

Poster P.23.146

A FUNCTIONAL GENOMICS FRAMEWORK TO INVESTIGATE THE MOLECULAR BASES OF RARE GENETIC DISEASES

Vaccaro L., Panariello F., Annunziata P., Dionisi M., Riccardo S., Grimaldi A., Bouche V., Manfredi A., Cacchiarelli D.*

TIGEM ~ Pozzuoli ~ Italy

As of today, it is impossible to perform a population genetic association study (i.e. GWAS) for rare genetic diseases, due to the limited cohort of affected patients. The main goal of this project is to be able to predict the pathogenetic risk associated with any possible aminoacidic mutation of proteins acting as the main genetic lesion of rare monogenic diseases. To this end, we setup a novel approach to generate protein mutagenesis libraries (MiTE-seq) applied to a large-scale analysis of every possible mutation in the protein of interest.

We decided to use the gene TP63 as a proof-of-principle strategy, focusing on its SAM domain, known to be the hotspot for driving mutations of AEC syndrome. We built a lentiviral library with every possible missense mutation of TP63 SAM domain, for a total of ~1200 mutations. To test the biological effect of each TP63 protein variant, we optimized a fibroblast-to-keratinocyte conversion assay which leverages TP63 activity to perform the conversion.

We were able to separate three different populations: iKC (enriched in gain of function and silent mutations), non-converted cells (enriched in loss of function mutations) and a halfway population (enriched in milder loss of function mutations). This allowed scoring the severity of existing and novel variants in the general population. Super-imposing the activity of the variants on the TP63 protein structure will also provide hints to understand the unknown role of TP63 SAM domain.

We are also expanding this approach to additional disease-driving genes to better dissect the relationship between genotype and phenotype in genes involved in rare genetic diseases.

Ad oggi è impossibile effettuare uno studio di associazione genetica della popolazione (es. GWAS) per malattie genetiche rare, a causa della limitata coorte di pazienti affetti. L'obiettivo principale di questo progetto è quello di essere in grado di prevedere il rischio patogenetico associato ad ogni possibile mutazione aminoacidica delle proteine che agiscono come principale lesione genetica di malattie monogeniche rare. A tal fine, abbiamo messo a punto un nuovo approccio per generare librerie di mutagenesi proteica (MiTE-seq) applicate ad un'analisi su larga scala di ogni possibile mutazione della proteina di interesse.

Abbiamo deciso di utilizzare il gene TP63 come strategia di proof-of-principle, concentrandoci sul suo dominio SAM, noto per essere l'hotspot per guidare le mutazioni della sindrome AEC. Abbiamo costruito una libreria lentivirale con ogni possibile mutazione missenso del dominio TP63 SAM, per un totale di ~1200 mutazioni. Per verificare l'effetto biologico di ogni variante della proteina TP63, abbiamo ottimizzato un test di conversione da fibroblasti a cheratinociti che sfrutta l'attività di TP63 per eseguire la conversione.

Siamo stati in grado di separare tre diverse popolazioni: iKC (arricchito in mutazioni di guadagno di funzione e mutazioni silenti), cellule non convertite (arricchite in mutazioni con perdita di funzione) e una popolazione a metà strada (arricchita in perdita più lieve di funzione). Questo ha permesso di valutare la gravità delle varianti esistenti e di quelle nuove nella popolazione generale. La sovrapposizione dell'attività delle varianti sulla struttura della proteina TP63 fornirà anche spunti per comprendere il ruolo sconosciuto del dominio SAM di TP63.

Stiamo anche ampliando questo approccio ad altri geni patogeni per dissezionare meglio la relazione tra genotipo e fenotipo nei geni coinvolti in malattie genetiche rare.

...

Sindrome di Hay-Wells

Coordinator: Davide Cacchiarelli

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2017

Telethon Project (nr):

TIGEM STARTUP GRANT

Disease Name:

AEC Syndrome or Hay-Wells Syndrome

Keywords:

Functional Genomics, High Throughput Protein Mutagenesis, TP63