



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE

XXI CICLO

*“Analisi strutturale e funzionale di 5 nuove mutazioni del
gene CYP21A2 in pazienti affetti da deficit della 21-
idrossilasi”*

Dott.ssa Mrak Elisabetta

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof.ssa Ottavia Porzio

Coordinatore: Prof. Giorgio Federici

Indice

INTRODUZIONE	2
1. Sindrome Adrenogenitale	3
1.1 Cascata steroidogenica surrenalica	6
1.2 Fisiopatologia della SAG	
1.3 Diagnosi	10
1.4 Trattamento	12
2. Genetica molecolare della SAG	14
2.1 Ricombinazione de Novo	21
2.2 Correlazione tra genotipo e fenotipo	23
PARTE SPERIMENTALE	24
Scopo della Tesi	25
3. MATERIALI E METODI	27
3.1 Estrazione DNA genomico	27
3.2 PCR gene specifica e sequenziamento	29
3.3 Protein Modelling	32
3.4 Amplificazione del plasmide pCMV4-CYP21A2 e mutagenesi sito diretta	33
3.5 Espressione in Vitro della 21 α -idrossilasi: colture cellulari e trasfezioni	42
3.6 Saggio β -galattosidasi	43
3.7 Immunofluorescenza	44
3.8 Studio dell' attività enzimatica e Thin Layer chromatography	45
4. RISULTATI	48
4.1 Analisi molecolare	49
4.2 Protein Modelling	54
4.3 Immunofluorescenza	57
4.4 Studio attività enzimatica	59
5. DISCUSSIONE	61
6. BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUZIONE

1. *Sindrome Adrenogenitale*

Iperplasia surrenalica congenita (SAG) è il termine che insieme a sindromi adreno-genitali viene comunemente usato per descrivere un gruppo di patologie autosomiche recessive dovute alla mancanza di uno degli enzimi che intervengono nella steroidogenesi surrenalica **(1)**. Ciò determina una produzione insufficiente degli ormoni steroidei surrenalici, con conseguente aumento dei metaboliti a monte del blocco enzimatico.

Nella forma più frequente di SAG (circa il 90-95% dei casi) che presenta un deficit funzionale è la “21-idrossilasi” (21-OH), responsabile di una delle tappe che portano alla sintesi di cortisolo e aldosterone, con conseguente blocco della cascata cui ne consegue la produzione. La 21 α -idrossilasi è un enzima appartenente alla famiglia dei citocromi P450 e catalizza la conversione del 17OH-progesterone in 11-deossicortisolo, precursore del cortisolo, e del progesterone in deossicorticosterone, precursore dell’aldosterone.

Deficit della 21 α -idrossilasi che causano quindi l’aumentata produzione dei precursori ormonali quali il 17OH-progesterone (17OHP), e la deviazione della sintesi ormonale verso quei metaboliti che non richiedono tale enzima per la loro sintesi, in particolare gli androgeni surrenalici quali testosterone, androstenedione e, in minor quantità, estrogeni, estrone e estradiolo che richiedono l’enzima aromatasi per la loro sintesi **(2)**.

La conseguente incapacità di sintetizzare quantità sufficienti di cortisolo determina l’aumento del corticotropin relasing hormone (CRH) ipotalamico e dell’ormone adrenocorticotropo (ACTH) ipofisario e l’iperplasia di entrambe le ghiandole surrenaliche.

Difetti enzimatici più gravi determinano inoltre la compromissione della sintesi di aldosterone, necessario per il mantenimento dell’omeostasi del sodio, con conseguente perdita di sale. E’ possibile pertanto distinguere diverse forme cliniche della malattia a seconda della gravità della sintomatologia.

La patologia con esordio neonatale viene indicata come “*forma classica*” (C) a sua volta suddivisa nella forma classica virilizzante semplice (simple virilizing SV), dovuta all’eccesso di androgeni, e con perdita di Sale (Salt Wasting SW). I sintomi appaiono alla nascita, specie nelle femmine, poiché l’eccesso di steroidi androgeni in circolo producono uno sviluppo anomalo

degli organi genitali esterni. Nei maschi tale deficienza può passare inosservata, poiché gli organi genitali appaiono normali e solo in seguito si noteranno una precoce mascolinizzazione e rapido sviluppo fisico.

Nella forma classica con perdita di sali (salt wasting SW) il deficit enzimatico è totale e di conseguenza non vengono prodotti né il cortisolo né l'aldosterone. Il quadro clinico, che insorge precocemente dopo la nascita, è dominato dalle manifestazioni causate dalla carenza di entrambi gli ormoni (insufficienza surrenalica). Nelle prime settimane di vita infatti il neonato, sia maschio che femmina, presenta una sintomatologia complessa caratterizzata da vomito, diarrea, perdita di peso, disidratazione, shock.

La "forma non classica" (NC), anche detta late-onset, ha un esordio più tardivo, non presenta perdita di sale e/o ambiguità dei genitali ma un semplice eccesso di androgeni che può manifestarsi come pubarca precoce, irsutismo, acne o oligospermia nei maschi.

La SAG è la più diffusa tra le affezioni surrenaliche dell'infanzia. La sua frequenza è differente nelle diverse popolazioni e gruppi etnici: è considerata dello 0,2% nella popolazione generale, 1-2% negli spagnoli e negli slavi e 3-4% negli Europei dell'Est. Studi epidemiologici effettuati su varie popolazioni hanno evidenziato nella popolazione italiana una frequenza di 1:15.000 per la forma classica e 1:300 per la forma non classica.

La più alta incidenza della SAG si registra nelle donne di New York (14%), perché la città è caratterizzata da una elevata presenza di Ebrei Ashkenazi che hanno la frequenza maggiore di eterozigosi per il gene CYP21 nella forma non classica. La forma non classica ricorre maggiormente in due popolazioni geograficamente isolate: gli Eschimesi Yupik dell'Alaska occidentale e l'isola francese di "La Reunion" nell'Oceano Indiano. In generale, la SAG classica si verifica in 1 su 10.000-16.000 nascite e la forma non classica 1 su 1.000.

1.1 Cascata steroidogenica surrenalica

La cascata steroidogenica surrenalica che conduce alla sintesi del cortisolo e dell'aldosterone avviene a livello dei surreni, ghiandole endocrine poste in corrispondenza del polo renale.

Ogni ghiandola surrenale è composta da due formazioni, strutturalmente e funzionalmente diverse, la corticale e la midollare, quest'ultima localizzata internamente e completamente circondata dalla corticale. Mentre la midollare è di derivazione nervosa e secreta adrenalina e noradrenalina, la corticale ha un parenchima organizzato in cordoni cellulari che si avvolgono a

formare gomitoli (zona glomerulare), quindi assumono un decorso radiale verso la midollare (zona fascicolata) e infine si uniscono formando una rete grossolana (zona reticolare).

Gli ormoni secreti dalla zona glomerulare sono i mineralcorticoidi quali aldosterone e desossicorticosterone, che agiscono sul livello circolante degli elettroliti. I mineralcorticoidi sono ormoni essenziali nella regolazione del bilancio idrosalino ed agiscono prevalentemente sul tubulo contorto distale del rene, sulla mucosa gastrica e sulle ghiandole salivari e sudoripare.

La produzione giornaliera di aldosterone dipende dalla quantità di sodio assunta con la dieta ed è di circa 50-200 µg/ 24 ore. La secrezione dell'aldosterone è principalmente sotto il controllo della renina, ormone prodotto dall'apparato iuxtaglomerulare renale in condizioni di ridotta perfusione renale.

La renina è un enzima che attiva la conversione dell'angiotensinogeno in angiotensina I, peptide che per azione dell'enzima convertitore dell'angiotensina, ACE, espresso sulla membrana di cellule epatiche e polmonari, viene convertito in angiotensina II.

Al livello surrenale, l'angiotensina II viene convertita in aldosterone. Anche le concentrazioni del potassio modulano la secrezione dell'aldosterone, che risulta inibita nell'ipopotassiemia.

A differenza del cortisolo, la secrezione dell'aldosterone non presenta un ritmo circadiano, ma aumenta nella posizione ortostatica. La sua funzione principale è stimolare il riassorbimento attivo del sodio da parte dei tubuli renali con conseguente aumento dell'escrezione urinaria degli ioni idrogeno e potassio. L'azione dell'ormone porta ad un aumento del volume idrico extracellulare, della volemia e della pressione nei vasi sanguigni.

La zona fascicolata secerne i *glucocorticoidi* quali cortisolo e corticosterone, che agiscono sul metabolismo dei carboidrati. Il cortisolo è il principale glucocorticoide con una produzione giornaliera di circa 8-25 mg. Ha recettori intracellulari specifici che una volta attivati promuovono una cascata di eventi nucleari che terminano con vari effetti tra cui i più importanti sono l' aumento della gluconeogenesi, l'aumento del catabolismo muscolare e la diminuzione della captazione e del metabolismo del glucosio. Il cortisolo inoltre agisce sugli osteoblasti inibendo l'osteogenesi e aumentando il riassorbimento osseo.

Numerosi fattori, inclusi stress emozionali e fisici, influenzano i livelli plasmatici di cortisolo controllati fisiologicamente con ritmo circadiano dall' ormone adrenocorticotropo, ACTH, in risposta alla secrezione ipotalamica di CRH e ipofisaria di vasopressina (**3**). Il cortisolo a sua volta agisce come regolatore negativo della sintesi di ACTH e di CRH .

L'ACTH è un peptide di 39 amminoacidi che deriva dal clivaggio di un precursore proteico sintetizzato dall'ipofisi anteriore, la pro-opiomelanocortina. L'ormone agisce attraverso un recettore accoppiato a proteine G che genera un aumento citoplasmatico di CAMP.

Il cAMP stimola un rapido trasporto di colesterolo nel mitocondrio e induce la trascrizione dei geni che codificano gli enzimi coinvolti nella sintesi di colesterolo (4). L'ACTH inoltre promuove l'uptake cellulare di colesterolo dalle proteine citoplasmatiche, agisce sul mantenimento delle dimensioni delle ghiandole surrenali e stimola i melanociti aumentando, se secreto in eccesso, la pigmentazione della pelle. Il CRH è il principale fattore di origine ipotalamica che controlla la secrezione di ACTH e può agire sinergicamente nell'induzione della secrezione ipofisaria di ACTH con la vasopressina, un peptide prodotto dall'ipofisi posteriore.

La zona reticolare infine secerne *androgeni* che stimolano la sintesi proteica, quali androstenedione e deidroepiandrosterone. Inoltre dall'androstenedione derivano piccole quantità di testosterone e deidrotestosterone (ormoni maschili), di estrone ed estradiolo (ormoni femminili). Anche la produzione degli androgeni surrenalici è stimolata dall'ACTH, ma è stata ipotizzata la presenza di un meccanismo specifico di regolazione. Il deidroepiandrosterone (DHEA) è il principale androgeno surrenalico che esercita effetti anabolizzanti e mascolinizanti, con un effetto cinque volte inferiore rispetto agli androgeni testicolari. Il secondo androgeno surrenalico è l'androstenedione, che ha una attività analoga al DHEA ma una potenza inferiore. Nella corteccia surrenalica, sia nei maschi che nelle femmine, una piccola frazione del DHEA viene trasformata in estradiolo, mentre l'androstenedione viene trasformato in estrone.

Lo step limitante della steroidogenesi surrenalica è il trasporto del colesterolo dalle riserve citoplasmatiche alla membrana interna mitocondriale, trasporto mediato da proteine regolatorie chiamate StAR. Qui il colesterolo viene convertito in pregnenolone (***Figura 1***).

La reazione è catalizzata nella prima fase, dall'enzima colesterolo desmolasi, CYP11A, che rompe la catena laterale producendo il 5-pregnenolone ed aldeide isocaproica; la seconda fase si traduce nel distacco di 6 atomi di carbonio dalla catena laterale del colesterolo sotto l'influenza dell'enzima mitocondriale citocromo P450, colesterolo-idrossilasi. Il pregnenolone è il comune precursore di tutti gli altri steroidi.

Nella zona glomerulare il pregnenolone viene convertito in progesterone ad opera dell'enzima 3 β -idrossisteroide deidrogenasi (3 β -HSD). Il progesterone viene idrossilato nel reticolo endoplasmatico dalla 21 α -idrossilasi (CYP21) generando deossicorticosterone DOC. L'aldosterone viene prodotto attraverso reazioni sequenziali catalizzate dallo stesso enzima, aldosterone sintasi, CYP11B2: il DOC viene infatti idrossilato a corticosterone e poi ossidato generando aldosterone.

Nella zona fascicolata l'enzima 17 α -idrossilasi, CYP17, converte il pregnenolone in 17 α -idrossipregnenolone, che diventa substrato della 3 β -idrossisteroide deidrogenasi per produrre 17 α -idrossiprogesterone. Questo a sua volta viene idrossilato dalla CYP21 in 11-deossicortisolo che è convertito nei mitocondri in cortisolo dal 11 β -idrossilasi, CYP11B1.

Nella zona reticolare e nelle gonadi la CYP17 produce a partire dal 17 α -idrossipregnenolone il deidroepiandrosterone, DHEA. Il DHEA viene convertito dalla 3 β -HSD in androstenedione.

Nelle gonadi l'androstenedione viene ridotto a testosterone dalla 17 β -idrossisteroide deidrogenasi. Il testosterone a sua volta nei tessuti bersaglio viene metabolizzato in diidrot testosterone dalla 5 α -reduttasi. Durante la pubertà nelle ovaie il testosterone viene invece convertito insieme all'androstenedione rispettivamente in estradiolo e estrone.

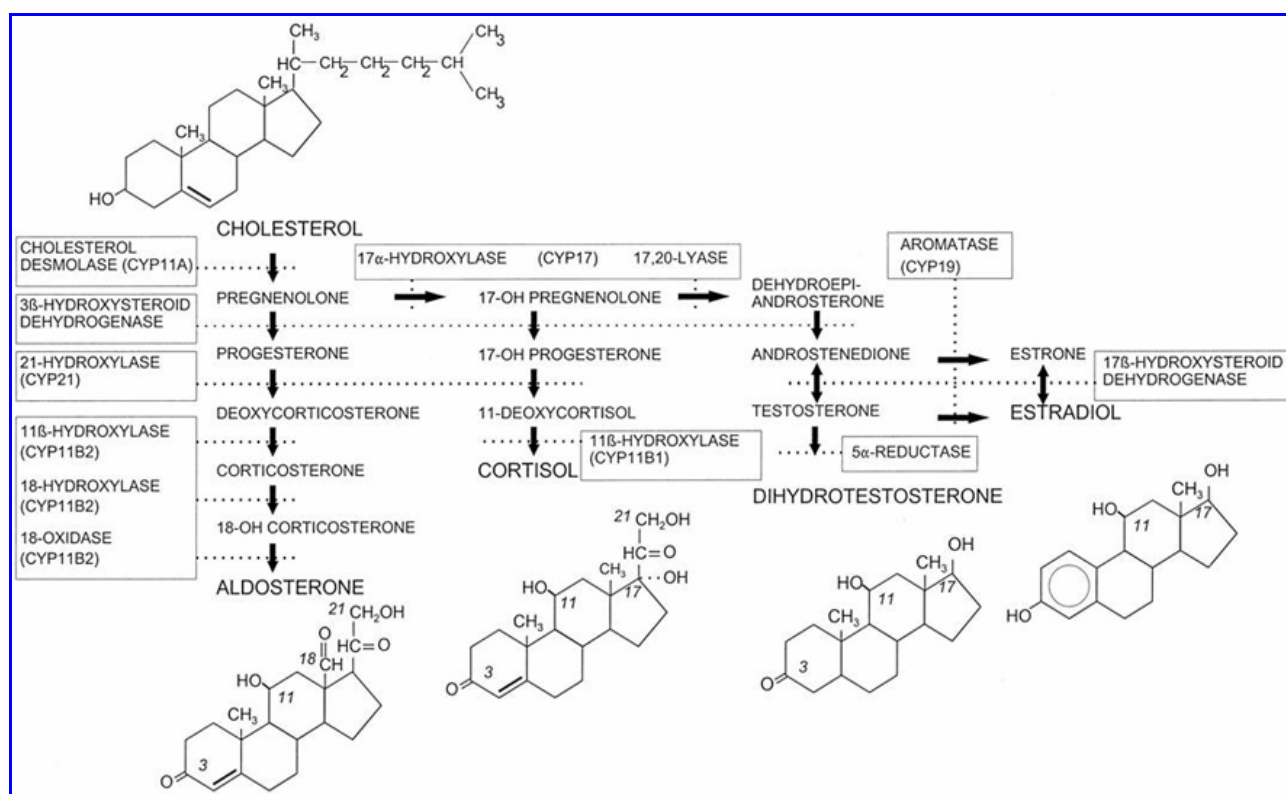


Figura 1. Biosintesi degli steroidi surrenalici

1.2 Fisiopatologia della SAG

A seconda della gravità del deficit enzimatico, la sindrome può manifestarsi come un continuum di quadri fenotipici che vanno dalle forme classiche più gravi con perdita di sali e virilizzazione completa dei genitali esterni nelle femmine, ai quadri più lievi delle forme non classiche.

FORMA CLASSICA:

“SALT WASTING” (SW)

Nella forma classica con perdita di sali, che colpisce un terzo dei pazienti, il deficit enzimatico è totale e di conseguenza non vengono prodotti sia il cortisolo sia l'aldosterone. Il deficit dell'aldosterone determina una elevata escrezione di sodio dal rene, dal colon e dalle ghiandole sudoripare, una bassa concentrazione di sodio plasmatico e una ridotta escrezione di potassio, effetti potenziati dal concomitante deficit del cortisolo. L'organismo diventa incapace di eliminare acqua libera con possibilità di grave disidratazione e shock. La perdita di sale presenta sintomi aspecifici che si verificano nelle prime settimane di vita: scarso appetito, vomito, diarrea, letargia e difficoltà ad aumentare di peso. Le forme più gravi presentano già alla 1-4 settimana di vita: iponatremia, acidosi metabolica, ipercalcemia, iperreninemia fino allo shock ipovolemico. La “crisi surrenale” può risultare minacciosa per la vita se non si interviene tempestivamente; tale evento risulta essere più critico per i neonati maschi, poiché l'assenza dell'ambiguità genitale non permette al medico di individuare repentinamente la sindrome prima dell'inizio della disidratazione e/o shock.

SIMPLE VIRILIZING:

Questo genere di paziente non è in grado di produrre sufficienti quantità di cortisolo ma è perfettamente in grado di produrre adeguate quantità di aldosterone e quindi di mantenere un corretto bilancio elettrolitico.

