

MESSA A PUNTO DI UNA PROCEDURA DIAGNOSTICO MOLECOLARE PER L'INDIVIDUAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE GENETICA ALL'ALLERGIA ALLE ARACHIDI ED ALLA FRUTTA SECCA IN GENERALE

Regione del Veneto - POR FESR 2014-2020

**BANDO PER IL SOSTEGNO A PROGETTI DI RICERCA CHE PREVEDONO L'IMPIEGO DI
RICERCATORI**

ASSE I "RICERCA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE"

Obiettivo specifico "Incremento dell'attività di innovazione delle imprese"

Azione I.1.1 "Sostegno a progetti di ricerca alle imprese che prevedono l'impiego di ricercatori (dottori di ricerca e laureati magistrali con profili tecnico-scientifici) presso le imprese stesse".



FESR / REGIONE DEL VENETO



UNIONE EUROPEA



REGIONE DEL VENETO



EXPERTEAM srl

via della Libertà 12 30175 Marghera-VE

tel.: 041 5093101 fax: 041 5093102

experteam@experteam.it

ALLERGIA ALLE ARACHIDI IgE mediata (AAr)

- Prevalenza nella popolazione Europea tra 1-2%
- Persistenza a lungo nella vita
- Potenziale gravità della reazione avversa

Attualmente non esiste un'effettiva prevenzione o un trattamento approvato la sola strategia di prevenzione è evitare ciò che provoca la reazione



Dal punto di vista molecolare sono stati caratterizzati diversi allergeni delle arachidi codificati con le sigle da Ara h1 a Ara h8 divisi nelle superfamiglie di cupine e prolamine. Ara h1 e Ara h2 sono considerati gli allergeni maggiori.



ALLERGIA ALLE ARACHIDI IgE
mediata (AAR)

Studi effettuati su fratelli gemelli e famiglie hanno fornito prove convincenti che **fattori genetici** contribuiscono al manifestarsi dell' AAR, con un'ereditarietà stimata di ~80%

Si rende necessaria la presenza di un **test diagnostico** che sia in grado di determinare la predisposizione genetica all'AAR

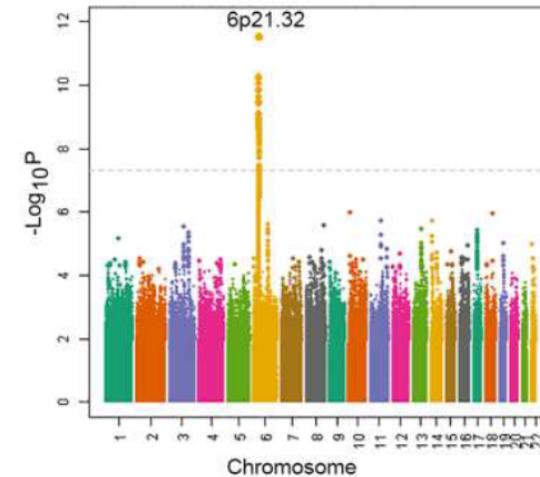
Progetto basato sullo studio della bibliografia (studi di GWA) che correla variazioni di un singolo nucleotide (SNP) in un gene come **HLA** (L242V) o **Filaggrina** (R501X e 2282del4) all'allergia alle arachidi.

