

Poster P.17.116

DISCOVERING MOLECULAR DEFECTS OF SEVERE GUT DYSFUNCTION: NEW ABNORMALITIES UNDERLYING CHRONIC INTESTINAL PSEUDO-OBSTRUCTION (CIPO)

Bonora E.^[1], Bianco F.^[1], De Giorgio R.^[2]

^[1]Department of Medical and Surgical Sciences ~ Bologna ~ Italy, ^[2]Department of Medical Sciences ~ Ferrara ~ Italy

CIPO is the most severe form of a wide spectrum of functional gastrointestinal (GI) disorders affecting the integrity of the intestinal neuro-muscular compartment. CIPO is characterized by a severe impairment of gut propulsion mimicking a mechanical sub-occlusive disease in the absence of any anatomical cause of gut obstruction.

Few gene mutations have been so far identified, but most cases remain genetically unsolved. We identified a novel recessive CIPO forms due to mutations in RAD21. RAD21 is a cohesin protein regulating many cellular functions including central and enteric neurons. We studied RAD21 expression in mouse and human intestine showing that RAD21 is expressed in subsets of cholinergic neurons (Bianco et al, 2018). We are currently evaluating RAD21 localization in the conditional rad21A626T mice and studying the molecular mechanisms leading to GI impairment by morpho-functional assessments (i.e., gut transit/contractility and stool production coupled to ENS marker and transcriptional analyses at different developmental stages) in this conditional mouse developed in collaboration with S. Gibbons (Mayo Clinic).

Gene defects in non-RAD21 mutated patients were assessed via whole exome sequencing (WES). Four peripheral neuropathic CIPO patients, one with gut hypoganglionosis and seven patients from 3 independent families with severe gut dysmotility (i.e. CIPO) and leucoencephalopathy, were analyzed. We identified new de novo changes in B3GAT2 and SMC3, a rare SCN11A change, novel biallelic changes in LIG3. B3GAT2 is implicated in neuronal migration (Gouveia et al, 2012), SMC3 binds to RAD21 (Deardoff et al, 2007), SCN11A/Nav1.9 sodium channel subunit is associated to visceral pain, with null mice exhibiting gut dysmotility (Hockley et al, 2016, Copel et al, 2013). LIG3 controls DNA repair in nuclei and mitochondria (Tomkinson et al, 2013). NGS in the probands revealed six compound heterozygous variants (family 1 p.K537N, p.G964R; family 2 p.R267Ter, p.C999Y; family 3 p.P609L, p. R811Ter) in LIG3, which encodes the DNA ligase III involved in nuclear and mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance. LIG3 mutations affected highly conserved residues, generating inactive proteins or a severe decrease in protein amount. lig3 ablation in zebrafish reproduced brain alterations and impaired gut transit. LIG3 mutations induced a profound mitochondrial dysfunction, with impaired mtDNA maintenance and repair due to reduced ligase activity. LIG3 mutations cause a severe mitochondrial impairment leading to a clinical phenotype dominated by gut neuro-muscular dysmotility and leucoencephalopathy.

We designed a sequencing panel for these genes and analyzed 115 CIPO cases (86 Italian, 29 Swedish) identifying rare/novel changes, including a stop codon in B3GAT2. Our data showed increased frequency of damaging variants in CIPO vs controls (ExAc, European) in SCN11A (3.28 vs 0.97%;P=0.0323). Functional studies are ongoing to characterize these CIPO variants.

Lo studio dei difetti molecolari nella pseudo-ostruzione intestinale cronica: identificazione di nuove alterazioni genetiche e funzionali

Abstract

La pseudo-ostruzione intestinale cronica (POIC) è una forma molto severa di disordine funzionale della motilità intestinale, e mima una sub-occlusione intestinale in assenza di una causa meccanica di ostruzione. Fino ad oggi sono state identificate alcune forme a base genetica, ma nella maggior parte

dei casi non sono note le cause. Il nostro gruppo di ricerca ha identificato una forma recessiva di POIC dovuta a mutazioni nel gene RAD21, che codifica per una subunità proteica della coesina, complesso coinvolto in trascrizione e replicazione del DNA. Abbiamo mappato l'espressione di RAD21 nell'intestino, in topo e uomo, identificando un sottogruppo di neuroni colinergici come co-esprimenti RAD21 (Bianco et al, 2018). Stiamo studiando l'espressione e localizzazione di RAD21 nel topo condizionale rad21A626T e valutando i meccanismi molecolari che portano al severo blocco di motilità intestinale (contrattilità e motilità intestinale, produzione di feci) insieme ai marcatori del sistema nervosa enterico, in collaborazione con S. Gibbons (Mayo Clinic).

Abbiamo quindi analizzato l'intero esoma (WES) nei pazienti non mutati in RAD21, selezionati in base alla presenza di POIC associate a: neuropatia periferica (4 casi), ipoganglionosi (1 caso) e POIC con leucoencefalopatia (3 famiglie affette). Abbiamo identificato nuove mutazioni de-novo in B3GAT2 e SMC3, mutazioni missenso in SCN11A, e mutazioni recessive in LIG3. B3GAT2 è coinvolto nella migrazione neuronale (Gouveia et al, 2012), SMC3 lega RAD21 (Deardoff et al, 2007), SCN11A/Nav1.9 è una subunità del canale del sodio collegata a dolore intestinale e dismotilità intestinale (Hockley et al, 2016, Copel et al, 2013). LIG3 codifica per la DNA Ligasi III che regola la riparazione del DNA nei nuclei e nei mitocondri. I nostri studi funzionali in vitro e in vivo hanno rivelato che le mutazioni in LIG3 determinano una severa alterazione della funzionalità mitocondriale, con severa deplezione del DNA mitocondriale dovuta all'assenza di attività della ligasi. Questo si traduce in un quadro clinico dominato da POIC e leucoencefalopatia nelle pazienti delle tre famiglie analizzate. Abbiamo generato un target panel per sequenziare i geni risultati mutati dall'analisi dell'esoma ed abbiamo analizzato ulteriori 115 casi di POIC (86 Italiani, 29 Svedesi), identificando nuovi o rari cambi, tra cui uno stop-codon prematuro in B3GAT2 ed un aumento nella frequenza di varianti dannose in SCN11A nei pazienti POIC rispetto ai controlli (3.28 vs 0.97%;P=0.0323). Studi funzionali sono in corso per analizzare l'effetto di tali varianti.

Bianco et al., 2018.

Copel et al., 2013.

Deardoff et al., 2007.

Gouveia et al., 2012.

Hockley et al., 2016.

Tomkinson et al., 2013.

Pseudo-ostruzione intestinale cronica

Coordinator: Elena Bonora

Partners: Francesca Bianco, Roberto De Giorgio

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

Telethon Project (nr):

GGP15171

Disease Name:

Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction

Keywords:

CIPO, ENS, mitochondria