Gli androgeni non richiedono l'attività della 21 α -idrossilasi per la loro sintesi ma la mancanza di un meccanismo di feedback negativo esercitato normalmente dal cortisolo fa aumentare i livelli di ACTH ipofisario con conseguente iperplasia surrenalica ed aumento della produzione di androgeni (iperandrogenismo) (5).

Fin dalla vita fetale infatti, l'eccessiva quantità di ormoni androgeni circolanti interferisce sui fenomeni di formazione dell'apparato genitale, nei soggetti di sesso femminile pertanto le grandi labbra si possono saldare più o meno completamente a dar luogo a una formazione simile allo scroto, il clitoride aumenta nettamente di dimensioni (ipertrofia clitoridea) sino ad assumere nei casi più gravi l'aspetto di un pene, mentre le vie urinarie e la vagina possono riunirsi in una sola cavità (seno urogenitale) con un unico sbocco all'esterno, spesso alla base del clitoride.

In alcuni casi le modificazioni sono così importanti che i neonati possono essere scambiati per dei maschietti e si può avere pertanto un'erronea attribuzione di sesso. I genitali interni (l'utero, le ovaie e le tube) non vengono danneggiati da questo squilibrio ormonale e si sviluppano perciò regolarmente, in accordo con il sesso genetico.

Successivamente si può rilevare la comparsa prematura di peluria pubica ed ascellare, di acne, uno sviluppo delle masse muscolari, un cambio della tonalità della voce con una crescita accelerata. Sebbene i genitali interni siano femminili, lo sviluppo mammario e la comparsa di un ciclo mestruale non si verificano fino a quando l'eccessiva produzione di androgeni non venga soppressa da una adeguata terapia.

La severità della virilizzazione esterna può essere classificata usando una scala a 5 punti sviluppata da Prader (**Figura 2**).

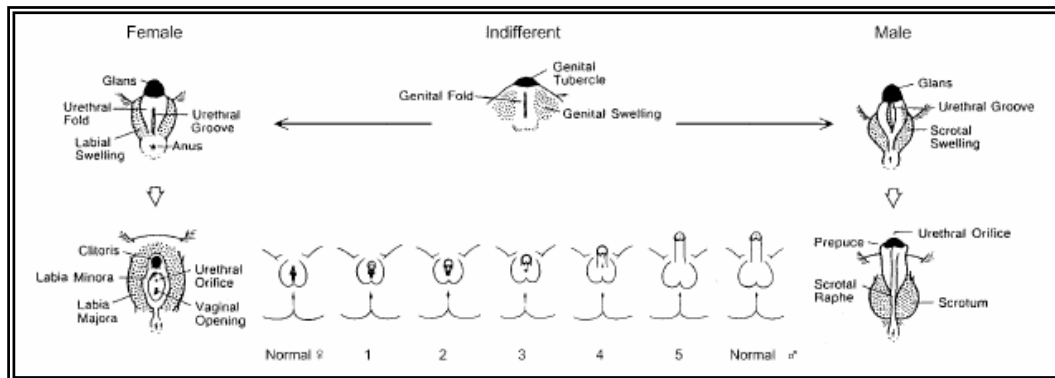


Figura 2. Scala di Prader per la differenziazione dei genitali esterni.

Al contrario, invece, i maschi affetti, alla nascita, non presentano segni genitali della patologia ad eccezione di una variabile, e comunque lieve, iperpigmentazione dello scroto e macrogenitosomia. Pertanto nei maschi la diagnosi della patologia alla nascita viene spesso misconosciuta a meno che non vi sia un concomitante deficit di aldosterone, che determina forti crisi ipotensive e perdita di sale, o non venga effettuato un adeguato screening neonatale (2,3).

Nei maschi si ha nei primi anni di vita, uno sviluppo precoce dei genitali esterni, il pene presenta dimensioni maggiori rispetto all'età, mentre i testicoli rimangono di proporzioni infantili (pseudopubertà precoce), può comparire peluria pubica o ascellare, la crescita risulta accelerata, pertanto sono molto più alti dei bambini della stessa età (**Figura 3**). L'eccesso di androgeni non dà significativi ed evidenti effetti sul differenziamento sessuale maschile e sulla funzione riproduttiva; la maggioranza dei maschi affetti da SAG è generalmente fertile, ad eccezione di pochi casi di infertilità e impotenza.

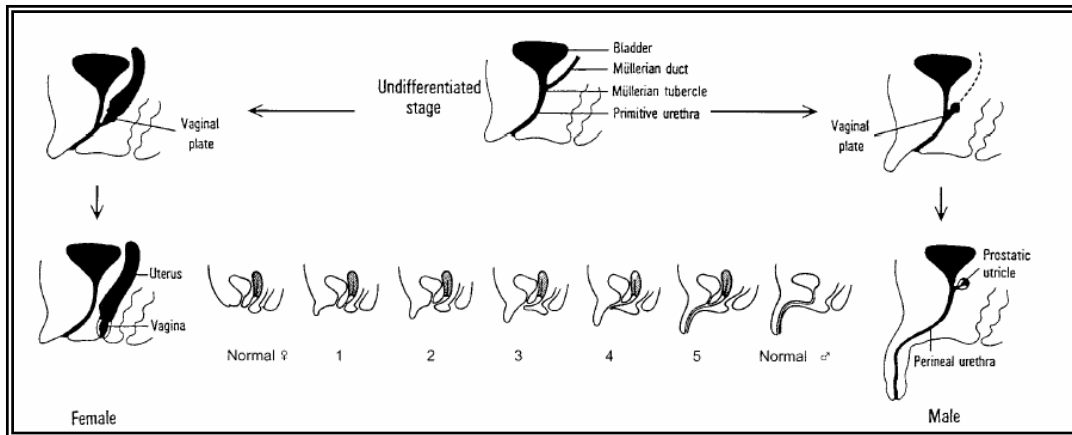


Figura 3. Differenziazione normale ed anomala del seno urogenitale e dei genitali esterni.

In entrambi i sessi, per effetto dell'eccessiva quantità degli ormoni androgeni in circolo, anche le ossa crescono più rapidamente, questo compromette la statura finale che è in genere più bassa della media perché la chiusura prematura delle epifisi ossee determina un arresto di crescita in tempo relativamente breve (6-10).

FORMA NON CLASSICA

La *sindrome adrenogenitale non classica (NC)* comprende la forma criptica, asintomatica, e la forma ad insorgenza tardiva ("late onset"), caratterizzata da iperandrogenismo che si manifesta in epoca postnatale.

La SAG "late onset" è dovuta a mutazioni del gene che comportano una riduzione dell'attività enzimatica variabile tra il 30 e l'80%. Questa condizione risulta essere il difetto genetico autosomico recessivo più frequente, con una prevalenza di 1/300 nella razza caucasica.

Il quadro clinico della SAG NC è estremamente variabile in quanto i segni di iperandrogenismo possono comparire ad ogni età. La severità dei sintomi e segni varia largamente da individui asintomatici a individui con adrenarca precoce (3-4 anni), grave acne cistica (33%), irsutismo (60%), oligomenorrea (54%) e raramente infertilità.

I segni tipici della SAG NC possono comparire nell'età infantile e sono costituiti dall'accelerazione della crescita e della maturazione ossea con aumento del rapporto età ossea/età staturale e pubarca precoce. Le femmine non classiche non presentano ambiguità genitale esterna alla nascita (condizione normale o leggera clitoridemegalia), i maschi non classici diagnosticati dopo la pubertà presentano acne, oligospermia, infertilità e raramente ingrandimento testicolare unilaterale. La statura finale dei soggetti SAG può risultare inferiore alla media della popolazione generale ed al target genetico (2,3).

La forma non classica criptica è completamente asintomatica e viene riconosciuta quasi unicamente nel corso di studi genetici e con l'esecuzione di test ormonali nei familiari di pazienti affetti da deficit della 21-idrossilasi, in questi casi tali indagini danno risultati simili a quelli riscontrabili nei pazienti con forma ad insorgenza tardiva.

ETEROZIGOTI

Sono indicati come eterozigoti i pazienti portatori di un singolo allele mutato. Le mamme di bambine affette da SAG C sembrano non mostrare alcun segno di iperandrogenismo rispetto ai casi-controllo: uno studio condotto su bambine afferenti ad una clinica pediatrica per pubarca prematuro o irsutismo ha mostrato invece una più elevata prevalenza di mutazioni eterozigoti del CYP21 rispetto a 80 adulti di controllo.

E' stato stimato che la frequenza dell'eterozigosi della SAG NC è di circa il 10% della popolazione generale e del 1,5% per la forma C, questi dati dimostrano pertanto che lo stato di portatore non determina alcuna alterazione della riproduzione. Lo screening di uomini con infertilità ha riscontrato una normale prevalenza del deficit della 21-idrossilasi o di eterozigosi del CYP21 (2).

1.3 Diagnosi

Lo screening neonatale della sindrome adrenogenitale permette di ridurre morbilità e mortalità infantile causata soprattutto dalla forma con perdita di sali. Infatti mentre la diagnosi è più semplice nelle bambine perchè la presenza di genitali ambigui allerta il medico, nei bambini è più facile che la sindrome non venga diagnosticata repentinamente prima dell'inizio della disidratazione e dello shock (9,10).

Il sospetto di SAG da deficit della 21 α -idrossilasi viene confermato da un semplice dosaggio ormonale di 17OH-progesterone, principale marker per la diagnosi di questa sindrome, ma è preferibile un profilo ormonale completo degli ormoni surrenalici prima e dopo un'ora dalla somministrazione di ACTH. In questo modo è possibile identificare repentinamente difetti nella cascata steroidogenica (11), tenendo conto che la sindrome adrenogenitale con perdita di sali è la principale causa di pseudoermafroditismo nelle bambine. A riguardo, il test utile per confermare l'identificazione genetica del neonato è lo screening del cariotipo.

E possibile inoltre una diagnosi prenatale basata sul dosaggio del 17OH-progesterone nel liquido amniotico ottenuto mediante amniocentesi (12), oltre che sullo screening genetico effettuabile sugli amniociti prelevati (13,14).

E' raro che una "crisi surrenale" si presenti nella prima settimana di vita, ma molti medici preferiscono avere già nei primi giorni dalla nascita un esame completo degli elettroliti per verificare eventuali condizioni di iponatremia e ipercalcemia in neonati con sindrome adrenogenitale. Neonati prematuri o sofferenti possono avere livelli di 17OH-progesterone più elevati rispetto agli altri neonati. Per questo il dosaggio ormonale prima e dopo stimolo con ACTH è consigliabile dopo le prime 24 ore di vita, perchè se il prelievo viene fatto subito dopo la nascita aumenta la percentuale di falsi positivi e falsi negativi.

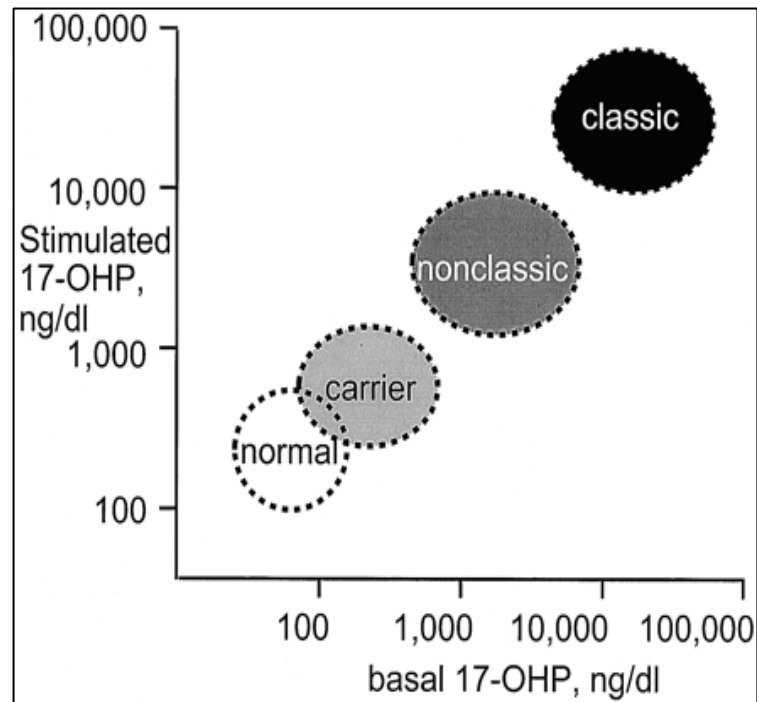
Un altro motivo che avvalorava l'utilità del monitoraggio del 17OH-progesterone prima e dopo stimolo è che l'ormone in questione può essere elevato a causa di diversi difetti enzimatici oltre al deficit della 21 α -idrossilasi, quali deficit della 11 β -idrossilasi o anche deficit della 3 β -idrossisteroide deidrogenasi. Per questo, come anticipato prima, ottimale è il monitoraggio completo degli ormoni surrenalici, quali 17OH-progesterone, cortisolo, DOC, 11-deossicortisolo, 17OH-pregnenolone, DHEA e androstenedione a 0 e 60 minuti dallo stimolo, senza escludere il principale metabolita del 17OH-progesterone riscontrabile nelle urine, il pregnanetriolo.

Il bambino normale presenta valori basali di 17OH-progesterone generalmente inferiori (o solo di poco superiori) ai 100 ng/dl, mentre il bambino affetto da una forma classica del difetto mostra livelli di 17OH-progesterone molto elevati già in condizioni basali (spesso superiori a 10.000 ng/dl), tali da non lasciare dubbi diagnostici. In particolare pazienti con perdita di sali hanno valori di 17OHP superiori a 100.000 ng/dl; i pazienti con semplice virilizzazione hanno livelli compresi tra 10.000-30.000 ng/dl e i pazienti non classici livelli di 1.500-10.000 ng/dl.

Il problema insorge per i soggetti eterozigoti che presentano livelli basali di 17OHP generalmente superiori a 200 ng/dl, potendo tuttavia discordarsi di poco da tale limite e quindi sovrapponendosi con i valori dei soggetti normali (Figura 4); in particolare per i soggetti eterozigoti è quindi necessario il valore del 17OHP dopo stimolo con ACTH, valore che generalmente supera i 500-600 ng/dl.

I diversi studi sembrano evidenziare una associazione positiva tra mutazione in eterozigosi e quadro clinico di iperandrogenismo, mentre scarsa risulta la correlazione tra elevati valori di 17OH-progesterone e la condizione di portatore di una sola mutazione.

Oltre al 17OH-progesterone, marcatori utilizzati per valutare il deficit dell'aldosterone sono l'ipoaldosteronismo, elevati livelli di PRA, attività reninica plasmatica, e il rapporto PRA/aldosterone nelle urine delle 24 h.



Normogramma di risposta al test di stimolo con ACTH

1.4 Trattamento

Farmacologico

Lo scopo della terapia della sindrome adrenogenitale consiste nella correzione del deficit dei glucocorticoidi e talvolta dei mineralcorticoidi.

I glucocorticoidi sopprimono l'eccessiva secrezione di CRH e ACTH, riducendo i livelli ormonali degli steroidi sessuali surrenalici al fine di evitare la virilizzazione genitale e permettere un normale accrescimento staturale e puberale. Nell'adulto il trattamento deve essere continuato per evitare l'iperandrogenismo e l'iperplasia surrenalica e/o ipofisaria, mantenere il normale ritmo mestruale nelle donne e la fertilità nell'uomo.

Il glucocorticoide principalmente utilizzato nella terapia sostitutiva è l'idrocortisone, somministrato con una posologia più elevata nel periodo neonatale, per raggiungere livelli più bassi nell'infanzia e nell'età adulta, con un incremento durante l'epoca puberale. L'idrocortisone rappresenta il farmaco per eccellenza nel trattamento della SAG perché influenza di meno l'accrescimento staturale grazie alla sua breve emivita. Dopo la fusione epifisaria si utilizzano come terapia di mantenimento prednisone o dexametasone, con dosi che non dovrebbero superare l'equivalente di idrocortisone.

Nelle forme con perdita di sali il trattamento prevede l'aggiunta di fluorcortisone, la cui posologia presenta una variabilità in proporzione inversa all'età, generalmente sospesa nell'adulto. E' necessario monitorare l'efficacia del trattamento valutando i livelli di 17-OHP, androstenedione e ACTH; nei pazienti prepuberi si considera anche la concentrazione plasmatica del testosterone come parametro utile per valutare l'efficacia terapeutica, mentre nelle forme con perdita di sali si monitorizzerà il livello di attività reninica plasmatica.

I bambini affetti da SAG vengono sottoposti ad una valutazione annuale dell'età ossea mediante Rx del polso, e ad una valutazione auxologica semestrale. Nei soggetti che ricevono adeguate dosi di glucocorticoidi la densità minerale dell'osso non appare compromessa.

Per le forme non classiche è richiesta una valutazione caso per caso sulla necessità, la modalità e il tipo di trattamento da effettuare. Il trattamento dovrebbe essere iniziato quando si manifestano i segni e i sintomi di iperandrogenismo. Conseguenze negative dovute ad inadeguato trattamento sono la virilizzazione femminile e compromissione della crescita lineare.

Un interessante spiraglio terapeutico sembra venire da recenti studi sperimentali su modello murino, in cui l'iniezione intrasurrenalica di un vettore virale contenente il gene umano CYP21 ha consentito l'espressione del gene in forma biologicamente attiva, con una netta riduzione delle anomalie morfologiche della corteccia surrenalica dell'animale (2).

Chirurgico

L'intervento chirurgico nella correzione delle anomalie genitali è oggetto di continuo dibattito. L'assegnazione del sesso dovrebbe corrispondere al sesso genetico\gonadico ma non sempre ciò è evidente e fattibile, soprattutto quando sono presenti genitali esterni maschili in bambine cresciute con una educazione maschile.

Scopo dell'intervento di genito-plastica femminilizzante è ricreare l'anatomia dei genitali esterni al fine di dare alla paziente con pseudoermafroditismo una normalità estetica e funzionale.

Obiettivi dell'intervento sono:

- asportazione di gonadi disgeniche o discordanti con il sesso; confezionamento di un clitoride di dimensioni opportune e dotato di sensibilità; separazione del seno urogenitale con formazione di due meati distinti;
- areazione di un introito vaginale o di una vagina atta a garantire rapporti sessuali completi; ricostruzione delle piccole e grandi labbra a scopo estetico.