HLA

Studio di Genome Wide Association per
specifica associazione con AAr



40 SNP raggiungono la significatività all'interno del gene
HLA di classe II nella regione del cromosoma 6p21.32



rs7192 (L242V)
mostra una suggestiva
associazione con AAr
nella regione HLA-DRA



$P=5,5 \times 10^{-8}$
OR=1,7

rs9275596
il più significativo tra la
regione HLA-DQB1 e
HLA-DQA2



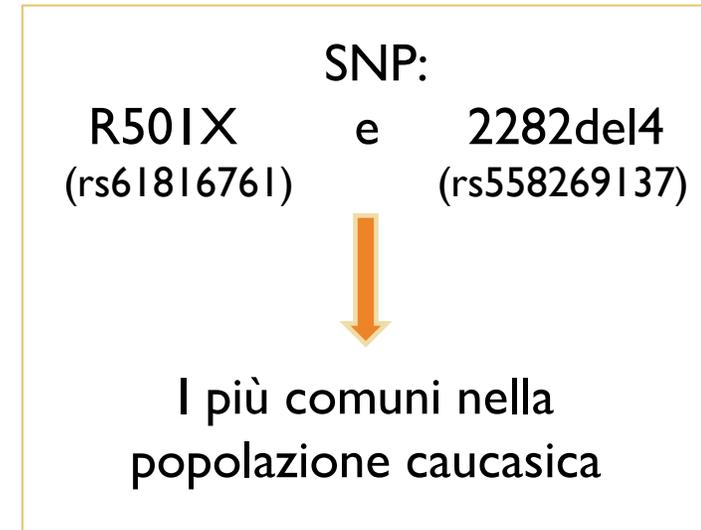
$P=6,8 \times 10^{-10}$
OR=1,7

- rs7192 e rs9275596 rappresentano un singolo fattore di rischio per AAr,
- solo rs7192 viene analizzata per il progetto, rs9275596 presente in una regione genomica difficile da studiare → difficoltà nel disegno dei primers
- Questi dati non sono replicabili in popolazioni di origine non Europea

Filaggrina

Analisi in popolazioni Europee di 71 pazienti con AAr comparate con i 1000 controlli non sensibilizzati alle arachidi

Genotypes and statistical tests	Patients (n)	Controls (n)
No <i>FLG</i> mutations detected (homozygous wild-type)	59	963
One wild-type and 1 <i>FLG</i> mutant allele (heterozygous)	10	37
Two <i>FLG</i> loss-of-function mutations (homozygous or compound heterozygous)	2	0
Total	71	1000
Proportion of individuals carrying <i>FLG</i> loss-of-function mutations (%)	16.9	3.7
Fisher exact test	$P = 3.0 \times 10^{-6}$	
OR (95% CI)	5.3 (2.8-10.2)	



- Varianti loss-of-function (R501X e 2282del4) nel gene della filaggrina sono fortemente e significativamente associate all'allergia alle arachidi
- Le mutazioni della filaggrina sono un nuovo fattore di rischio per l'allergia alle arachidi IgE mediata, indicando un ruolo della disfunzione della barriera epiteliale nella patogenesi della malattia

MESSA A PUNTO DI UNA PROCEDURA DIAGNOSTICO MOLECOLARE PER L'INDIVIDUAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE GENETICA ALL'ALLERGIA ALLE ARACHIDI

Dopo aver individuato le varianti genetiche con più forte significatività statistica è stato possibile studiare ciascuna di esse tramite i database online:

rs7192 SNP

This variant has been flagged

None of the variant alleles match the reference allele

Select a location:

Alleles: **T/G | MAF: 0.34 (T)**

Location: This variant maps to 7 genomic locations. Please select a location in the box above.

Evidence status:

HGVS names: This variant has 2 HGVS names - [Hide](#)

NM_019111.4:c.724T>G, NP_061984.2:p.Leu242Val

Come vengono denominate, dove si localizzano e cosa comporta la variazione allelica

NC_000006.12 | Find: | 32,443,850 | 32,443,860 | **rs7192** | 32,443,870 | 32,443,880 | 32,443,890

Gene, NCBI Homo sapiens Annotation Release 109, 2018-03-27

dbSNP Build 151 (Homo sapiens Annotation Release 108) all data

rs746475812 C/T rs1350950998 C/T rs1291410266 A/C rs7192 G/T rs751562870 A/C rs1484267377 A/G rs530789959 C/T rs770380561 C/T rs776279402 A/G rs960870983 A/G rs764172368 A/G rs552421989 rs142

3715 A/G rs541798926 A/G rs762948004 C/T

Live RefSNPs, dbSNP b152 v2

rs746475812 T/C rs1350950998 T/C rs1291410266 A/C rs7192 T/G rs751562870 A/C rs1484267377 G/R rs530789959 C/T rs770380561 C/G/T rs776279402 A/G rs960870983 G/R rs764172368 G/R rs552421989 rs142

