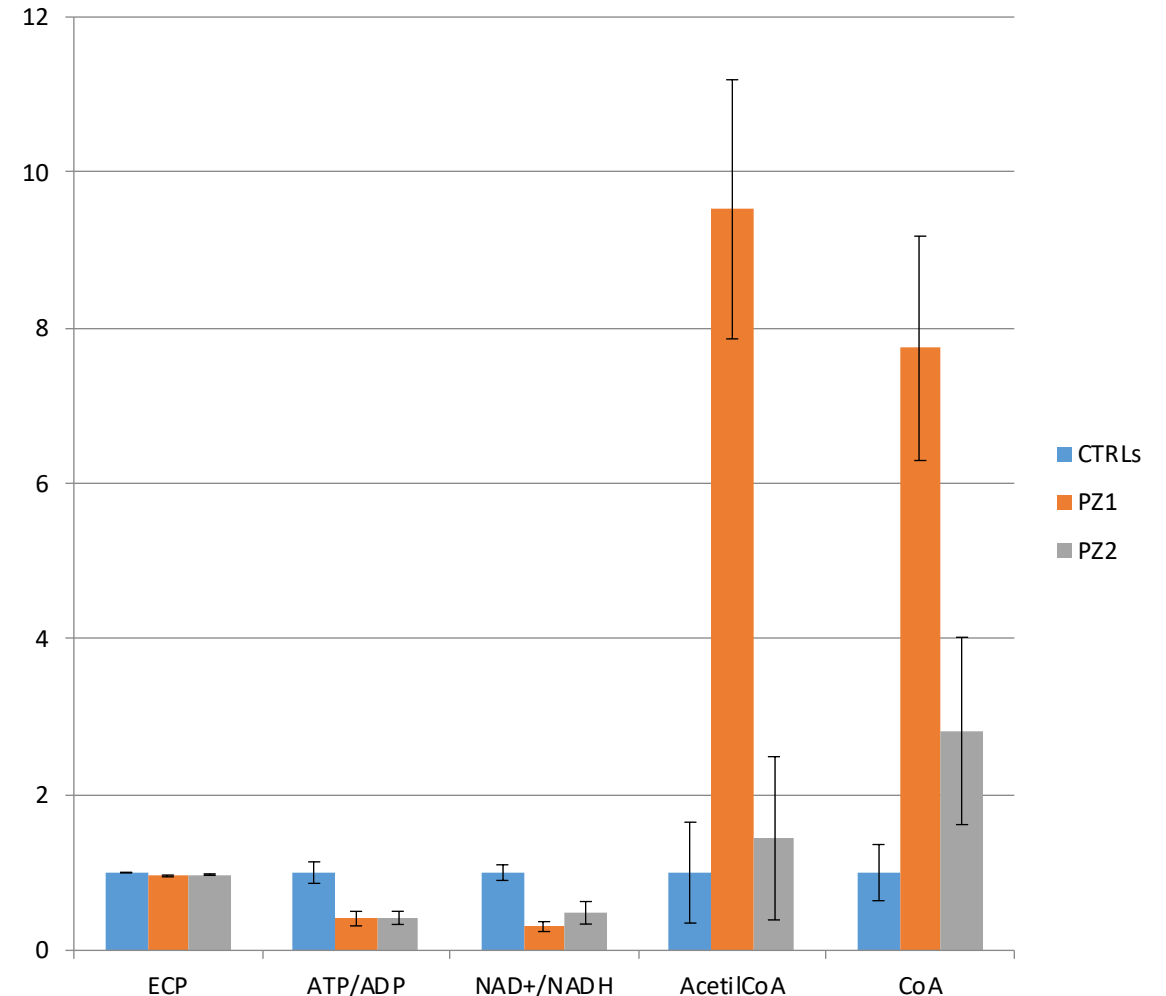
METABOLISMO ENERGETICO CELLULARE (MEDIANTE HPLC A SCAMBIO IONICO E NORMALIZZAZIONE SU FRAZIONE PROTEICA)

Analisi metabolismo energetico in fibroblasti

- Ridotta capacità fosforilativa (ATP/ADP)
- Aumento produzione di NADH (NAD⁺/NADH), aumento glicolisi (?)
- Aumento acetil-CoA, CoA
- Il potenziale energetico cellulare (ECP) ((ATP+1/2ADP)/ATP+ADP+AMP) leggermente più basso dei controlli



Switch metabolico verso β -ossidazione (?)