L'età media attualmente consigliata per l'intervento chirurgico è di circa 16 mesi. Il 60% delle donne sottoposte a chirurgia correttiva è in grado di avere soddisfacenti rapporti sessuali,

concepimenti spontanei e gravidanze complete. Nella maggior parte dei casi si ricorre al parto cesareo mentre occasionalmente è possibile un parto vaginale **(2)**.

2. Genetica molecolare della SAG da deficit della 21 α -idrossilasi

La 21 α -idrossilasi (CYP21) è un enzima microsomiale appartenente alla famiglia dei citocromi P450 che converte il 17OH-progesterone in 11-deossicortisolo e il progesterone in deossicorticosterone. Come tutti i citocromi, l'enzima accetta elettroni dalla citocromo P450 reduttasi NADPH-dipendente riducendo così l'ossigeno molecolare e idrossilando il substrato **(15)**. La CYP21 umana è costituita da 494 amminoacidi (una variante normale presenta una leucina extra al dominio idrofobico N-terminale) ed ha una massa molecolare di circa 55 kDa (**Figura 4**).

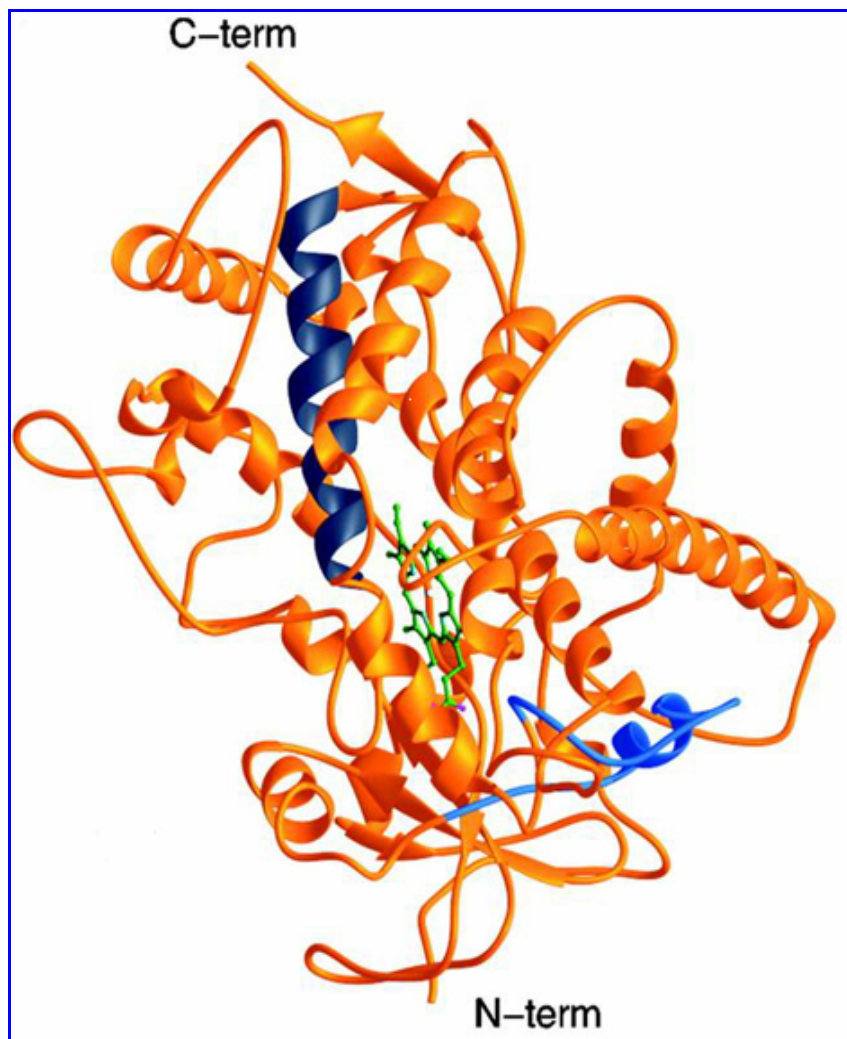


Figura 4 : Modello tridimensionale della CYP21

Il gene che codifica la 21 α -idrossilasi, CYP21A2 e il suo pseudogene, CYP21A1P (chiamati in passato rispettivamente CYP21 e CYP21P), sono localizzati nel complesso maggiore di

istocompatibilità umano HLA sul cromosoma 6 (6p21.3), adiacente e alternati ai geni C4B e C4A codificanti il quarto componente del complemento (16) (**Figura 6**).

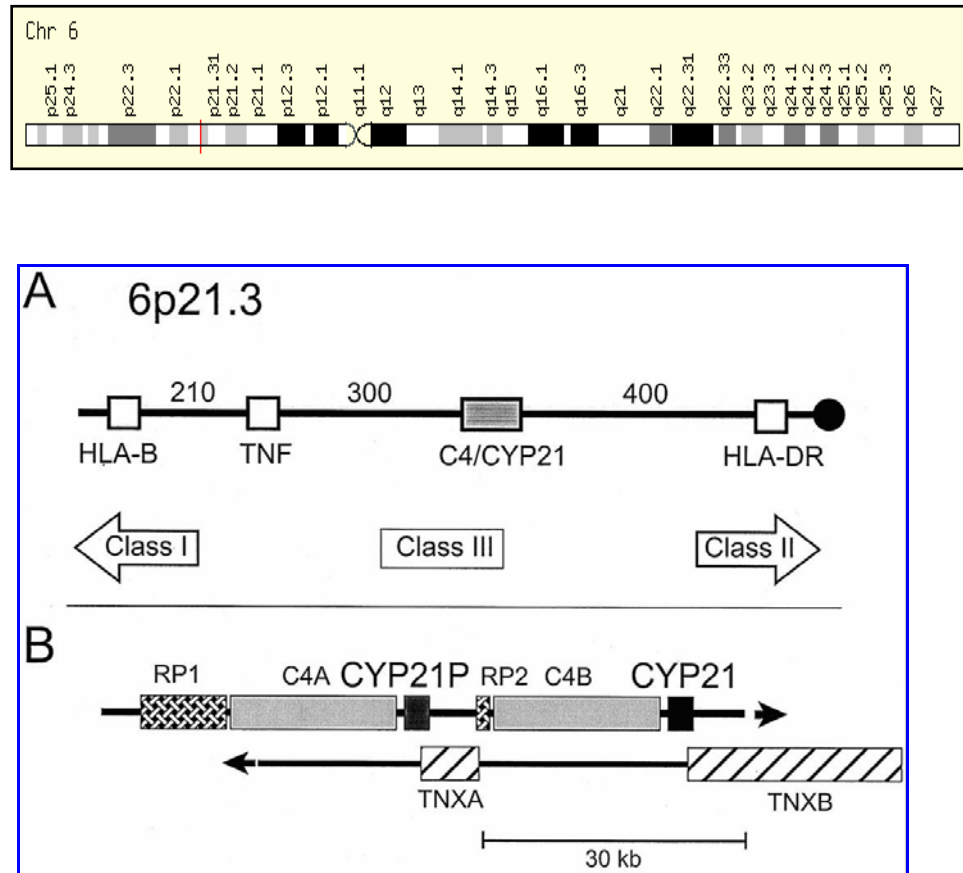


Figura 6: Localizzazione del gene CYP21 all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità HLA sul cromosoma 6p21.3.

Al 5' del gene C4A è presente il gene RP1 che codifica per una proteina nucleare simile ad una DNAelicasa. Una copia trunca di questo gene, RP2, è localizzata tra CYP21A1P e C4B (4,17). CYP21, C4 e RP sono trascritti nella stessa direzione. CYP21A2 si sovrappone parzialmente sullo strand opposto di DNA ad un gene, TNXB, che produce una proteina della matrice extracellulare, la tenascina-X. CYP21A1P si sovrappone invece ad una copia trunca del gene della tenascina, TNXA, che non codifica una proteina funzionale.

Gene e pseudogene contengono ognuno 10 esoni ed hanno una identità di sequenza del 98% negli esoni e del 96% negli introni. Anche il CYP21A1P è trascritto, ad un livello basale però pari al 10-20% rispetto al livello di trascrizione del CYP21A2. Di tale differenza è responsabile una regione di 176 nucleotidi al 5' del gene CYP21A2, che differisce dalla stessa regione al 5' del gene CYP21A1P di soli 4 nucleotidi (**Figura 7**).

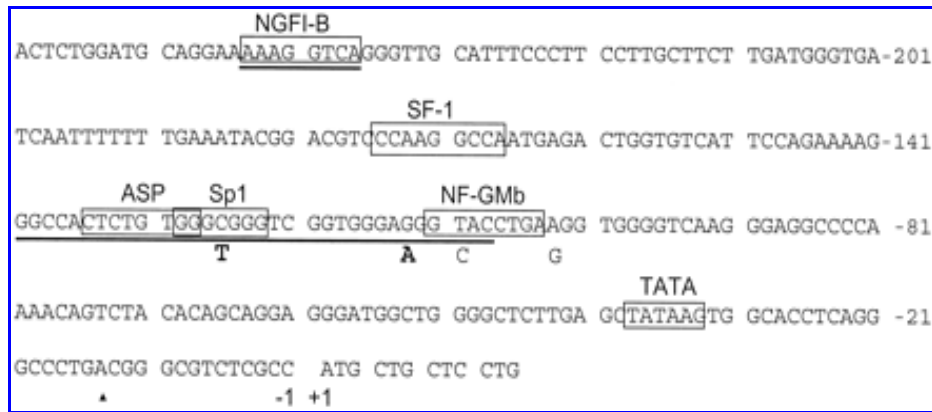


Figura 7 :Tratto di sequenza responsabile del controllo trascrizionale del CYP21. I nucleotidi sono numerati a partire dal codone di inizio della traduzione ATG. I siti di legame dei fattori trascrizionali sono indicati dai riquadri e il segmento indica le regioni di legame del cAMP. I nucleotidi che differiscono nella sequenza del CYP21P sono indicati sotto i nucleotidi corrispondenti nel CYP21.

In particolare in posizione -113 la G presente nel gene CYP21A2 diventa una A nel CYP21A1P e in posizione -126 una C del CYP21A2 diventa una T nel CYP21A1P. Quest'ultimo polimorfismo è localizzato al centro della sequenza di legame per il fattore trascrizionale Sp1 e causa una minore affinità di legame del fattore trascrizionale allo pseudogene.

Lo stesso polimorfismo interferisce anche con l'azione di un altro fattore trascrizionale, noto come ASP, "adrenal specific protein". Il polimorfismo in posizione -113 non è localizzato in un dominio di legame trascrizionale noto, ma il tratto di sequenza in cui si trova è simile al sito di legame di Sp1; la mutazione potrebbe quindi comunque interferire con l'azione di Sp1. Gli altri due polimorfismi sono localizzati in posizione -110 dove una T nel CYP21A2 cambia in una C nel CYP21A1P, e in posizione -103 dove una A nel CYP21A2 è sostituita da una G nel CYP21A1P. Il polimorfismo in posizione -110 è localizzato in una sequenza di legame per il fattore nucleare NF-GMb, espresso in granulociti e macrofagi, che non sembra infatti interferire con l'espressione del CYP21A2 e del CYP21A1P.

Un altro fattore nucleare importante per l'espressione della 21 α -idrossilasi è il fattore steroidogenico 1, SF-1. Questo recettore nucleare è fondamentale non solo per l'espressione di molti enzimi coinvolti nella cascata steroidogenica, ma ha anche un ruolo chiave nello sviluppo embrionale delle gonadi e delle ghiandole surrenali. Il CYP21A2 contiene un sito di legame per SF -1 ma il suo ruolo nell'espressione della 21 α -idrossilasi non è ancora stato approfondito.

Due regioni localizzate in questa area sono responsabili del legame del cAMP i cui livelli intracellulari aumentano per effetto dell'interazione dell'ACTH con il suo recettore di membrana (4). La prima regione si sovrappone ai siti di legame per Sp1 e Asp, la seconda regione si sovrappone al sito di legame per il fattore NGFI-B. Mutazioni in questi siti distruggono la risposta al cAMP.

La SAG dovuta al deficit della 21 α -idrossilasi è ereditata come tratto monogenico autosomico recessivo strettamente legato al complesso HLA (17), cosicché fratelli con deficit della 21 α -idrossilasi sono quasi invariabilmente HLA identici. Prima del clonaggio del gene CYP21A2, la tipizzazione dell'HLA era il metodo principale per eseguire la diagnosi prenatale. Alcune forme del deficit della 21 α -idrossilasi sono infatti associate con specifiche combinazioni di antigeni HLA o aplotipi, condizione nota come linkage disequilibrium (18). In particolare è nota l'associazione tra la forma classica con perdita di sale e l'HLAA3; Bw47;DR7, presente nella popolazione del Nord Europa. Questo aplotipo porta un allele nullo a uno dei due loci C4 codificanti la quarta componente del complemento del siero insieme alla delezione del CYP21A2. La forma non classica è spesso associata con HLA-B14;DR1 nelle popolazioni ebraiche dell'Europa dell'Est. Questo aplotipo è associato con la mutazione V281L e con una duplicazione del complemento C4A e dello pseudogene CYP21A1P.

Infine l'HLA-A1;B8;DR3 è negativamente associato con la SAG; questo aplotipo ha un allele nullo C4Aed è associato con la delezione dei geni C4A e CYP21A1P. Molte mutazioni puntiformi note responsabili della sindrome adrenogenitale da deficit della 21 α -idrossilasi sono il risultato di possibili crossing over ineguali durante la meiosi tra CYP21A2, il gene attivo, e CYP21A1P, lo pseudo gene (***Figura 8***).

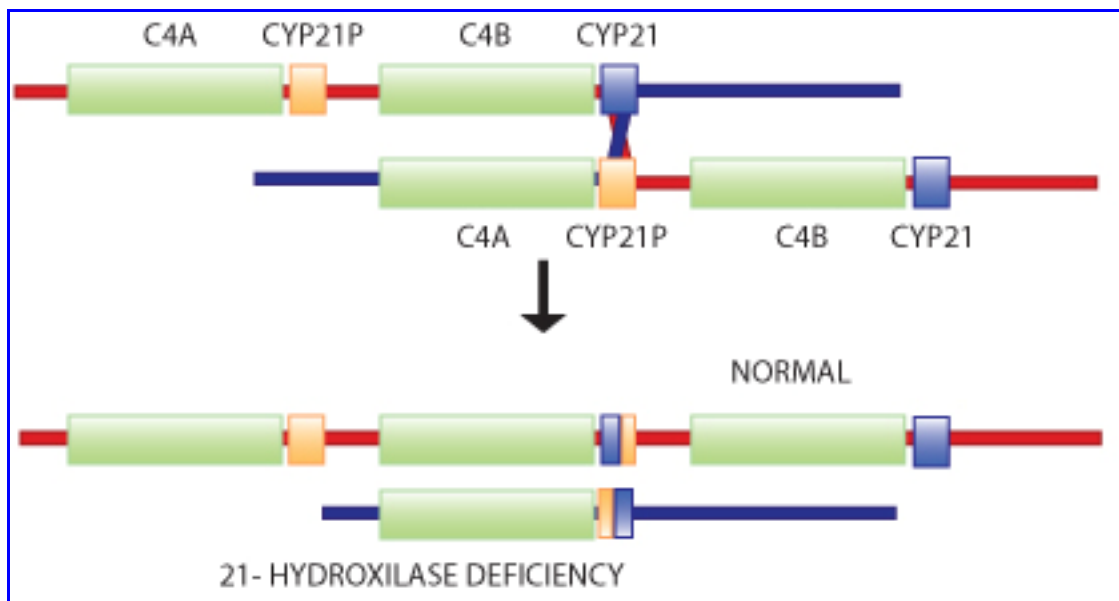


Figura 8: Un crossing over ineguale può generare una delezione del CYP2. Quando durante la meiosi i cromosomi non si allineano correttamente, un crossing over può generare due cromosomi figli, uno con tre copie del complesso C4-CYP21 e uno con un' unica copia

Dai crossing over ineguali possono generarsi una completa delezione del C4B e una parziale delezione del CYP21A2, oppure una conversione genica che trasferisce mutazioni puntiformi dallo pseudogene al gene (19-24).

L'elevato tasso di ricombinazione che caratterizza il CYP21A2 probabilmente dipende dalla sua localizzazione genica; nel complesso maggiore di istocompatibilità. Infatti l'alta frequenza di ricombinazione tra i gene codificanti molecole presentanti l'antigene è fondamentale per aumentare la specificità della risposta immunitaria.

Le mutazioni deleterie che possono essere trasferite dal CYP21A1P al CYP21A2 sono molteplici (**Figura 9**).

Mutazioni normalmente presenti nel CYP21A1P impediscono completamente la sintesi di un enzima integro e causano la SAG classica con perdita di sali. Queste mutazioni sono rappresentate dalla mutazione nonsense al codone 318, Q318X, dalla delezione di 8 nt nell'esone 3 che comporta uno shift del translational open reading frame, e dall'inserzione di un nucleotide nell'esone 7, generalmente identificata in associazione con altre mutazioni.

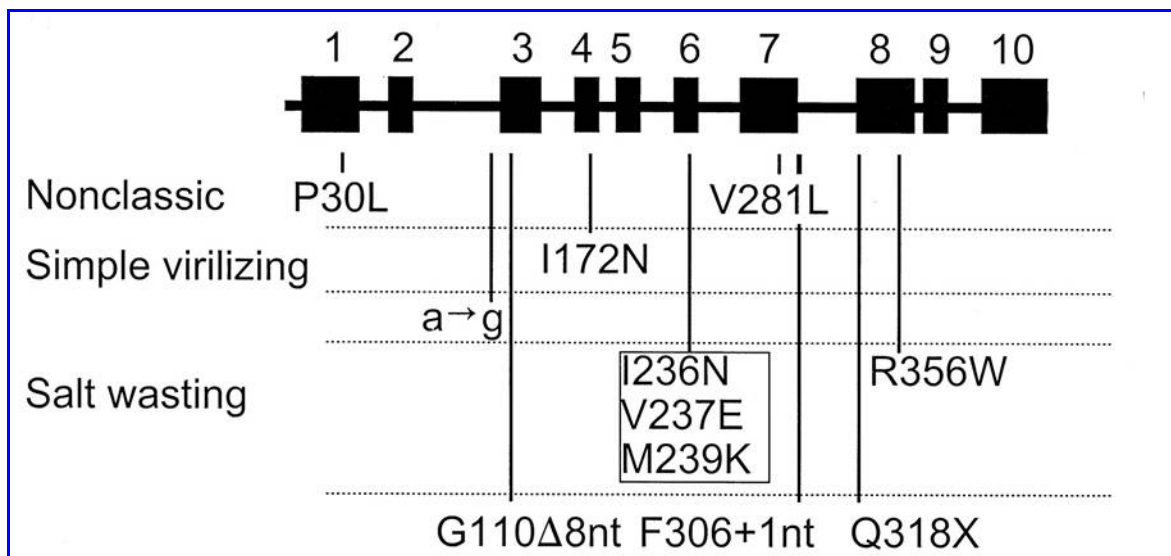


Figura 9: Localizzazione e significato funzionale delle più comuni mutazioni presenti nei pazienti con SAG da deficit della 21α-idrossilasi. I numeri riportati rappresentano gli esoni.