3715 A/G rs541798926 A/G rs762948004 C/T

Clinical, dbSNP b152 v2

Warning: No track data found in this range

Classifier: Short Variations based on dbSNP Build 150 (Homo sapiens Annotation Release 108)

Warning: No track data found in this range

Cited Variations, dbSNP b152 v2

rs7192 T/G

1000 Genomes Phase 3, dbSNP b152 v2

rs541798926 A/G rs530789959 C/T rs7192 T/G rs552421989

Splice Donor Region Variations, dbSNP b152 v2

Warning: No track data found in this range

Splice Acceptor Region Variations, dbSNP b152 v2

Warning: No track data found in this range

Synonymous Variations, dbSNP b152 v2

rs746475812 T/C rs1350950998 T/C rs1291410266 A/C rs7192 T/G rs751562870 A/C rs1484267377 G/R rs530789959 C/T rs770380561 C/G/T rs776279402 A/G rs960870983 G/R rs764172368 G/R rs552421989 rs142

3715 A/G rs541798926 A/G rs960870983 G/R

Missense Variations, dbSNP b152 v2

rs746475812 T/C rs1350950998 T/C rs1291410266 A/C rs7192 T/G rs751562870 A/C rs1484267377 G/R rs530789959 C/T rs770380561 C/G/T rs776279402 A/G rs960870983 G/R rs764172368 G/R rs552421989 rs142

3715 A/G rs541798926 A/G rs960870983 G/R

Frameshift Variations, dbSNP b152 v2

Warning: No track data found in this range

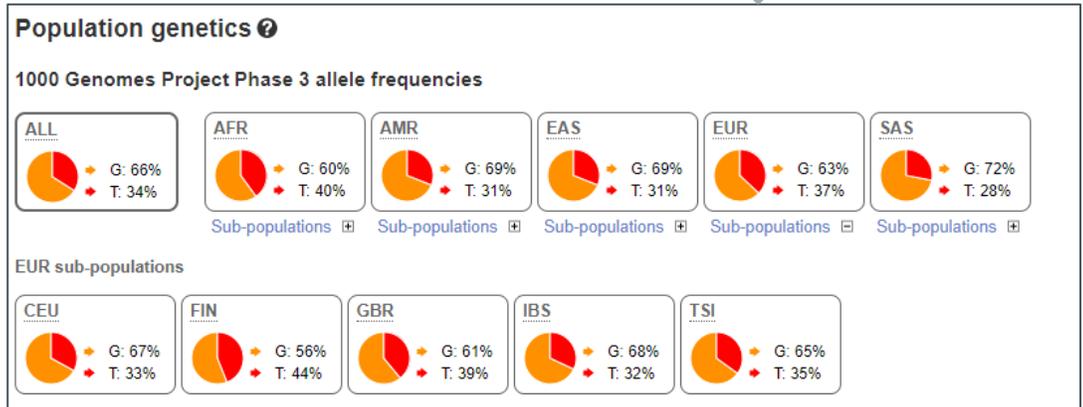
32,443,850 | 32,443,860 | 32,443,870 | 32,443,880 | 32,443,890

NC_000006.12:32M..32M (48bp)

Tracks shown: 13/586

Posizione dello SNP nel genoma

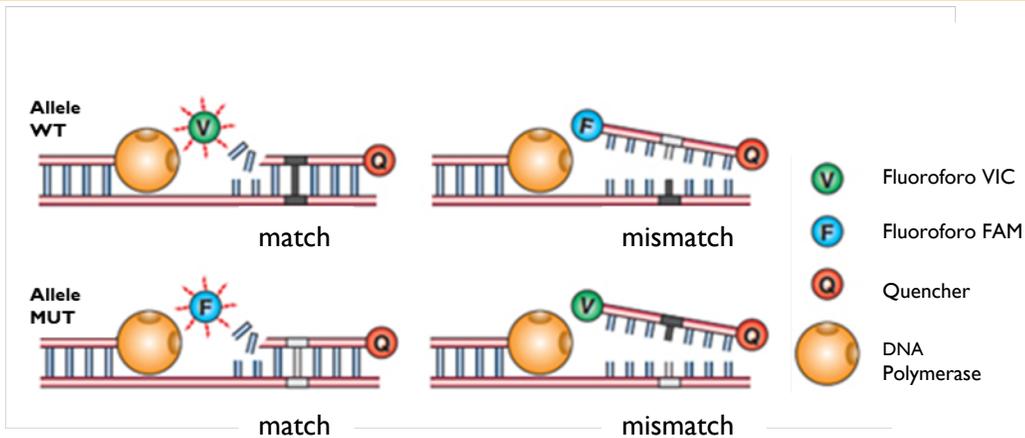
Frequenze delle due varianti alleliche (in questo caso G/T) riportate per le popolazioni