DURIGON et al. 2018

Dimostra che le linee cellulari dei pazienti:

- ❑ Presentano alterazione della morfologia e della funzione mitocondriale
- ❑ Tollerano meglio la presenza di corpi chetonici nel medium di coltura (β -ossidazione)
- ❑ Hanno un ridotto livello di espressione della piruvato chinasi

DISCUSSIONE

Ruolo atteso di *WHSC1*

- ❑ nella crescita cellulare [Rutherford et al., 2016]
- ❑ nell'adesione alla matrice extracellulare [Kerzendorfer et al., 2012]
- ❑ nella risposta al danno al DNA [Hajdu et al., 2011]

Processi che possono essere ragionevolmente correlati al difetto di crescita nei pazienti WHS.

TRASCRIPTOMA

Alterazione nella trascrizione di geni associati a:

- Progressione del ciclo cellulare
- Adesione cellulare



Ritardo di crescita

EFFETTI CELLULARI DELLA DELEZIONE DI *WHSC1*

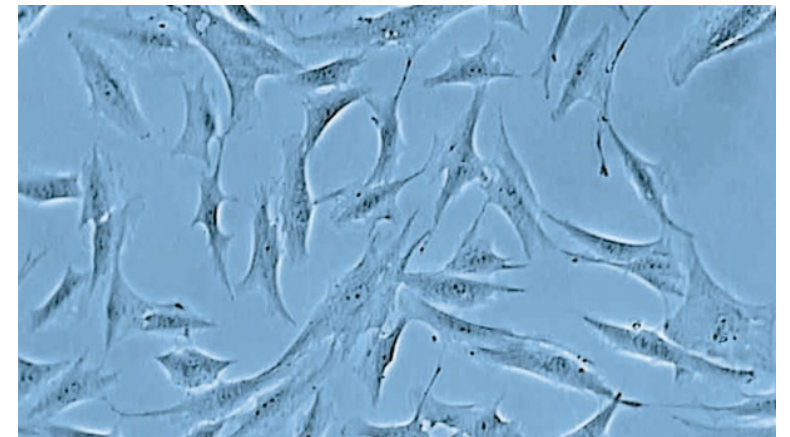
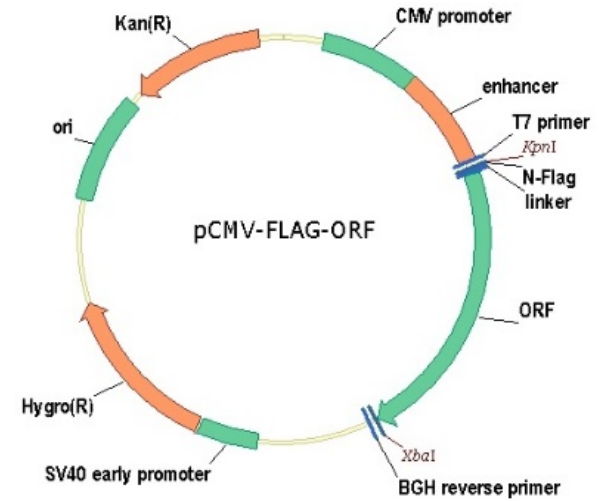
- ❑ La proteina è **aploinsufficiente** nelle cellule di pazienti WHS
- ❑ L'esposizione a mutageni **non aumenta** i livelli della proteina né nelle linee cellulari dei pazienti, né in quelle dei controlli
- ❑ **L'esposizione ad un agente antiossidante e pro-apoptotico** ha indotto un aumento di *WHSC1* solo nelle cellule dei pazienti ma non in quelle dei controlli:
l'aumento di *WHSC1* previene l'ulteriore rallentamento del ciclo cellulare nei pazienti?



Rischio tumorale non aumentato in modo significativo nei pazienti WHS

EVOLUZIONI FUTURE

- ❑ Conferma delle funzioni di *WHSC1*
- ❑ Analisi di rescue dopo la sovraespressione di *WHSC1* nelle linee cellulari di pazienti



RINGRAZIAMENTI

ISTITUTO DI MEDICINA GENOMICA

Prof.ssa Zollino Marcella
Dr. Marangi Giuseppe
Dr.ssa Lattante Serena
Dr.ssa Frangella Silvia
Dr.ssa Ricciardi Stefania
Tutto l'Istituto per i consigli e l'aiuto



ISTITUTO DI CHIMICA E BIOCHIMICA

Prof.ssa Tavazzi Barbara
Dr. Lazzarino Giacomo



Associazione
italiana
sindrome di
Wolf Hirschhorn

*Un ringraziamento va ai pazienti e alle famiglie
che hanno reso possibile questo studio.*