MUTAZIONE: PROLINA 30→LEUCINA (P30L)

La 21-idrossilasi è un enzima ancorato alla membrana del reticolo endoplasmatico da una “coda” idrofobica amino-terminale, necessaria per l’attività e la stabilità enzimatica. Molti enzimi P450 hanno uno o più residui di prolina che separano la coda dal resto del polipeptide: Questi residui creano una curva nella catena polipeptidica che la mutazione P30L abolisce. Come conseguenza si ha un improprio avvolgimento del polipeptide che può interferire con la localizzazione nel reticolo endoplasmatico.

La mutazione produce un enzima con 30-60% di attività quando viene espressa nelle cellule in coltura ed è stata trovata circa in 1/6 degli alleli dei pazienti con la forma non classica. I pazienti portatori di questa mutazione tendono ad avere segni di iperandrogenismo più gravi rispetto ai pazienti portatori della V281L.

MUTAZIONE: ISOLEUCINA 172→ ASPARAGINA (I172N)

Il residuo di isoleucina in questa posizione nell’elica E è normalmente e fortemente conservato in molti enzimi P450, dove permette l’interazione con la membrana del reticolo endoplasmatico. Mutazione di questo residuo idrofobico altera questa interazione. Questa mutazione è la sola associata specificamente con la semplice virilizzazione della malattia e risulta in un enzima con il 2% o meno della normale attività, che permette la sintesi di quantità sufficiente di aldosterone.

MUTAZIONE: Cluster esone 6

Il Cluster 6 è l'insieme delle seguenti mutazioni:

Ile-Val-Glu-Met-235-238 → Asn-Glu-Glu-Lys (I235N/V236E/M238K). E' stato ipotizzato che questo cluster di 3 mutazioni missense nell'elica G interferisca con il legame con il substrato e abolisca l'attività enzimatica.

MUTAZIONE: VALINA 281→ LEUCINA (V281L)

La mutazione V281L determina un'alterazione del legame con l'eme. Questo comporta un enzima con il 50% di normale attività, quando si considera 17OHP come substrato e con il 20% per il progesterone. E' la più frequente mutazione associata alla forma non classica (circa il 70% di tutti gli alleli non classici portano la mutazione V281L); in alcune popolazioni come gli Ebrei originari dell'Europa dell'Est rappresenta un vero e proprio polimorfismo genetico, con una frequenza superiore al 10%. Vari studi hanno confermato l'associazione tra la mutazione dell'esone 7 e l'aplotipo HLA B14;DR1.

MUTAZIONE: ARGININA 356→ TRIPTOSANO (R356W)

E' localizzata in una regione del gene codificante l'elica K dell'enzima, influenzando l'interazione con la citocromo P450 reductasi. Questa mutazione abolisce l'attività enzimatica quando è espressa nelle cellule di mammifero ed è associata alla forma SW.

2.1 Ricombinazioni “De Novo”

Le mutazioni che apparentemente non derivano da conversioni geniche (cioè non riscontrate nello pseudogene) rappresentano circa il 5-10% degli alleli con deficit della 21-idrossilasi. La più frequente di queste è la P453S, riscontrata in diverse popolazioni, facendo ipotizzare che possa essere un polimorfismo dello pseudogene, talvolta trasferito al gene attivo. Un totale di 52 mutazioni del CYP21 sono state depositate nella Cardiff Human Gene Mutation Databas (25-30). Più di 30 mutazioni sono rare e descritte in famiglie specifiche associate sia a SW o SV, presenti solo nel gene CYP21 (ricombinazioni “de novo”). Queste mutazioni sono elencate nella *(Tabella 1)*.

(Tabella 1)

NOME	MUTAZIONE	E/I	ATTIVITA' %	EFFETTO	FENOTIPO
*DELEZIONE			0	Enzima non presente	SW
*CONVERSIONE			0	Enzima non presente	SW
*+L9	28 +CTG	E1	100	Normale	Normale
W22X	66 G—A	E1	0	Nonsense	SW
W22X + 1nt	64 + T	E1	0	Frameshift	SW
*P30L	89 C—T	E1	30 – 60	?localizzazione nel RE	NC
P30Q	89 C—A	E1	0	?localizzazione nel RE	SW
Y47Δ1 nt	138ΔT	E1	0	Frameshift	SW
Accettare sito di splicing	295 A--G	I2		Splicing anormale	SW
G90V	366 G—T	E2	0		SV
Donatore sito di splicing	387 G—A	I2		Splicing anormale	
*introne 2 “g”	656 A/C—G	I2	<5	Splicing anormale	SV-SW
Y97X	670 C—A		0	Non senso	
K102R	684 A—G	E3		Normale	Normale
P105L	693 C—T	E3	60		NC
*G110Δ8nt	Δ708-715	E3	0	Frameshift	SW
C168Δ1nt	991-992 TG—A	E4	0	Frameshift	SW
*I172N	1001 T—A	E4	1	?inserimento nel RE	SV
G178A	1019G—C	E5	0 – 19		SW
D183E	1123 C—G	E5	100	Normale	Normale
ΔE196	Δ1160-1162	E5	6 – 23	Enzima instabile	
*I236N	1382 T—A	E6	0	?legame del substrato	SW
*V237E	1385 T—A				
*M239K	1391 T—A				
S268T	1647 G—C	E7	100	Normale	Normale
*V281L	1685 G—T	E7	20 – 50	?inserimento nel RE	NC
G291S	1715 G—A	E7	0.8	?legame al gruppo HEME ?trasferimento dei protoni dall'H ₂ O all'HEME	SW
G291C	1715 G—T	E7		Legame dell'H ₂ O al gruppo HEME	SW
W302X	1750 G—A	E7	0	Nonsense	SW
*F306+1nt	1759 +T	E7	0	Frameshift	SW
Donatore sito di splicing	1781 G—C	I7		Splicing anormale	SW
Donatore sito di splicing	1782 T—G	I7		Splicing anormale	
R316X	1990 C—T	E8	0	Nonsense	SW
*Q318X	1996 C—T	E8	0	Nonsense	SW
S330Δ10nt	Δ2032-2041	E8	0	Frameshift	SW
R339H	2060 G—A	E8	20 – 50		NC
R354H	2105 G—A	E8	0	Interazione con l'enzima reduttasi	
*R356W	2110 C—T	E8	0	Interazione con l'enzima reduttasi	SW
R356P	2111 G—C	E8	0.2	Interazione con l'enzima reduttasi	
R356Q	2111 G—A	E8	1	Interazione con l'enzima reduttasi	
E380D	2267 G—T	E9	30	Diminuzione dell'affinità con il gruppo HEME	
V397+16nt	Duplicazione 2303-2318	E9	0	Frameshift	SW
W405X	2341 G—A	E9	0	Nonsense	SW
G424S	2494 G—A	E10			SV
P453S	2580 C—T	E10	20 – 50		NC
P475Δ1nt	Δ2649	E10	0	Frameshift	
R438P	2672 G—C	E10	1 – 2	Enzima instabile	
R483Δ1nt	2672-2273 GG—C	E10	0	Frameshift	SW
N493S	2702 A—G	E10	100	Normale	Normale

2.2 Correlazione tra genotipo e fenotipo

Le mutazioni di CYP21 possono essere raggruppate in tre categorie in base al livello di attività enzimatica predetto dalla mutagenesi *in vitro* e da studi di espressione genica.

Il primo gruppo comprende delezioni o mutazioni nonsense che aboliscono totalmente l'attività enzimatica, associate con SW.

Il secondo gruppo sono mutazioni missense come la I172N, con 1-2% di normale attività enzimatica, associate con pazienti SV.

Il terzo gruppo include mutazioni puntiformi come la V281L e la P30L, con 20-60% di attività enzimatica, associate alle forme non classiche.

Il grado con cui ciascuna mutazione compromette l'attività enzimatica è strettamente correlato con la severità clinica della malattia. La gravità della malattia è determinata dall'attività dell'allele meno gravemente affetto tra i due.

Di conseguenza possiamo classificare i pazienti nei seguenti genotipi:

- severo/moderato o moderato/moderato per le forme classiche;
- severo/leggero, moderato/leggero, leggero/leggero per le forme non classiche.

Oltre all'attività enzimatica, numerosi fattori genetici e/o ambientali possono influenzare il fenotipo e il rapporto tra genotipo e fenotipo. La via più semplice per correlare genotipo e fenotipo è determinare quali mutazioni sono caratteristicamente trovate in ciascun tipo di deficienza della 21-idrossilasi .

Il fenotipo però non può essere sempre predetto dal genotipo: sebbene il genotipo sia normalmente correlato al fenotipo, certe volte sono state riscontrate alcune discrepanze tra i due(14,15). Tale disparità è stata spiegata in pazienti portatori dell'introne 2 (A/C→G) caratterizzati da un risultato alternativo dello splicing associato alla produzione di enzima con attività variabile (16). Molti studi hanno mostrato la presenza di mutazioni aggiuntive nello stesso allele, non identificabili nei normali studi di screening (17) o sostituzioni a livello delle regioni regolatrici della trascrizione (18). In definitiva, molte mutazioni della linea germinale possono spiegare la discordanza genotipica-fenotipica (19).

PARTE SPERIMENTALE

Scopo della Tesi

Nei soggetti con sospetto deficit della 21 α -idrossilasi, identificati a seguito di test ormonali, per confermare la causa della malattia si procede con lo screening delle mutazioni puntiformi note della 21 α -idrossilasi mediante PCR allele specifica e sequenziamento delle regioni specifiche del DNA. In assenza di mutazioni note o di grossi riarrangiamenti, verificati mediante Southern Blot, o in portatori di una sola mutazione nota, viene eseguita la sequenza di tutto il gene della 21 α -idrossilasi per la ricerca di mutazioni nuove.

In tal modo sono state identificate 5 mutazioni de novo in 5 bambini, 3 affetti da sindrome adrenogenitale classica e 2 da sindrome adrenogenitale non classica, la cui attività funzionale non è nota.

Il nostro obiettivo è stato quello di valutare l'attività funzionale e strutturale degli enzimi mutati al fine di poter stabilire la correlazione genotipo-fenotipo nei 5 pazienti studiati. Le mutazioni nuove, infatti, poiché non sono disponibili ampie popolazioni per studi di correlazione genotipo-fenotipo, non permettono di prevedere il fenotipo. Pertanto l'analisi funzionale *in vitro* degli enzimi mutati è di notevole importanza per classificare la severità delle mutazioni riscontrate.

Il programma di lavoro è stato il seguente:

1. Estrazione del DNA genomico da sangue intero dei pazienti affetti da deficit della 21 α -idrossilasi e screening per l'identificazione delle mutazioni puntiformi note e dei grossi riarrangiamenti e, nei pazienti negativi, ricerca delle mutazioni nuove;
2. Progettazione di primers specifici per il CYP21A2 presentanti la mutazione puntiforme da inserire nel plasmide pCMV4-CYP21A2, contenente il cDNA del gene umano CYP21A2 clonato nel vettore pCMV4 e mutagenesi sito-diretta;
3. Amplificazione attraverso trasformazione in cellule supercompetenti e successiva purificazione mediante kit specifici del plasmide pCMV4-CYP21A2 WT e mutati, e sequenziamento dell'intero cDNA per verificare la corretta incorporazione della mutazione introdotta;
4. Trasfezioni transienti mediante lipofectamina dei plasmidi contenenti la sequenza WT e mutata nelle cellule COS7; trasfezione contemporanea del plasmide pSV- β -galattosidasi per monitorare l'efficienza della trasfezione;
5. Verifica dell'espressione nelle cellule trasfettate dell'enzima 21 α -idrossilasi mediante immunofluorescenza;

6. Studio dell'attività enzimatica della 21 α -idrossilasi nelle cellule trasfettate in presenza dei substrati naturali dell'enzima, progesterone e 17OH-progesterone, marcati con H³, mediante Thin Layer Chromatography (TLC). L'attività della 21 α -idrossilasi è stata espressa come percentuale di conversione del substrato, considerando l'attività delle cellule esprimenti l'enzima WT pari al 100%.

Materiali e Metodi

3.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto mediante la metodica “*SALTING OUT*” .

L'estrazione di DNA genomico è stata eseguita a partire da 5 ml di sangue intero, precedentemente congelato a -20°C , in 10 mM di EDTA a pH 8. Il campione viene trasferito in una Falcon da 50 ml in cui si aggiungono 45 ml di LYSIS BUFFER a 4°C precedentemente autoclavato.

Lysis Buffer	
Sucrosio	0.32 M
Tris\HCl ph 7.5	10mM
MgCl ₂	5mM
Triton	100X
H ₂ O sterile	

La funzione del tampone è rompere le membrane plasmatiche delle cellule del sangue e degli organelli intracitoplasmatici, determinando la liberazione del contenuto interno cellulare tra cui gli acidi nucleici. Le provette vengono agitate leggermente per inversione per 10 secondi e centrifugate per 10' a 3000 rpm a 4°C .

Dopo la centrifugazione si elimina il sovrnatante con un dispositivo aspirante e il pellet cellulare viene lavato 2 volte con 10 ml di FISIO BUFFER e, dopo ogni lavaggio, centrifugato come sopra, al fine di lisare le cellule ed allontanare il più possibile le impurità.

Fisio Buffer	
NaCl	0.075 M
EDTA	0.025 M

Successivamente il pellet viene risospeso in 3 ml di pK Buffer.

pK Buffer	
Tris\HCl pH 8	10 mM
EDTA	2mM

Ad ogni campione si aggiungono 100µl di SDS al 10% e 35 µl di Proteinasi K per la precipitazione e l'eliminazione delle proteine ancora legate al DNA, e viene incubato nel bagnetto a 65°C per 1 h;oppure in alternativa a 37°C per tutta la notte.

Al termine dell'incubazione si aggiungono 0.5 ml di NaCl saturo (ca.6M) e si agita la provetta energicamente per 15''. Quindi viene nuovamente centrifugata a 3000 rpm per 15'.

La fase acquosa viene recuperata in una Falcon da 15 ml dove si aggiunge 1 volume di isopropanolo a temperatura ambiente.

In questo stadio, agitando il campione per inversione, è possibile osservare la presenza del DNA che precipita sotto forma di una struttura filamentosa. Infine il campione viene centrifugato a 3000 rpm per 10'.

Il DNA precipitato viene lavato con 10 ml di etanolo al 70% e centrifugato come sopra per eliminare il più possibile l'etanolo.

Dopo aver eliminato il sovrantante, le Falcon vengono scolate su carta da filtro per qualche minuto. Il DNA è risospeso in 200 µl di H₂O bidistillata sterile e conservato a 4°C per tutta la notte prima di effettuare la lettura allo spettrofotometro.

Le letture sono state compiute utilizzando lo spettrofotometro Smart spec 3300 della BioRad allo scopo di quantificare il DNA.

Ogni campione di DNA viene diluito 1:20 in H₂O sterile e sottoposto a lettura sia a 260 nm che a 280 nm,rispettivamente le lunghezze d'onda corrispondenti ai picchi di assorbimento massimo del DNA e delle proteine.

La concentrazione del DNA,espressa in µg/ml, è stata ottenuta secondo la seguente formula:

$$[\text{DNA}] = A_{260\text{nm}} * 1 \text{ OD} (50 \mu\text{g}/\mu\text{l}) * \text{fatt. diluizione} (100)$$

In cui il valore di 1 OD (densità ottica) corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppio filamento. E' stato calcolato il rapporto tra 260nm e 280 nm che deve risultare compreso tra 1.7 e

2.0; rapporti < a 1.7 indicano una eccessiva presenza di proteine, mentre rapporti > a 2.0 evidenziano la degradazione del DNA.

3.2 PCR gene-specifica: caratteri generali e sequenziamento

Per la diagnosi di sindrome adrenogenitale e quindi per evidenziare mutazioni note del gene CYP21 sono state messe a punto 4 PCR gene-specifiche.

L'utilizzo dell'amplificazione genica mediante PCR richiede essenzialmente la possibilità di distinguere il gene CYP21 dallo pseudogene CYP21P.

Grazie all'uso di primers sintetizzati su sequenze complementari gene-specifiche, la PCR è stata applicata con successo alla diagnosi molecolare della SAG. La tecnica permette di amplificare e differenziare il gene CYP21 dal CYP21P e di aumentare la sensibilità e la rapidità di rivelazione dell'allele di interesse.

A tal fine vengono utilizzate principalmente due regioni gene-specifiche, in particolare la delezione di 8 bp nell'esone 3 ($\Delta 8$ bp) e il cluster di 3 mutazioni nell'esone 6 (cluster 6).

Primer	Posizione	Sequenza (5'-3')
F	Promotore	TCC CAA GGC CAA TGA GAC TGG TGT
E	Esone 6-cluster 6	GCA TCT CCA CGA TGT GAT C
D	Esone 3 ($\Delta 8$ bp)	CCG GAC CTG TCC TTG <u>GGA GAC TAC T</u>
L	Esone 6-cluster 6	<u>GAT</u> CAC <u>ATC</u> <u>GTG</u> GAG <u>ATG</u> CAG
M	Introne 8	TGG AGT TAG AGG CTG GCC AGG A
H	3'UTR	CTG AGG TAC CCG GCT GGC ATC GGT

Sequenze e localizzazioni degli oligonucleotidi nel gene CYP21 usati per le PCR gene-specifiche. Le estremità 3' di questi primers hanno molti mismatches (nucleotidi sottolineati) con la sequenza del CYP21P. Tali primers non amplificano i corrispondenti frammenti nello pseudogene.

	Primers	Denaturazione		Annealing		Elongation		N° cicli
		Temp	Time	Temp	Time	Temp	Time	
FE	F-E	94°C	30	56°C	30	72°C	40	35
DM	D-M	94°C	40	62°C	40	72°C	60	35
LM	L-M	94°C	40	62°C	40	72°C	60	35
LH	L-H	94°C	40	62°C	40	72°C	60	35

Condizioni di PCR utilizzate per l'amplificazione del gene.