TECNICA UTILIZZATA PER L'ANALISI DEI POLIMORFISMI:

DISCRIMINAZIONE ALLELICA IN REAL TIME

- Rileva variazioni di un singolo nucleotide (SNP) in una sequenza
- 1 coppia di primers e 2 probe per reazione permettono la genotipizzazione dello SNP



La discriminazione allelica misura il cambio di fluorescenza del fluoroforo associato alla sonda.

Un detector fluorescente (FAM o VIC) si accoppia perfettamente all'allele Wildtype (WT) e l'altro detector (FAM o VIC) si accoppia perfettamente all'allele mutato (MUT).

Un sostanziale incremento	Indica:
Solo nella fluorescenza FAM o VIC	Omozigosi per l'allele WT o MUT
In entrambi i segnali di fluorescenza	Eterozigosi per l'allele WT e per l'allele MUT

Kit per
determinare la
predisposizione
genetica all'AAR

**MIX 1: Peanut Hypersensitivity
Predisposition Detection MIX1**

contenente:

- Detection MIX WT 1
 - Detection MIX MUT 1
- e reagenti per amplificare
rs7192 (L242V)

**MIX 2: Peanut Hypersensitivity
Predisposition Detection MIX2**

contenente:

- Detection MIX WT 2
 - Detection MIX MUT 2
- e reagenti per amplificare
rs61816761 (R501X)

**MIX 3: Peanut Hypersensitivity
Predisposition Detection MIX3**

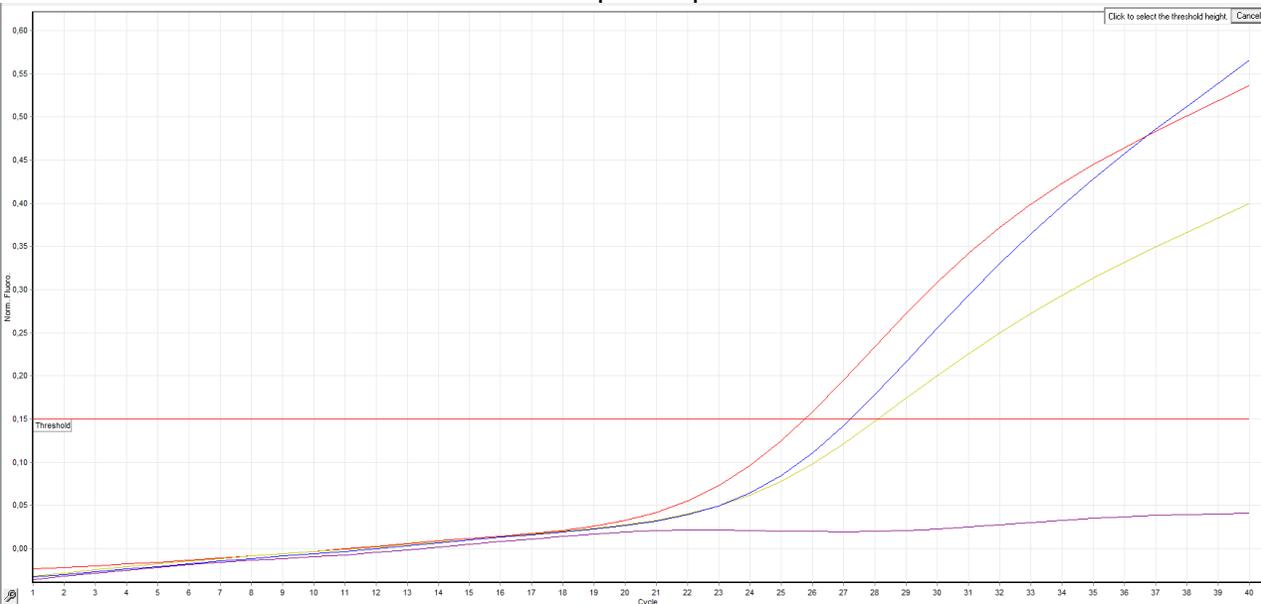
contenente:

- Detection MIX WT 3
 - Detection MIX MUT 3
- e reagenti per amplificare
rs558269137 (2282del4)

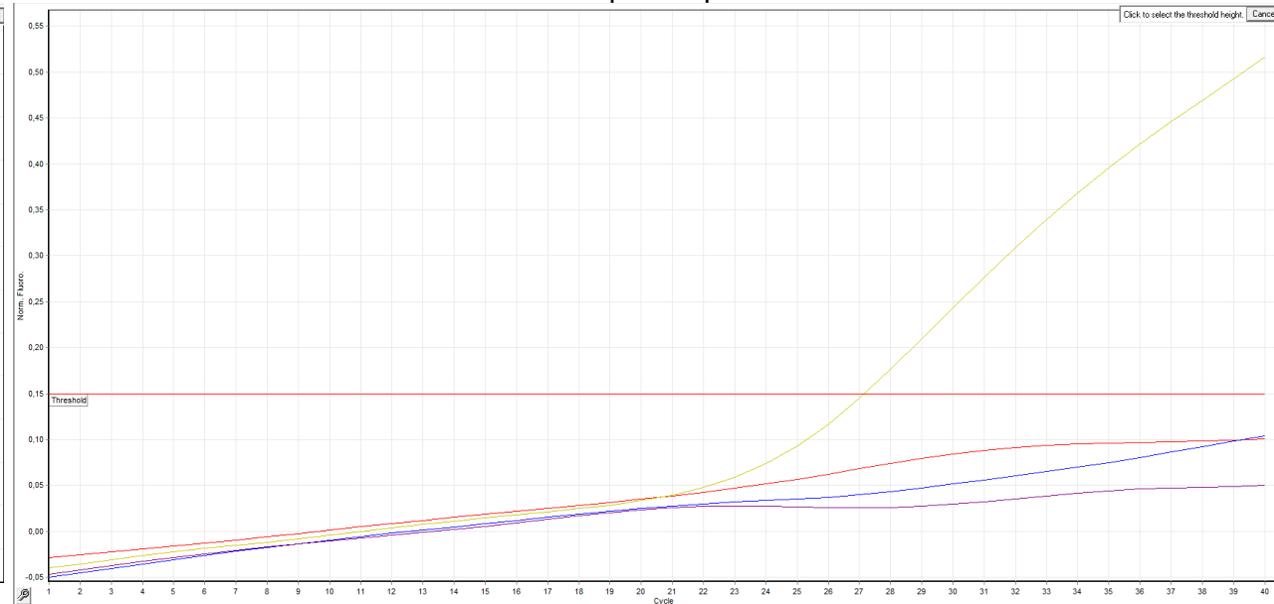
Stesso ciclo e quindi contemporanea amplificazione dello
stesso campione in Real Time PCR

RISULTATO AMPLIFICAZIONE MIX: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX1

Mix con sonda specifica per allele WT



Mix con sonda specifica per allele MUT



No.	Color	MIX Name	Type	Ct
1	Red	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione A	25,76
2	Yellow	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione Hbs777	28,09
3	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione EM	27,23
4	Purple	MIX Pean.HyperDETMIX1	Bianco di reazione	

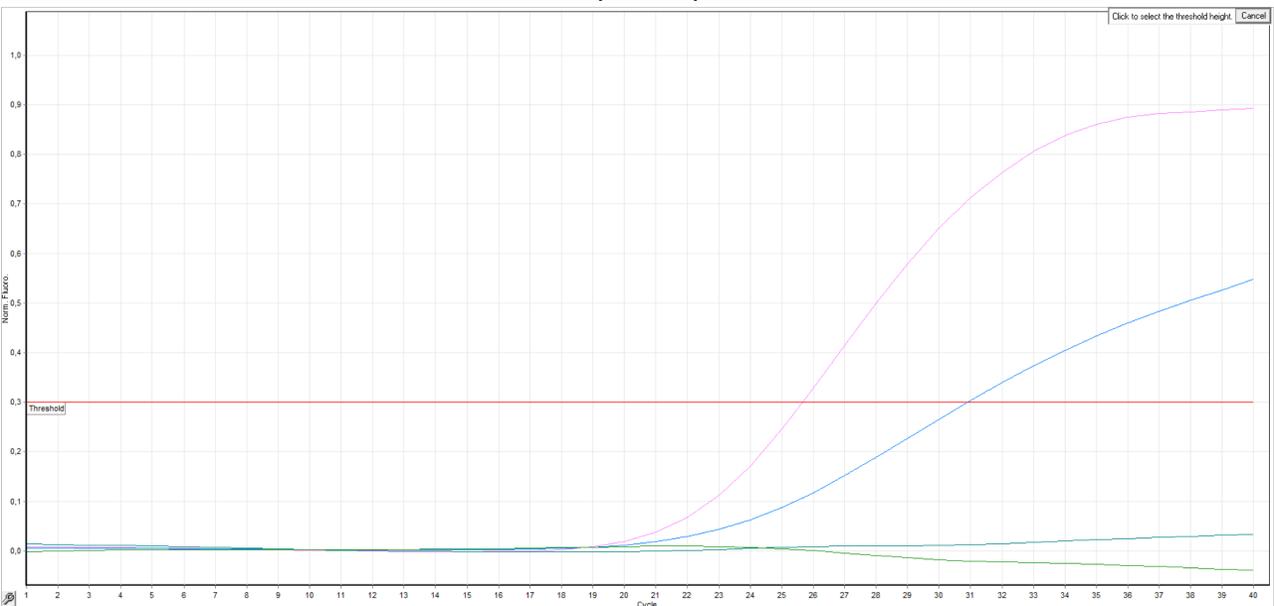
No.	Color	MIX Name	Type	Ct
1	Red	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione A	
2	Yellow	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione Hbs777	27,17
3	Blue	MIX Pean.HyperDETMIX1	campione EM	
4	Purple	MIX Pean.HyperDETMIX1	Bianco di reazione	

ANALISI DEI RISULTATI:

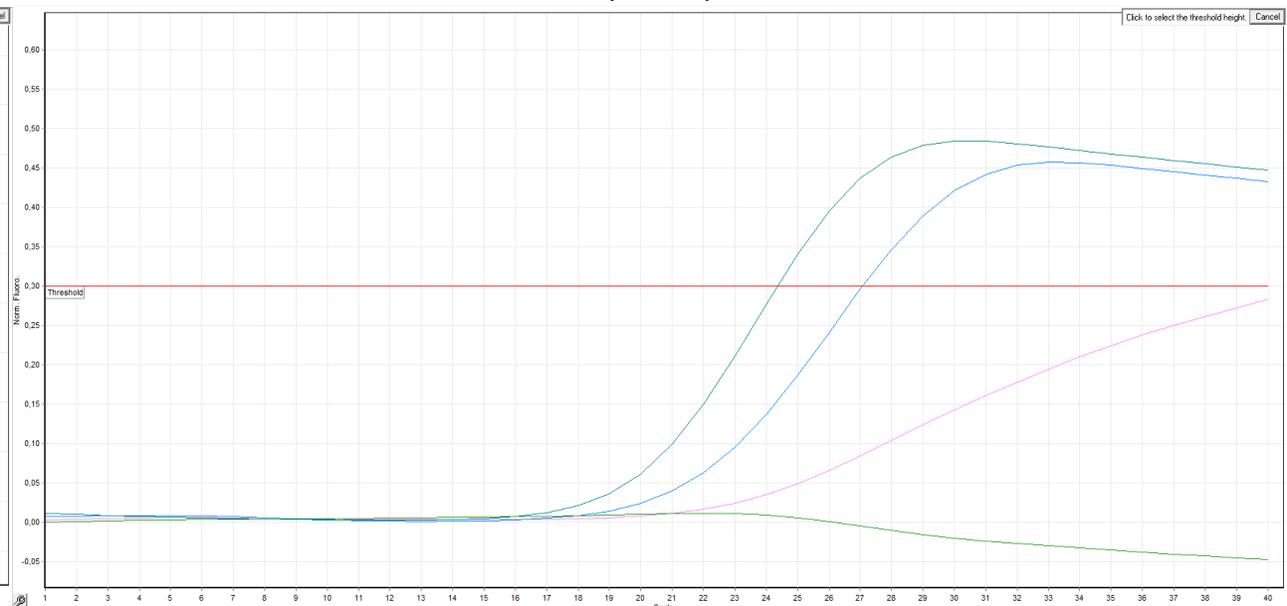
- Campione 1 omozigote per allele WT
- Campione 2 eterozigote
- Campione 3 omozigote per allele WT