L'analisi della sequenza nucleotidica del prodotto amplificato rappresenta il metodo di preferenza sia per verificare la specificità del prodotto ottenuto, sia per determinare la presenza e il tipo di mutazione e la sua precisa localizzazione.

Successivamente i prodotti delle 4 PCR gene-specifiche sono stati sequenziati al fine di identificare le mutazioni note o nuove del gene CYP21A2 (30,34). Le PCR descritte sono state purificate e quantificate usando il kit Agencourt della Beckman Coulter, che si compone di 3 fasi successive.

Purificazione

Le PCR descritte sono state purificate e quantificate usando il kit Agencourt AmPure PCR Purification della Beckman Coulter. Il kit adotta un sistema basato sull'utilizzo di biglie magnetiche per la purificazione, in cui un buffer lega in maniera selettiva i prodotti di PCR rimuovendo nucleotidi, sali, e enzimi.

Ad ogni PCR è stato aggiunto la AmPure in base al volume di reazione, successivamente la miscela è stata vortexata per 30'', e le provette sono state posizionate in una piastra magnetica (Agencourt SPRIPlate) per 10 minuti per permettere la separazione delle biglie dalla soluzione. Di seguito è stata aspirata la soluzione chiara, facendo attenzione a non disturbare le biglie magnetiche adese sulla parete delle provette.

Si dispensano 200 µl di etanolo 70% e si lasciano incubare per 30'', si elimina l'etanolo 70% e si ripetono i lavaggi per due volte.

I pellet si lasciano asciugare all'aria per eliminare eventuali residui di etanolo. Una volta asciutti i pellet sono stati risospesi in 40 µl di acqua sterile. I campioni sono stati dosati mediante

corsa elettroforetica in un campo ad intensità e direzione costante, su gel d'agarosio all' 1,5%, previa colorazione con etidio bromuro e successiva transilluminazione ai raggi UV a 350 nm.

Il dosaggio permette di stabilire la concentrazione di DNA di ogni campione confrontando l'intensità della banda di interesse con le intensità delle bande del marker che hanno una concentrazione di DNA nota e proporzionale alla loro intensità.

In base alle dimensioni del frammento da sequenziare, il protocollo fornito con il Sequenziatore automatico 3730 DNA Analyzer della Applied Biosystem indica quanti ng di DNA sono necessari per la reazione di sequenziamento.

I dosaggi utilizzati sono indicati nella tabella seguente:

PCR Sequenza	Dimensioni	Quantità DNA
FE	1567 bp	50 ng
DM	1459 bp	50 ng
LM	857 bp	15 ng
LH	1366 bp	30 ng

PCR Sequenza

Campione	Dosaggio	Buffer 5X	Primer (100 µM)	DNA	Big Dye
I Paziente (L122P)	20 ng	1.5 µl	B 1µl	5 µl	1µl
II Paziente (Q481F)	30 ng	1.5 µl	P 1 µl	8 µl	1µl
III Paziente (R366H)	5 ng	1.5 µl	L 1µl D 1µl	8 µl	1µl
IV Paziente (E161X)	5 ng	1.5 µl	L 1µl D 1µl	8 µl	1µl
V Paziente (M150R)	20 ng	1.5 µl	B 1µl E 1µl	5 µl	1µl

La PCR di sequenza utilizza un primer di sequenza, un buffer (5X) e una big dye fornita dal kit “CEQTM DTCS-Quick Start kit” della Beckman Coulter. La miscela è composta dal buffer di sequenza, dall’enzima DNA polimerasi, dai dNTPs e dai “Dye terminator” ddNTTP, ddGTP, ddCTP e ddATP.

Ognuno di quest’ultimi 4 componenti, contiene un diverso fluoroforo il cui spettro di assorbimento e emissione della luce coincide con l’infrarosso.

Precipitazione

Al termine della PCR di sequenza i campioni sono stati precipitati usando il kit CleanSeq Dye-Terminator Removal. La soluzione di precipitazione contiene particelle magnetiche in grado di rimuovere l’eccesso dei “Dye terminator” non incorporati.

In ogni campione sono stati aggiunti 10 µl CleanSeq ed etanolo 85% in base al volume di reazione. I campioni sono stati vortexati e posti nella piastra magnetica (SPRIPlate) per 5 minuti per permettere la separazione delle biglie magnetiche dalla soluzione.

Di seguito è stata aspirata la soluzione trasparente facendo attenzione a non disturbare le particelle magnetiche adese sulla parete della provetta .

Si dispensano 100 µl di etanolo 85% , si lasciano incubare 30’’, si elimina l’etanolo 85% e si ripete il passaggio per altre due volte. I pellet sono posti ad asciugare. Una volta asciutti i pellet sono stati risospesi in 40 µl formammide e 10 µl caricati al sequenziatore. Lo strumento si basa sull’elettroforesi capillare, ovvero la corsa degli acidi nucleici viene effettuata in capillari di diametro interno di 75 µm e diversa lunghezza, ai cui estremi viene applicato un alto voltaggio (1-30 kV). Nella prima fase di attività dello strumento i frammenti di DNA vengono separati mediante iniezione elettrocinetica dei capillari; nel tratto capillare, privo del rivestimento esterno, i frammenti di DNA marcati fluorescentemente vengono colpiti dalla luce emessa da due laser che va ad eccitare i fluorofori presenti nelle molecole. Come risultato si ha emissione di fluorescenza che viene raccolta, filtrata, amplificata ed elaborata automaticamente.

3.3 Protein Modelling

Per predire le conseguenze strutturali e funzionali delle nuove mutazioni individuate, è stato costruito un modello omologo per il gene umano della CYP21A2. A tale scopo, è stata realizzata una ricerca con BLAST utilizzando la sequenza codificante della CYP21A2 e le sequenze omologhe trovate sono state allineate utilizzando Clustal W. La ricerca ha evidenziato nel citocromo P450 2C5 di coniglio un buon template per il molecular modelling. L’allineamento tra la sequenza codificante della CYP21A2 e quella del citocromo P450 2C5 è stato ottimizzato con il

“sequence-to-structure alignment protocol Multiple Mapping Method (MMM)”, e quindi utilizzato per il molecular modeling realizzato con il programma MODELLER (versione 8.1). Sono stati ottenuti 10 diversi modelli e il migliore è stato convalidato con PROCHECK.

3.4 Amplificazione del plasmide pCMV4-CYP21A2 e mutagenesi sito-diretta

Il plasmide di espressione pCMV4 contenente il cDNA umano del gene CYP21A2, insieme al plasmide vuoto pCMV4, sono stati gentilmente concessi dalla Dott.ssa A.Wedell (Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska University Hospital, Stockholm). **(25,27,28)**.

La dimensione del plasmide (**Figura 10**) contenente il cDNA della CYP21A2 è di circa 6400 bp e contiene:

- il cDNA umano della CYP21A2 (1500 bp);
- il gene dell'ormone della crescita umano (hGH)
- regione codificante per la β -lattamasi (AmpR)
- origine di replicazione del fago f1 (f1ori)
- promotore ed enhancer del citomegalovirus (CMV)
- origine di replicazione del virus SV40 (SV40ori).

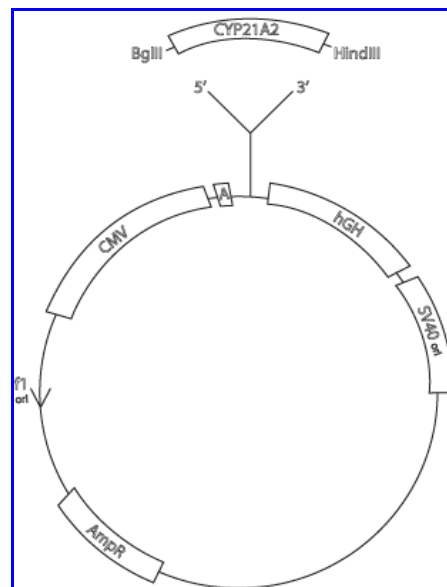


Figura 10: Plasmide pCMV4-CYP21A2

Amplificazione

Il plasmide, spottato sul filtro, viene estratto utilizzando Tris pH 7,6 10 mM (Sigma).

Il filtro è stato posto in una eppendorf da 2 ml con 50 µl del tampone precedentemente preparato, lasciato incubare per 5 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugato.

Dopo la centrifugazione la provetta contenente il filtro è stata posta a 37°C per 30 minuti, successivamente centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm e recuperato il surnatante contenente il plasmide isolato.

Tutto il tampone recuperato, circa 40 µl, contenente il plasmide, è stato usato per trasformare un' aliquota di 50 µl di cellule competenti DH5α, fornite dalla Invitrogen.

La trasformazione è stata effettuata mediante Shock Termico, secondo il seguente protocollo:

- le Falcon contenenti le cellule DH5α ed il plasmide pCMV4-CYP21A2 sono state agitate delicatamente e poste in ghiaccio per 30';
- i campioni sono stati posti a 42°C per 45" e spostati poi di nuovo in ghiaccio per 2';
- dopo l'aggiunta di 900 µl di SOC MEDIUM (Invitrogen), le Falcon sono state agitate a 37°C per un'ora;
- le cellule sono state piastrate in presenza di ampicillina (50 mg/ml) e mantenute a 37°C o/n;
- le colonie cresciute sono state inoculate in 3 ml di LB+ Amp 1:1000, in agitazione o/n a 37 C.

Successivamente è stata verificata la presenza del plasmide nelle colonie inoculate, mediante protocollo *QiaPrep Spin Miniprep della Qiagen*:

- L'inoculo è stato centrifugato a 4500 rpm per 5', il sovrnatante eliminato ed il pellet risospeso in 250 µl di Buffer P1 e trasferito in una eppendorf da 1,5 ml.
- Sono stati aggiunti 250 µl di Buffer P2 e i campioni sono stati agitati per inversione.
- Sono stati aggiunti 350 µl di Buffer P3 ed i campioni agitati immediatamente dopo l'aggiunta del buffer.
- I campioni sono stati centrifugati 10' a 13000 rpm e il sovrnatante ottenuto è stato aggiunto usando la pipetta alla colonna QIAPREP preparata precedentemente.
- Le colonne sono state centrifugate per 1' a 13000 rpm e l'eluato è stato eliminato.
- Le colonne sono state lavate con 0,75 ml di Buffer PE e centrifugate 1' a 13000 rpm.

La colonna QIAPREP è stata posta in una eppendorf da 1,5 ml per eluire il DNA plasmidico.

Le colonne sono state centrifugate 1' a 13000 rpm dopo l'aggiunta di 50 µl di acqua sterile posta al centro della colonna.

Al fine di verificare la presenza dell'inserto, il plasmide purificato è stato sottoposto a restrizione enzimatica con gli enzimi BglIII e HindIII, i cui siti di restrizione sono stati usati per l'inserimento del cDNA del CYP21A2 nel pCMV4-CYP21A2.

Le digestioni sono state poste 1 ora a 37°C, quindi controllate su gel Agarosio 1% previa aggiunta di etidio bromuro.

Confermata la presenza del plasmide con l'inserto, è stata scelta una colonia e parte dell'inoculo usato per le Mini-prep, è stato inoculato in due beute contenenti 250 ml di LB con ampicillina 1:1000 e posto a 37°C o/n.

Dagli inoculi di 250 ml sono stati purificati i plasmidi mediante Kit *Qiafilter Plasmid Maxi della Qiagen*:

- Il contenuto delle beute è stato trasferito in contenitori idonei per la centrifuga e centrifugato a 4700 rpm per 30' a 4°C.
- I sovrantanti sono stati rimossi per capovolgimento e i pellet risospesi in 10 ml di Buffer P1, buffer di lisi;
- Sono stati aggiunti 10 ml di Buffer P2. I campioni sono stati miscelati per inversione e incubati a temperatura ambiente per 5'.
- Sono stati aggiunti 10 ml di Buffer P3 ai lisati cellulari e agitati i contenitori per inversione.
- I lisati sono stati poi versati nella QIAFILTER CARTRIDGE precedentemente preparata e incubati a temperatura ambiente per 10'. Durante l'incubazione si è formato sopra la soluzione un ammasso chiaro costituito da proteine, DNA genomico e detergenti.
- Durante l'incubazione sono state equilibrate due QIAGEN-Tip500 inserendovi 10 ml di Buffer QBT e lasciando fluire il Buffer.
- Sono stati inseriti i plunger nella QIAFILTER CARTRIDGE e filtrati i lisati cellulari attraverso le QIAGEN-Tip500 equilibrate in precedenza. Una volta che i lisati hanno attraversato le resine delle QIAGEN-Tip500, le QIAGEN-Tip500 sono state lavate con 30 ml di Buffer QC per 2 volte, per eliminare i contaminanti presenti nella purificazione dei plasmidi, ora immobilizzati nelle resine.
- Sono stati quindi eluiti i plasmidi con 15 ml di Buffer QF e di seguito precipitati aggiungendo agli eluati 10,5 ml di isopropanolo conservato a temperatura ambiente. I campioni sono stati miscelati e centrifugati a 4700 rpm per 60' a 4°C.
- I sovrantanti sono stati rimossi con cura e sono stati aggiunti ai pellet 5 ml di etanolo conservato a -20°C. I campioni sono stati centrifugati a 4700 rpm per 60' a 4°C. In questo modo l'etanolo ha sostituito l'isopropanolo nel precipitato, rendendo il DNA più facile da dissolvere.

- I pellet di DNA plasmidico sono stati lasciati ad asciugare per circa 10' e poi risospesi in 100 μ l di acqua sterile.

Le Maxi-prep sono state dosate utilizzando lo spettrofotometro DU 640 (Beckman Coulter, U.S.A.). I campioni sono stati diluiti 1:100 in H₂O sterile e sottoposti a lettura sia a 260 nm che a 280 nm, rispettivamente le lunghezze d'onda corrispondenti ai picchi di assorbimento massimo del DNA e delle proteine. Le concentrazioni dei DNA plasmidici, espresse in μ g/ μ l, sono state ottenute mediante la formula indicata precedentemente.

Per confermare la presenza dell'inserto, il DNA purificato con le Maxi-prep è stato sottoposto a digestione enzimatica con gli enzimi BglIII e HindIII, come già descritto per le Mini-prep. Insieme al pCMV4-CYP21A2 e al pCMV4, è stato amplificato in una seconda aliquota di cellule competenti DH5 α , il plasmide pSV- β -galattosidasi fornito dalla Promega (Figura 11), utilizzato successivamente per verificare l'efficienza di trasfezione.

La dimensione del plasmide pSV- β -galattosidasi è di 6820 bp e contiene:

- il gene Lac Z, che codifica la β -galattosidasi (3083 bp);
- regione codificante per la β -lattamasi (AmpR);
- promotore ed enhancer del virus SV40.

Tale plasmide può essere usato sia in cotrasfezioni con il DNA di interesse che in trasfezioni individuali. Il plasmide permette alle cellule di sintetizzare la β -galattosidasi la cui presenza può essere monitorata nell'estratto cellulare utilizzando il kit per il saggio β -galattosidasi della Promega (**Figura 11**).

20 ng del plasmide pSV- β -galattosidasi sono stati usati per trasformare mediante shock termico un'aliquota di cellule DH5 α secondo il precedente protocollo e quindi purificati mediante Maxi-prep come descritto in precedenza.

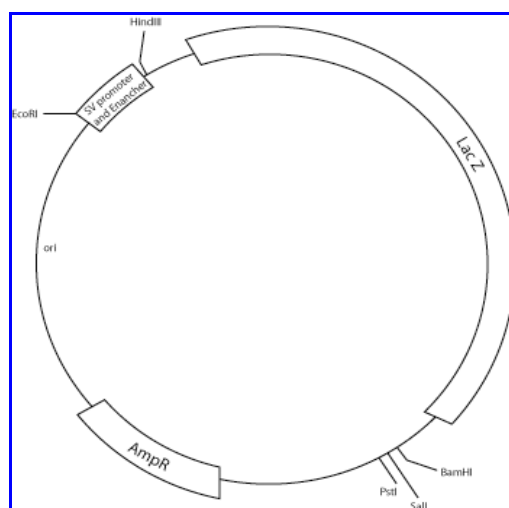


Figura 11: Plasmide pSV- β -galattosidasi

3.5 Mutagenesi sito-diretta

Progettazione dei primers per mutagenesi sito specifica

Una volta identificate le mutazioni nuove, sono stati sintetizzati i primers per realizzare la mutagenesi sito specifica, usando il kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis della Stratagene (34).

I primers sono stati progettati seguendo le indicazioni fornite dal kit:

- entrambi i primers devono contenere la mutazione puntiforme di interesse e devono appaiarsi alla stessa sequenza sugli opposti strand del plasmide;
- i primers devono avere una lunghezza compresa tra le 25 e le 45 bp e la temperatura di annealing non deve essere inferiore ai 78°C. Tale temperatura deve essere calcolata con la seguente formula:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

dove con N sono indicate il numero di bp del primer;

- la mutazione desiderata deve trovarsi al centro del primer con almeno 10-15 bp da ambo i lati;
- è preferibile che i primers abbiano un contenuto in GC pari al 40% e terminino con una G o una C.

Sono quindi state progettate 5 coppie di primers per le cinque mutazioni studiate, L122P, Q481X e M150R,E161X e R366H insieme ad un'ulteriore coppia di primers per inserire la mutazione nota Q318X da usare come controllo negativo. L'incorporazione dei primers genera un plasmide mutato contenente un nick sul doppio filamento.

Primers	Sequenza 5'-3'
L122P-F	GGAAAGCCCACAAGAAGCCACCCGCTCAGCCCTGC
L122P-R	GCAGGGCTGAGCGGGTGGGCTTCTTGTGGGCTTTCC
Q481X-F	CTTCCAAGTGCGGCTGTAGCCCCGGGGATGG
Q481X-R	CCATCCCCCGGGGCTACAGCCGCACTTGGAAAAG
M150R-F	GGAGTTCTGTGAGCGCAGGAGAGCCCAGCCCCG
M150R-R	CCGGGCTGGGCTCTCTGCGCTCACAGAACTCC
E161X-F	GGCACCCTGTGGCCATTAGGAGGAATTCTCTCTCC
E161X-R	CCGTGGGGACACCGGTAAATCCTCCTTAAGAGAGAGG
R366H-F	CTTAGCCTTGCCCCACCAACACACGGCCCAG
R366H-R	GAATCGGAACGGGGTGGTGTGGTGTGCCGGGTC
Q318X-F	GAGATTCAGCAGCGACTGTAGGAGGAGCTAGACCACG
Q318X-R	CGTGGTCTAGCTCCTCCTACAGTCGCTGCTGAATCTC

PCR di mutagenesi

Sono state messe a punto le condizioni ottimali della PCR di mutagenesi, seguendo le indicazioni fornite dal protocollo della Ditta produttrice.