RISULTATO AMPLIFICAZIONE MIX: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX2

Mix con sonda specifica per allele WT



Mix con sonda specifica per allele MUT



No.	Color	MIX Name	Type	Ct
5	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione A	25,67
6	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione HZ	30,91
7	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione B	
9	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	Bianco di reazione	

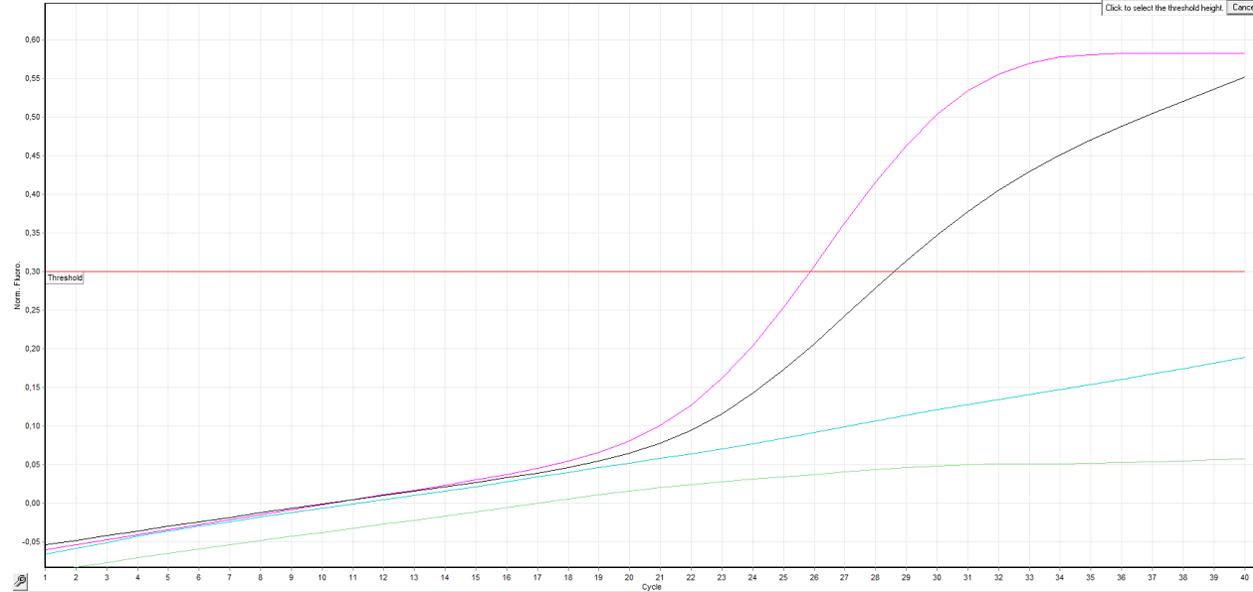
No.	Color	MIX Name	Type	Ct
5	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione A	
6	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione HZ	27,08
7	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	campione B	24,35
9	■	MIX Pean.HyperDETMIX2	Bianco di reazione	