Le condizioni di PCR utilizzate per la mutagenesi del plasmide pCMV4-CYP21A2 sono state le seguenti:

PCR Mutagenesi	Dimensioni
Reaction buffer 10X	5 µl
pCMV4-CYP 21A2	80 ng
Primer F	1 µM
Primer R	1 µM
dNTPs mix	1 µl
Pfu Turbo DNA pol (2,5U/ µl)	1 µl
ddH2O	50 µl

Denaturazione Temp	Time	N° cicli
95°C	30''	1
95°C	30''	18
55°C	1'	
68°C	15 '	

10 µl dei campioni di PCR sono stati controllati su gel d'Agarosio al 1%, previa colorazione con etidio bromuro. L'efficienza della reazione di mutagenesi è stata verificata mediante l'utilizzo del plasmide di controllo pWhitescript TM 4.5 kb, fornito dal kit. Tale plasmide contiene il gene

che codifica per la β galattosidasi ma con un codone di stop (TAA) al posto di un codone CAA che normalmente codifica per la glutammina in posizione 9.

I primers forniti dal kit e specifici per questo plasmide inseriscono una mutazione puntiforme che converte la T del codone di stop TAA nella C, generando un gene della β galattosidasi funzionale.

Ai prodotti di PCR è stato aggiunto 1 μ l dell'enzima DpnI, un'endonucleasi specifica per il dsDNA metilato, utilizzato per frammentare il plasmide template per la PCR di mutagenesi. I campioni, agitati e centrifugati per 1' a 13000 rpm, sono stati posti a 37°C per 1 ora.

Trasformazione e sequenziamento dei plasmidi mutati

Aliquote di 50 μ l di cellule Epicurian Coli XL-Blue fornite dal kit di mutagenesi sono state poste in Falcon 2059 e usate per le trasformazioni mediante la metodica dello Shock termico descritta in precedenza (33). Le cellule, una volta incorporato il plasmide mutato ne saldano la rottura, generando un plasmide integro contenente la mutazione. Come da protocollo fornito dal kit, sono stati aggiunti in ogni aliquota 1 μ l di PCR trattata con DpnI.

50 μ l di cellule + 1 μ l di pWhitescript TM 4.5 kb mutato

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2 - L122P

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2 - Q481F

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2 - M150R

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2 - E161X

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2 - R366H

50 μ l di cellule + 1 μ l di pCMV4-CYP21A2 - Q318X (controllo negativo)

Le cellule trasformate con il plasmide di controllo pWhitescript TM 4.5 kb codificano una β galattosidasi funzionale e generano colonie blue in LB+Agar contenente IPTG (isopropil- 1-tio- β -D-galattopiranoside). Sull' LB+Agar solidificato sono stati stesi 100 μ l di LB in cui sono stati aggiunti 20 μ l di X-gal 10%, stoccato in dimetilformamide, e 20 μ l di IPTG 0,1 M stoccato in dH₂O. Questo ha permesso di verificare l'efficienza di mutagenesi, calcolata con la formula seguente:

$$E.M = \text{numero di colonie blu/colonie totale} * 100$$

Tre colonie cresciute in ogni piastra sono state inoculate in 3 ml LB in tubi Falcon da 15 ml, contenente Ampicillina in concentrazione 1:1000. Ogni inoculo è stato verificato mediante PCR e sequenza per confermare l'esatta sequenza di tutto il cDNA della CYP21A2 e l'inserimento della mutazione voluta.

I primers per la PCR sono stati scelti in modo da amplificare una regione che contenesse tutte e cinque le mutazioni di interesse.

Primer	Posizione	Sequenza (5'-3')
D	Esone 3	CCGGACCTGTCCTTGGGAGACTACT
G	Esone 8	GCCGTGTGGTGCGGTGGGGCAAGGCTAA
L	Esone 6	GAT CAC ATC GTG GAG ATG CAG

Purificazione dei plasmidi

Dei 3 ml inoculati a 37°C o/n, 1,5 ml vengono utilizzati per verificare la presenza del plasmide nelle colonie inoculate, mediante protocollo QiaPrep Spin Miniprep della Qiagen. Le Mini sono state controllate su gel d'Agarosio 1% previa colorazione con etidio bromuro e dopo digestione con gli enzimi BglII e Hind III per il plasmide pCMV4 e HindIII e BamHI per il plasmide pSV-β-galattosidasi, per verificare la presenza dell'inserito (**Figura12**). Le digestioni sono state poste a 37°C per un'ora.

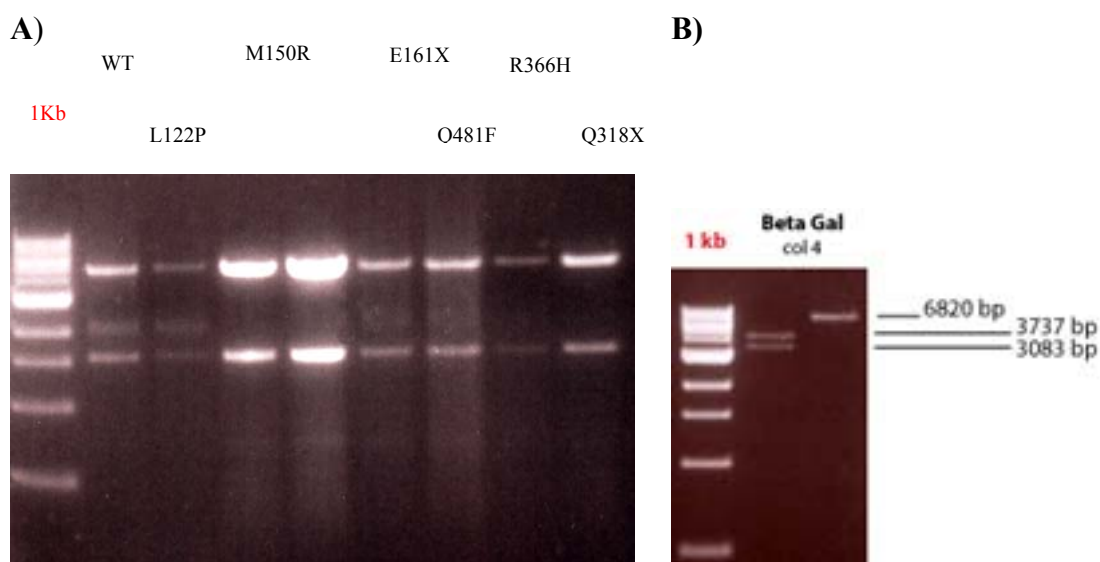


Figura 12: Risultato delle MINI fatte sugli inoculi di 3 ml di alcune delle colonie cresciute.
a – MINI di alcune colonie trasformate con il plasmide pCMV4-CYP21A2 WT e delle colonie trasformate con i plasmidi mutagenizzati
b – MINI di una colonia trasformata con pSV-β-galattosidasi

Il rimanente è stato inoculato in beute contenenti 250 ml di LB con ampicillina 1:1000 e posto a 37°C o/n, per l'esecuzione della purificazione dei plasmidi mediante Kit Qiafilter Plasmid Maxi della Qiagen (**Figura 13**).

I plasmidi sono stati quindi dosati mediante spettrofotometro e controllati come già indicato per la presenza dell'inserto.

Dosaggio Maxi			
Campioni	A260	A260/280	[] µg/ µl
pCMV4-CYP21A2WT	0,3	1,78	1,5
pSV-β-galattosidasi	0,418	1,79	2
pCMV4-CYP21A2 L122P	1,68	1,7	8,4
pCMV4-CYP21A2 Q481X	1,874	1,7	9,37
pCMV4-CYP21A2 M150R	0,198	1,6	0,99
pCMV4-CYP21A2 R366H	1,22	1,7	6,1
pCMV4-CYP21A2 E161X	1,6	1,7	8
pCMV4-CYP21A2 Q318X	1	1,68	5

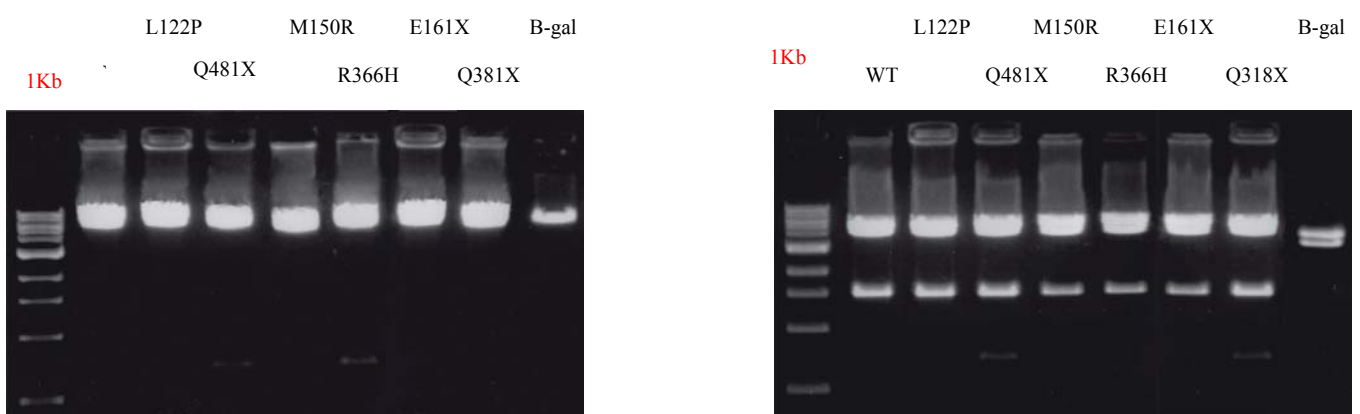


Figura 13: MAXI del plasmide pCMV4-CYP21A2 WT, dei plasmidi mutagenizzati e del pSV-β-galattosidasi

3.5 Espressione in vitro dell'enzima 21 α -idrossilasi: colture cellulari e trasfezioni

La linea cellulare COS7 è stata fornita dall'American Type Tissue Collection (Manassas, VA, U.S.A.) (**Figura 14**). Le cellule, di morfologia fibroblastica, crescono come clusters aderendo leggermente al substrato. Derivano da cellule renali di Cercopithecus aethiops, la scimmia verde africana, trasfettate con un virus SV40 difettivo ma codificante un antigene T wild type (26,30).

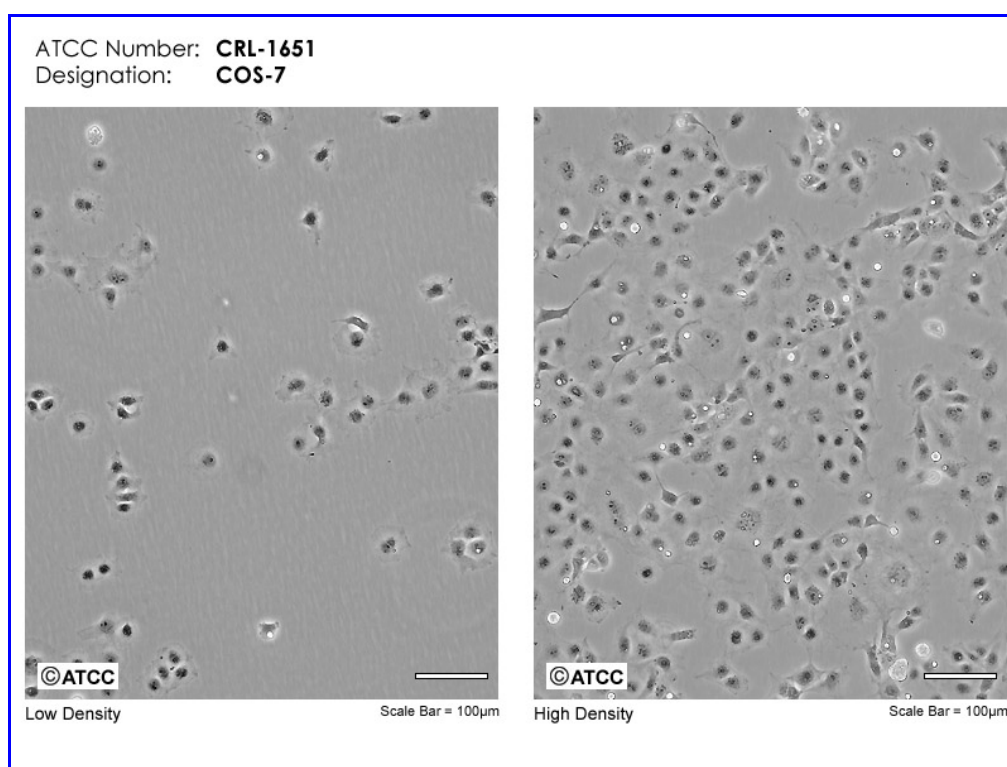


Figura 14: COS7

Le cellule COS7 sono state cresciute in terreno di coltura DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium only (GIBCO) ad elevato glucosio e con NEAA, con aggiunta di siero fetale bovino (FBS) al 10% inattivato (GIBCO), 2mM glutammina (Euroclone Devon, U.K.), Pen/Strep in concentrazione finale 1:1000 e 1 mM di Sodio Piruvato. Le cellule sono incubate in atmosfera umida con CO₂ al 5% a 37°C ed hanno un tempo di duplicazione di circa 48 ore. La vitalità cellulare è stata determinata mediante la tecnica di esclusione del colorante vitale Tripan-Blue (0.4% p/v) effettuata nella camera citometrica di Bürker.

Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 2x10⁵ su una multiwell da 3,5 cm di diametro (Falcon) in terreno DMEM completo e dopo un'incubazione di 24 ore sono state trasfettate mediante lipofectamina. La lipofectamina è una sospensione di fosfolipidi usata per le trasfezioni di acidi nucleici in cellule eucariotiche.

La lipofectamina forma complessi con il DNA e penetra nelle cellule attraverso la membrana plasmatica portando il DNA esogeno nel citoplasma **(26,28,30)**.

La trasfezione transiente è stata realizzata usando 4 µg di ciascun DNA plasmidico, trasfettando il plasmide vuoto pCMV4, il pCMV4-CYP21A2-WT (CYP21-WT), i diversi costrutti (CYP21-L122P, CYP21-M150R e CYP21-Q481X, CYP21-E161X, CYP21-R366H) ed il plasmide di controllo negativo (CYP21-Q318X).

Per monitorare l'efficienza di trasfezione, è stato utilizzato il plasmide di controllo pSV-β-galattosidasi fornito dalla Promega insieme al kit per il saggio β-galattosidasi **(25,30)**.

Come da protocollo, le quantità di DNA e di lipofectamina sono state scelte in rapporto 1:2. Le cellule sono state trasfettate ad una confluenza dell'80%, per garantire la sopravvivenza delle stesse ed un'espressione efficiente dell'enzima.

- Il DNA e la lipofectamina sono state incubate separatamente a temperatura ambiente per 5';
- DNA e lipofectamina sono stati uniti e incubati 20' a temperatura ambiente. Durante l'incubazione le provette sono state agitate delicatamente per facilitare la formazione dei complessi DNA-lipofectamina;
- Le cellule COS7 sono state sottoposte ad un lavaggio con 2 ml di PBS ed è stato aggiunto 1 ml di DMEM con glutammina allo 0,1%, in assenza di siero e di antibiotici;
- Le cellule sono state incubate in presenza dei complessi DNA-lipofectamina per 5 ore a 37°C, poi rimossi con sostituzione del terreno DMEM completo. Dopo 48 ore abbiamo proceduto alla valutazione dell'efficienza di trasfezione mediante valutazione dell'attività β-galattosidasica, dell'espressione dell'enzima mediante immunofluorescenza e allo studio dell'attività enzimatica.

3.6 Saggio β-galattosidasi

Il β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer fornito dalla Promega permette di valutare l'attività della β-galattosidasi in un lisato di cellule trasfettate con il vettore di controllo pSV-βgalattosidasi. Tale valutazione permette di determinare l'efficienza di trasfezione, comparabile con quella del plasmide di interesse che può essere cotrasfettato o meno con il vettore di controllo.

Le cellule, lavate 2 volte con PBS 1X, sono state raccolte dalle piastre con 900 µl di Reporte Lysis Buffer 1X fornito dal kit e centrifugate a 1500 g per 5'. Per lisare le cellule, il campione è stato sonicato 2 volte per 5" a intervalli di 10" in ghiaccio in un sonicatore Sonics Vibra Cell (Danbury, CT, U.S.A.) ad una potenza del 40%. Per isolare le proteine citosoliche, il campione è stato centrifugato a 13.000g x 10' a 4°C.

Il sistema si basa sulla preparazione di una curva standard utilizzando l'enzima β galattosidasi purificato fornito dal kit e diluito in Reporter Lysis Buffer 1X ad una concentrazione di 0,01u/ μ l. Sia ai campioni della curva standard, sia alle diluizioni del campione di interesse, 50-100 μ l in un volume finale di 150 μ l raggiunto con il Reporter Lysis Buffer 1X, è stato aggiunto un uguale volume di Assay 2X Buffer che contiene il substrato ONPG, Onitrofenil- β -D-galattopiranoside.

I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente 30', durante i quali l'enzima idrolizza l'ONPG in O-nitrofenile, che colora il campione di giallo.

La reazione è stata interrotta con Sodio Carbonato ed è stata misurata l'assorbanza dei campioni a 420 nm in cuvette monouso in plastica utilizzando lo spettrofotometro DU 640 (Beckman Coulter, U.S.A.).

3.7 **Immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza è una tecnica che, sfruttando l'interazione antigene-anticorpo, permette di poter determinare la distribuzione *in situ* di un antigene.

Le diverse tecniche che sfruttano l'interazione antigene-anticorpo possono essere distinte in tecniche dirette e tecniche indirette. Nelle procedure dirette viene marcato l'anticorpo contro l'antigene di interesse, anticorpo primario; invece nelle procedure indirette il legame di un anticorpo non marcato con l'antigene è rilevato da un anticorpo anti-immunoglobuline, anticorpo secondario.

La marcatura degli anticorpi può essere effettuata con fluorocromi, che permettono di determinare la localizzazione cellulare dell'antigene di interesse attraverso il microscopio a fluorescenza.

Il funzionamento del microscopio a fluorescenza è molto intuitivo in quanto, in una prima fase, emette un fascio di luce infrarossa (<750nm) che colpisce il preparato. La caratteristica del marcatore fluorescente è che assorbe la luce e, grazie a reazioni di ossidoriduzione, la restituisce con lunghezza d'onda pari a circa 700nm (luce rossa) o 530nm(luce verde).

L'anticorpo primario utilizzato è un anticorpo policlonale di coniglio che riconosce specificatamente la 21 α -idrossilasi umana, fornito dalla Corgen.

Tale anticorpo è stato purificato dal siero di coniglio previa immunizzazione dello stesso con una proteina di fusione espressa in E. Coli e contenente un tratto della sequenza amminoacidica della CYP21, dal codone 164 al codone 495.

L'anticorpo secondario utilizzato è l' Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG fornito dalla Invitrogen. Dopo aver effettuato il saggio enzimatico ed aver raccolto il sovrantante, le cellule

trasfettate sono state sottoposte a due lavaggi in PBS 1X e fissate con metanolo-acetone 1:1, quindi lavate 4 volte con PBS 1X.

Le cellule sono state incubate 30' a temperatura ambiente in presenza dell'anticorpo primario diluito 1:1000 in 200 μ l di PBS 1X. Le cellule sono state sottoposte a 4 lavaggi consecutivi con PBS 1X e incubate 30' a temperatura ambiente con una diluizione 1:1600 in PBS 1X dell'anticorpo secondario.

Le cellule sono state lasciate per qualche minuto ad asciugare all'aria e poi osservate al microscopio a fluorescenza.

3.8 Studio dell'attività enzimatica e Thin Layer Chromatography (TLC)

Per quantificare l'attività funzionale dell'enzima 21 α -idrossilasi mutato, le cellule trasfettate in maniera transiente con il CYP21-WT, il controllo negativo ed i 5 diversi costrutti, sono state trattate con i substrati della 21 α -idrossilasi, il 17OH-Progesterone ed il Progesterone marcati e non marcati, forniti dalla Amersham Biosciences.

La 21 α -idrossilasi è l'enzima che nella corteccia surrenale catalizza la conversione del 17OH-Progesterone in 11-Deossicortisolo, precursore del cortisolo, e del Progesterone in Deossicorticosterone, precursore dell'aldosterone .

Utilizzando *in vitro* substrati marcati con trizio, è stato possibile valutare l'attività della 21 α -idrossilasi espressa dalle cellule, verificando la produzione di 11-deossicortisolo e di deossicorticosterone mediante Thin Layer Chromatography (29,30-34).

Dopo 48 h dalla trasfezione, le cellule sono state incubate in 500 μ l di DMEM per 45' a 37°C in presenza di 1nCi/ μ l di 3H-17OHP o 3H-Progesterone, 2 μ M di steroide non marcato e 4 mM di NADPH (Sigma-Aldrich), cofattore necessario al funzionamento dell'enzima.

Il terreno è stato raccolto e gli steroidi sono stati estratti dal mezzo aggiungendo 750 μ l di esano-etilacetato in concentrazione 1:1. I campioni sono stati centrifugati a 4500 rpm per 5' e le fasi organiche sono state raccolte. Alle fasi acquose rimaste sono stati aggiunti altri 750 μ l di esano-etilacetato ed ogni campione è stato centrifugato a 4500 rpm per 5'. Le nuove fasi organiche sono state unite alle precedenti ed ogni campione è stato portato a secco con lo Speed-Vacuum.

Le cellule sono state tripsinizzate e lisate in 200 μ l di Reporter Lysis Buffer 1X (Promega) e sul sovrantante di ogni campione è stata determinata spettrofotometricamente la concentrazione delle proteine utilizzando il metodo colorimetrico di Bradford. Questo metodo si basa sull'azione del Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG) che si lega specificatamente a residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina. Il CBBG si lega a questi residui in una forma anionica, con assorbanza massima a 595 nm. Il colorante nella soluzione madre si trova infatti in forma

cationica con un massimo di assorbanza a 470 nm. In questo modo l'assorbanza a 595 nm risulta direttamente proporzionale alla concentrazione delle proteine. La concentrazione di ogni campione è stata calcolata confrontando la sua assorbanza con quella di una curva standard ottenuta con albumina sierica bovina (BSA) a diverse concentrazioni.

La cromatografia su strato sottile (TLC, Thin Layer Chromatography), è una tecnica microanalitica altamente efficiente e con elevata risoluzione e riproducibilità.

Le componenti fondamentali sono una camera di eluizione, una fase stazionaria e una fase mobile. La fase stazionaria è costituita da un materiale granulare omogeneo fatto aderire a un supporto piano ed è immobilizzata sotto forma di strato sottile su una superficie generalmente piana, lungo la quale viene fatta correre la fase mobile (per capillarità, per gravità oppure esercitando una certa pressione), costituita da un solvente puro o da una miscela di solventi che correndo sulla fase stazionaria trascina il campione. L'insieme della fase stazionaria e del supporto è detto lastra.

Se la fase stazionaria è un materiale polare (come il gel di silice), la separazione di miscele è dovuta principalmente a meccanismi di assorbimento e perciò la fase mobile deve essere non polare; in questo caso si parla di cromatografia in fase diretta. Se invece lo stato è modificato (o imbevuto) con sostanze non polari, la separazione è dovuta principalmente a meccanismi di ripartizione e quindi la fase mobile deve essere relativamente polare; in questo caso si parla di cromatografia in fase inversa.

La TLC consente di ottenere efficaci separazioni in tempi che variano da poche decine di minuti a 1-2 ore.

La camera di eluizione è in genere un recipiente di vetro di forma e volume opportuni dotato di un coperchio a tenuta. L'eluente, fase mobile, deve essere collocato sul fondo del recipiente, in modo da raggiungere il livello di 0,5-1 cm; poi si chiude ermeticamente il coperchio e si lascia a condizionare. Il grado di saturazione (condizionamento) della camera di sviluppo è molto importante per la buona riuscita della separazione cromatografia.

La miscela da separare è seminata sul lato più corto della lastra, sotto forma di piccole macchie (deposizione a goccia). La linea di partenza delle macchie viene tracciata con una matita morbida di grafite a 1,5-2 cm dal bordo inferiore della lastra (in ogni caso sopra il livello raggiunto dall'eluente). dopodiché si immerge parzialmente la lastra nell'eluente, scelto in modo opportuno, il quale migra e trascina, con velocità diverse i singoli componenti.

Questo processo, in cui la miscela si suddivide nei diversi componenti, è detto sviluppo. Quando lo sviluppo è completato, si estrae la lastra dalla camera di eluizione, si segna con una matita morbida il livello raggiunto dal fronte del solvente e si asciuga all'aria o con l'aiuto di un

phon. Se le macchie risultano colorate, quindi visibili ad occhio nudo, non ci sono problemi altrimenti bisogna ricorrere ad alcuni metodi.

Se le sostanze da rivelare possiedono cromofori derivanti da particolari gruppi funzionali quali doppi legami coniugati, carbonili, carbossili, ecc... è sufficiente illuminare la lastra con una lampada UV che emetta a 254 e 366 nm; si osservano così delle macchie luminose sul fondo scuro. Se invece le sostanze da rivelare non possiedono cromofori, si può usare una lastra la cui fase stazionaria, prima o dopo l'eluizione, viene impregnata di una sostanza fluorescente ai raggi UV. Illuminando la lastra con le apposite lampade, si osservano delle macchie scure su sfondo fluorescente.

Una volta sviluppata la lastra si determina per ogni campione il fattore di ritenzione (Rf) in base alla distanza che ogni macchia ha raggiunto dal punto di caricamento.

$$R_f = \frac{\text{distanza tra macchia e linea di deposizione}}{\text{distanza tra il fronte del solvente e linea di deposizione}} = b/a$$

I componenti incogniti vengono identificati per confronto con gli Rf degli standard .

Nel nostro caso è stata realizzata una cromatografia in fase diretta utilizzando come fase stazionaria gel di silice polimerizzato su alluminio. Ogni campione, dopo essere stato portato a secco, è stato risospeso in 25 µl di metanolo e caricato sul lato più corto della lastra. 17OH-progesterone e 11-deossicortisolo sono stati separati in cloroformio:metanolo 97:3, progesterone e deossicorticosterone sono stati separati in cloroformio:acetone 94:6.

Finito lo sviluppo, la lastra è stata sottoposta agli UV per visualizzare le macchie scure corrispondenti agli steroidi contenuti in ogni campione caricato e la radioattività di ogni macchia è stata misurata mediante liquido di scintillazione.

FATTORI DI RITENZIONE:

17OH-progesterone: 0,7 progesterone: 0,6
11-deossicortisolo: 0,4 deossicorticosterone: 0,3

RISULTATI

4.1 *Analisi Molecolare*

Circa nel 90% dei casi il deficit della 21 α -idrossilasi è causato da delezioni del gene CYP21A2 o da mutazioni puntiformi che originano da conversioni geniche che coinvolgono il gene e lo pseudogene CYP21A1P. L'indagine molecolare routinaria basata sullo screening delle mutazioni puntiformi note della 21 α -idrossilasi mediante PCR allele specifica e sequenziamento delle regioni specifiche del DNA, e sull'analisi di grossi riarrangiamenti mediante Southern Blot, non permetteva di spiegare la clinica ed il fenotipo di 5 pazienti con sospetto deficit della 21 α -idrossilasi, identificati a seguito di test ormonali.

Mediante sequenziamento dell'intero gene della 21 α -idrossilasi sono state identificate 5 "mutazioni de novo" nei 5 pazienti, cioè mutazioni puntiformi che apparentemente non derivano da conversioni geniche in quanto non riscontrate nello pseudogene, che hanno permesso di individuare l'esatta correlazione genotipo-fenotipo nei pazienti in esame.

Pt	Sesso	Fenotipo	Dosaggio Ormonale		Genotipo (Pat/Mat)	Codon change
			17OHP 0'	17OHP 60'		
1	F	SW	>2000	-	Delezione/ L122P	ctc --- ccc
2	M	NC	170	1700	M150R /V281L	atg --- agg
3	F	SW	15000	>50000	R356W/ Q481X	cag --- tag
4	M	NC	3212	>6250	V281L/V281L+ R366H	cgc--- cac
5	F	SW	>2000	-	E161X /Delezione	gag ---tag

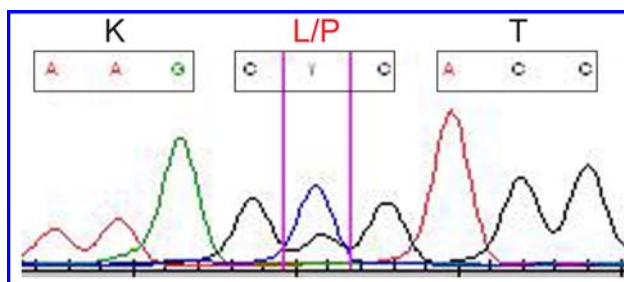
Prima Paziente

La prima paziente analizzata è stata una bambina affetta da sindrome adrenogenitale classica con perdita di sali. Dopo lo screening per le mutazioni puntiformi tramite sequenziamento evidenziando nessuna mutazione nota, si è proseguito con lo studio dei grossi riarrangiamenti mediante Southern Blotting.

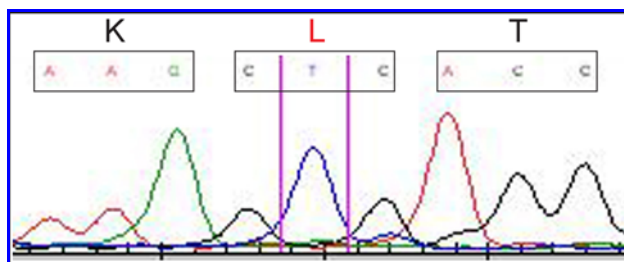
Da questo ultimo si è evidenziata una delezione del gene CYP21A2 in eterozigosi ereditata dal padre.

Mediante sequenziamento del gene CYP21 è emersa una sostituzione di una timina in citosina in posizione 743 codificante per una prolina anziché per una leucina al codone 122 nell'esone 3 (L122P). Considerando la correlazione genotipo-fenotipo si è ipotizzando che questa mutazione, possa causare la completa perdita funzionale dell'attività della 21 idrossilasi.

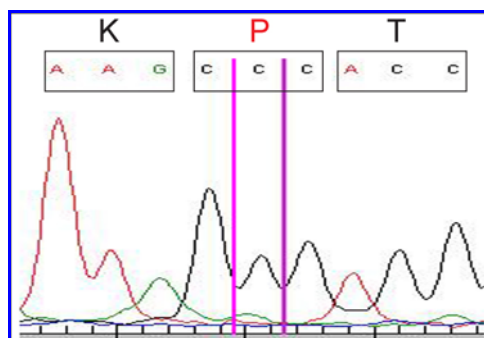
Madre: 743 T/C L122P



Padre: WT



Paziente: 743 T/C omozigote



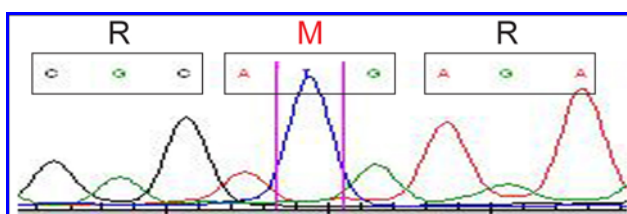
Seconda Paziente

Il secondo paziente analizzato è stato un bambino affetto da sindrome adrenogenitale con forma classica. Il sequenziamento per lo studio delle mutazioni puntiformi ha evidenziato la presenza della mutazione V281L ereditata dalla madre, mentre lo studio per i grossi riarrangiamenti non ha evidenziato nessuna delezione del gene.

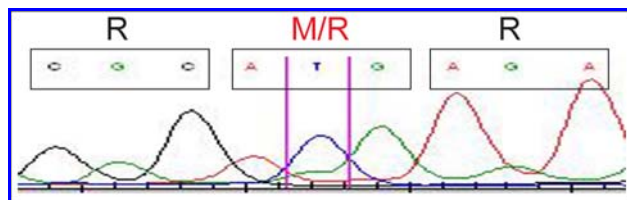
Sequenziando l'intero gene si è evidenziata una sostituzione eterozigote timina/guanina in posizione 933, che determina la sostituzione di una metionina in arginina al codone 150 nell'esone 4 (M150R).

Questo genotipo è stato ereditato dal padre in quanto presenta l'eterozigosi.

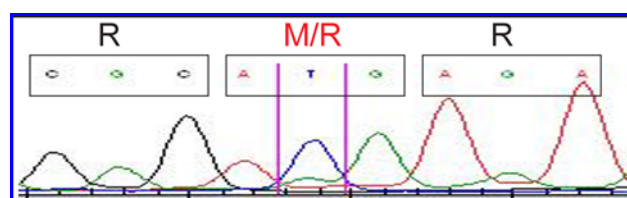
Madre: WT



Padre: 933 T/G M150R



Paziente: 933 T/G M150R



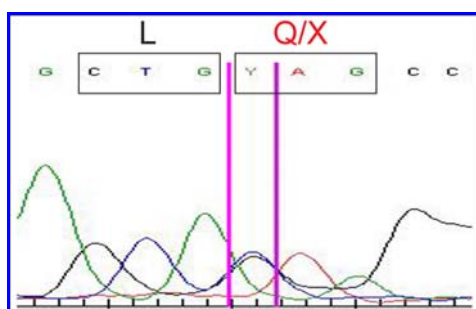
Terzo Paziente

Il terzo paziente è una bambina affetta da sindrome adrenogenitale classica con perdita di sali.

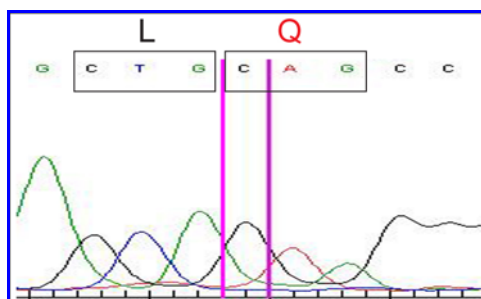
Il sequenziamento per lo studio delle mutazioni puntiformi ha evidenziato la presenza della R356W, mutazione ereditata dal gene paterno. Il Southern Blotting non ha evidenziato grossi riarrangiamenti, ma l'intero sequenziamento del gene ha evidenziato una sostituzione eterozigote citosina\timina in posizione 2662 determinando l'inserimento di un codone di stop TAG in sostituzione della glutammina al codone 481 nell'esone 10 (Q481X).

Dopo aver approfondito lo studio, questa sostituzione è stata evidenziata nel gene materno in forma eterozigote. La correlazione genotipo-fenotipo permette di ipotizzare che la mutazione Q481X possa causare la completa perdita funzionale dell'attività della 21-idrossilasi.

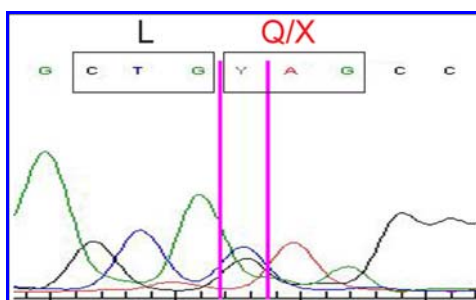
Madre: 2662 C/T Q481X



Padre: WT



Paziente: 2662 C/T Q481X

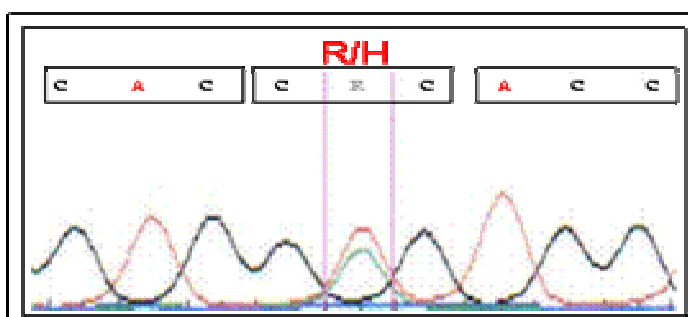


Quarto Paziente

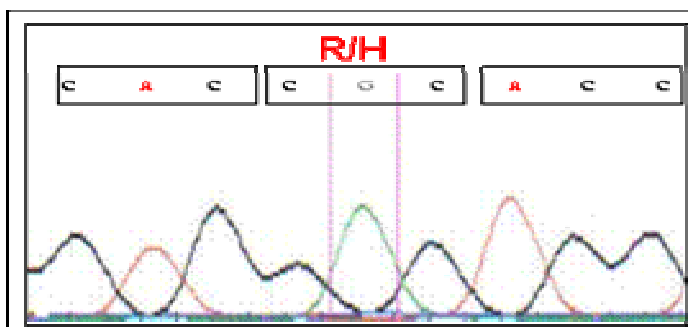
Il quarto paziente è un maschio con sindrome adrenogenitale non classica. Il sequenziamento per lo studio delle mutazioni puntiformi ha evidenziato la presenza della mutazione V281L in omozigosi, la ricerca dei grossi riarrangiamenti ha avuto esito negativo.