ANALISI DEI RISULTATI:

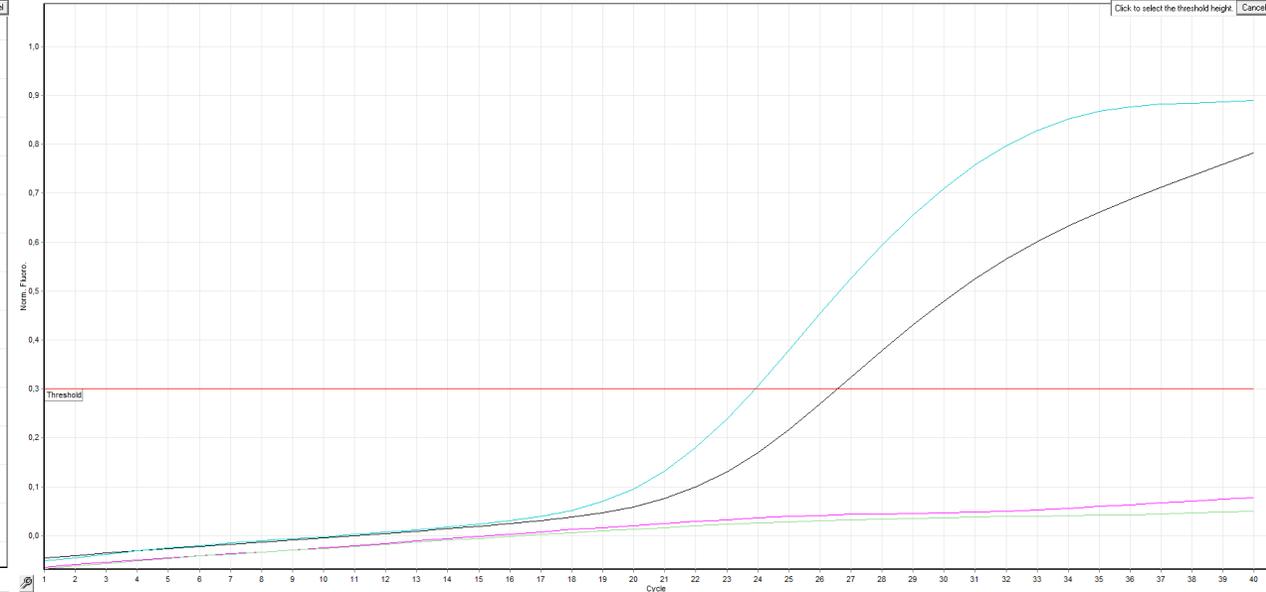
- Campione 5 omozigote per allele WT
- Campione 6 eterozigote
- Campione 7 omozigote per allele MUT

RISULTATO AMPLIFICAZIONE MIX: Peanut Hypersensitivity Predisposition Detection MIX2

Mix con sonda specifica per allele WT



Mix con sonda specifica per allele MUT



No.	Color	MIX Name	Type	Ct
10	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione A	25,87
11	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione HZ	28,59
12	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione C	
14	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	Bianco di reazione	

No.	Color	MIX Name	Type	Ct
10	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione A	
11	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione HZ	26,57
12	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	campione C	23,91
14	■	MIX Pean.HyperDETMIX3	Bianco di reazione	

ANALISI DEI RISULTATI:

- Campione 10 omozigote per allele WT
- Campione 11 eterozigote
- Campione 12 omozigote per allele MUT

PROTOTIPO KIT:



CONCLUSIONI:

Il kit diagnostico messo a punto è in grado di valutare la predisposizione genetica all'allergia alle arachidi permettendo così di avere una diagnosi preventiva e di individuare all'interno di un gruppo familiare le persone predisposte al fine di intraprendere le più idonee misure preventive.

Analizzare un singolo campione con 3 diverse mix con l'uso della tecnica della Real-Time permette una rapida e precisa analisi dei polimorfismi garantendo:

- sensibilità
- specificità