Il sequenziamento dell'intero gene, eseguito poiché il paziente presentava elevati livelli basali e dopo stimolo del 17OHP, al fine di verificare la presenza di mutazioni nuove sullo stesso allele portante la mutazione V281L ha evidenziato la presenza di una nuova mutazione sull'allele materno, la sostituzione di una guanina con una adenina nel codone 366 che porta alla sostituzione di una arginina con una istidina nella catena aminoacidica (R366H). Attività enzimatica.

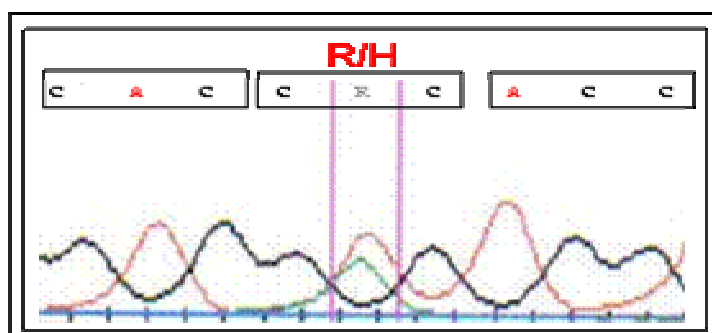
Madre: 366 G/A R366H



Padre: WT



Paziente: 366 G/A R366H

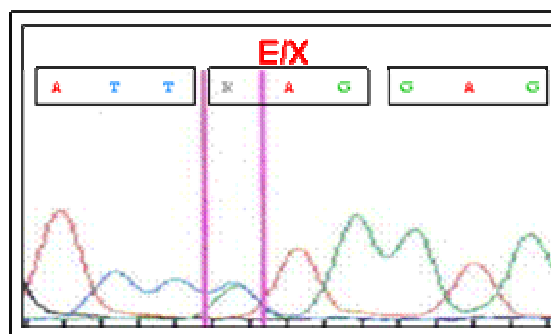


Quinto Paziente

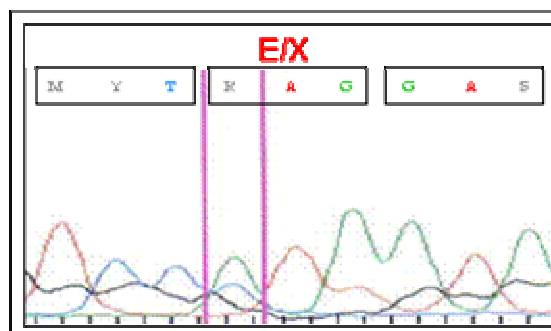
La quinta paziente è una bambina affetta da sindrome adrenogenitale classica con perdita di sali. Il sequenziamento per le mutazioni puntiformi non ha evidenziato alcuna mutazione nota, invece il Southern Blotting ha evidenziato una delezione del gene CYP21A2 ereditata dalla madre.

Analizzando l'intero gene mediante sequenziamento, questo ha evidenziato una sostituzione eterozigote guanina\timina in posizione 161 inserendo un codone di stop TAG in sostituzione di un acido glutammico al codone 161 (E161X) nell'esone 4.

Padre: 161 G/T E161X



Paziente: 161 G/T E161X

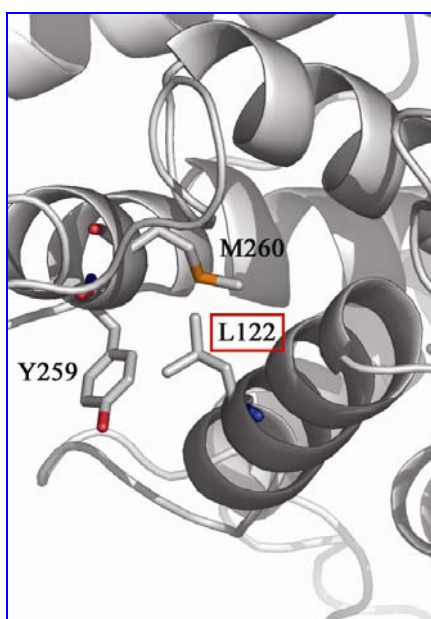


4.2 Protein Modelling

Per studiare la relazione strutturale e funzionale della CYP21A2 e quindi per comprendere meglio le cause molecolari del deficit enzimatico in presenza di nuove mutazioni, è stato costruito un modello tridimensionale del gene CYP21A2 umano. Mediante l'utilizzo di BLAST è stato possibile rintracciare delle sequenze omologhe alla CYP21A2 umana, evidenziando nel citocromo P450C5 di coniglio un buon template per il modelling molecolare.

L'allineamento tra la sequenza codificante della CYP21A2 e quella del citocromo P450 2C5 è stato ottimizzato con il "sequence-to-structure alignment protocol Multiple Mapping Method (MMM)", e quindi utilizzato per il molecular modeling realizzato con il programma MODELLER (versione 8.1). Sono stati ottenuti 10 diversi modelli e il migliore è stato convalidato con PROCHECK.

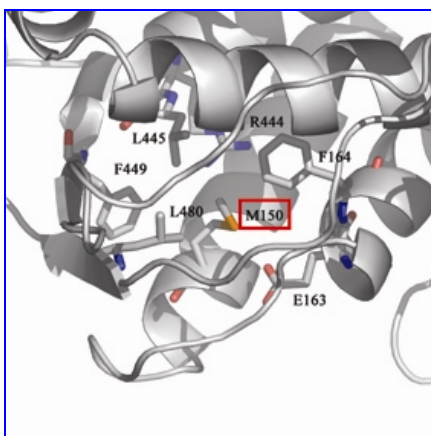
La leucina in posizione 122 è un residuo aminoacidico conservato in vari citocromi P450 e probabilmente una sua sostituzione con una prolina potrebbe rompere l'alfa elica che il residuo in questione contribuisce a formare.



Modello molecolare del residuo L122P del gene CYP21A2

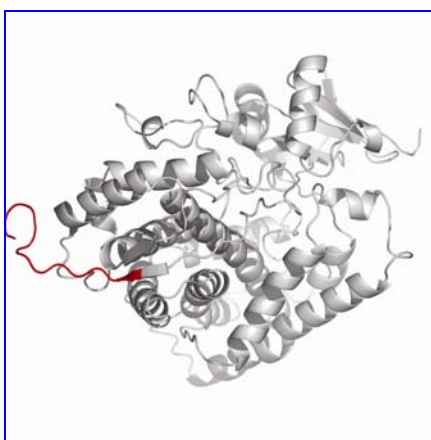
La metionina in posizione 150 si trova in una tasca, all'interno della quale stabilisce forti interazioni idrofobiche con i residui L480, F164, F449 e L445.

La sostituzione della metionina con una arginina potrebbe destabilizzare queste interazioni ed inoltre introdurre forze di repulsione nei confronti dei residui R444 e E163, distanti circa 4.0 Å dalla metionina, destabilizzando complessivamente la struttura proteica.



Modello molecolare del residuo M150R del gene CYP21A2

La proteina tronca che origina dalla sostituzione della glutamina in posizione 481 con il codone di stop amber, è priva del foglietto beta antiparallelo che normalmente forma una sorta di cappello sopra il core proteico costituito da quattro alfa eliche legate. Nella proteina tronca questo core proteico si trova esposto al solvente.



Modello molecolare del residuo Q481X del gene CYP21A2

La mutazione R366H è una mutazione conservativa ed è pertanto difficile ipotizzare un meccanismo funzionale in base al modello strutturale. L'arginina è a circa 4 Å dal glutammato in posizione 93, con il quale è possibile che si formi un legame idrogeno mediante le catene laterali, legame che verrebbe a mancare in presenza di una istidina, che possiede una catena laterale più corta.



Modello molecolare del residuo R366H del gene CYP21A2

Per quanto riguarda la mutazione E161X, determina una precoce interruzione della proteina che ne impedisce la struttura terziaria.

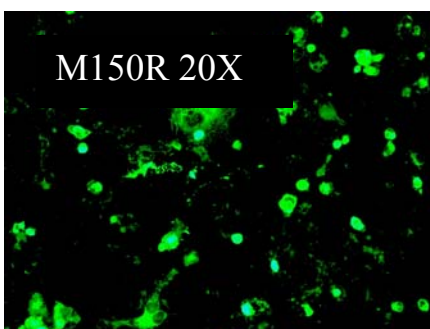
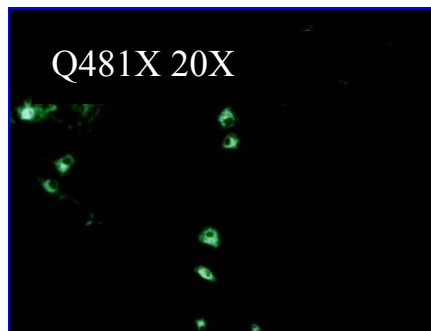
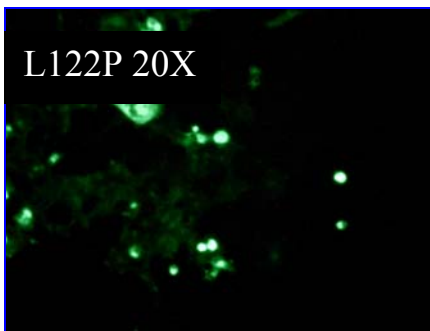
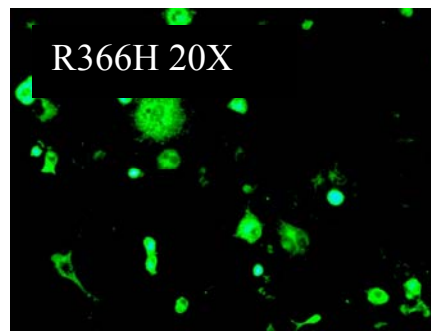
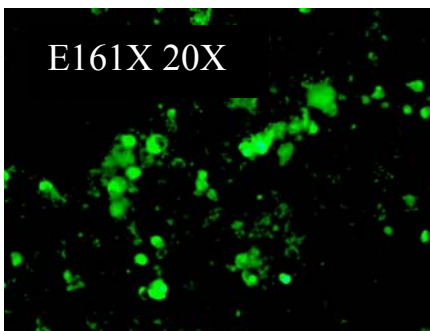
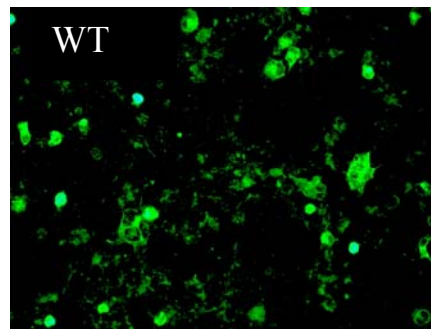
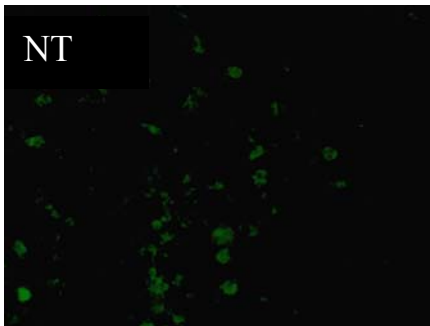


Modello molecolare del residuo E161X del gene CYP21A2

4.3. **Immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza ha permesso di valutare l'espressione della 21- α idrossilasi sulle linee cellulari COS7 trasfettate sia con il plasmide CYP21 WT che con le nuove mutazioni considerate (CYP21- L122P, CYP21-M150R , CYP21-Q481X, CYP21-E161X e CYP21-R366H).

In seguito alla trasfezione è stato possibile verificare l'assenza dell'espressione della 21- α idrossilasi nelle cellule trasfettate con il plasmide vuoto; diversamente di quanto accade nelle cellule trasfettate con i plasmidi contenenti le mutazioni.



4.4 **Studio attività enzimatica**

Per valutare l'effetto delle nuove mutazioni sull'attività della 21 α -idrossilasi, cellule COS7 sono state trasfettate con i diversi costrutti, CYP21-WT, CYP21-L122P, CYP21- M150R, CYP21-Q481X e CYP21-Q318X.

L'attività enzimatica delle cellule trasfettate è stata valutata in presenza dei due substrati naturali triziati, 17OH-progesterone e progesterone, in concentrazione pari a 1nCi/ μ l.

L'attività degli enzimi mutati è stata comparata con l'attività dell'enzima wt, considerata pari al 100%.

Come illustrato in figura X la mutazione L122P riduce l'attività enzimatica al 3,97 \pm 1,58% per il 17OH-progesterone e a -1,86 \pm 2,59% per il progesterone. La mutazione M150R riduce l'attività enzimatica al 18,31 \pm 0,84% per il 17OH-progesterone e a 4,57 \pm 0,65% per il progesterone. La mutazione Q481X riduce l'attività enzimatica a 5,17 \pm 1,96% per il 17OH-progesterone e a 0,07 \pm 0,12% per il progesterone.

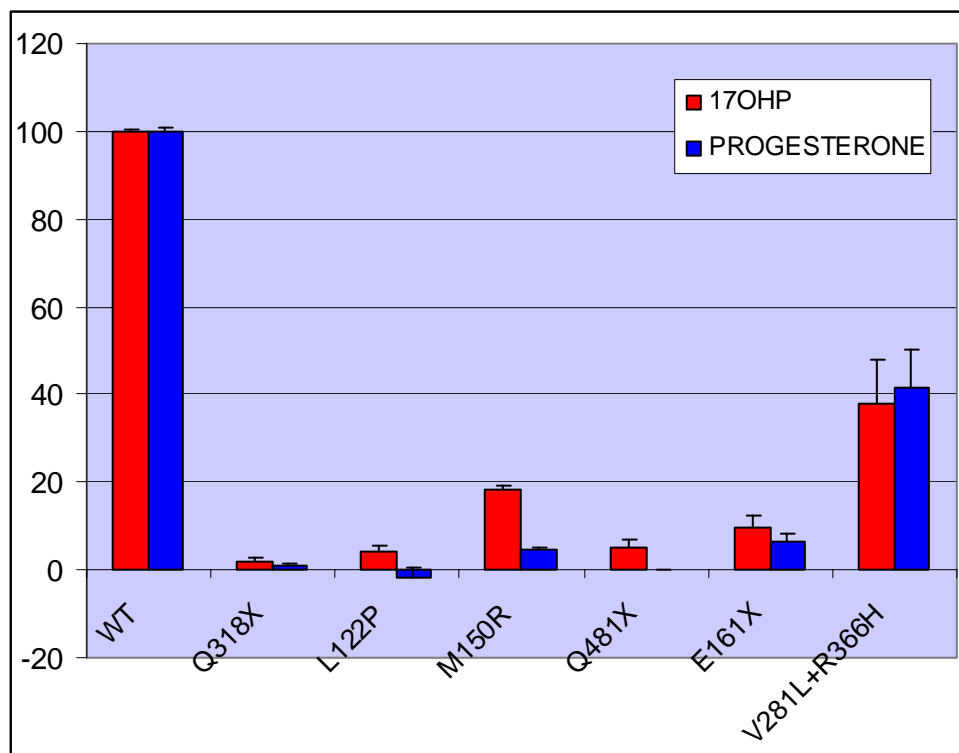
La mutazione E161X riduce l'attività enzimatica in presenza di entrambi i substrati, all'11,46 \pm 3,68 e 6,32 \pm 1,85 rispettivamente per il 17OHP e per il Progesterone.

La presenza della doppia mutazione V281L + R366H non modifica significativamente l'attività enzimatica della proteina (37,71 \pm 10,16 e 41,46 \pm 8,64, rispettivamente per il 17OHP e per il Progesterone), con valori simili a quelli riportati in presenza della sola mutazione V281L.

17OH PROGESTERONE			
	Media	SE	N
WT	100	0,4	4
Q318X	2,10	0,92	2
L122P	3,97	1,58	3
M150R	18,31	0,84	3
Q481X	5,17	1,96	3
E161X	9,79	2,50	3
V281L+R366H	37,71	10,16	3

(Tabella 2)

PROGESTERONE			
	Media	SE	N
WT	100	0,7	3
Q318X	0,9	0,70	2
L122P	-1,86	2,59	2
M150R	4,57	0,65	3
Q481X	0,07	0,12	3
E161X	6,32	1,85	3
V281L+R366H	41,46	8,64	3



(Figura 15) .Attività enzimatica della 21-idrossilasi espressa in cellule COS7. L'attività di ogni enzima mutato è stata espressa in percentuale rispetto all'attività enzimatica dell'enzima wt, considerata pari al 100%.

DISCUSSIONE

L'Iperplasia Congenita del Surrene è una malattia ereditaria che colpisce entrambi i sessi. E' causata da un difetto enzimatico trasmesso geneticamente, che riguarda la sintesi di due ormoni: il cortisolo e l'aldosterone.

Nella forma più frequente di SAG (circa il 95% dei casi) l'alterazione genetica consiste nel deficit dell'enzima 21-idrossilasi causando una minor produzione degli ormoni precedentemente citati, determinando quadri manifestazioni cliniche che vanno dalle forme classiche più gravi con perdita di sali e virilizzazione completa dei genitali esterni delle femmine, alle manifestazioni più lievi delle forme non classiche.

Le diverse manifestazione cliniche dipendono dall'inattivazione della 21 α -idrossilasi causata da mutazioni nella sequenza codificante del gene CYP21A2, il 95% delle quali derivano dal trasferimento di microsequenze al gene dallo pseudogene inattivo CYP21A1P. Il 5-10% delle mutazioni a carico del gene CYP21A2 sono invece mutazioni de novo o dovute a rari polimorfismi dello pseudogene, come la P453S, e non è sempre facile poterle correlare a determinati fenotipi clinici della sindrome adrenogenitale.

Inoltre nella gran parte dei casi i pazienti risultano essere eterozigoti composti per più mutazioni sul gene CYP21A2 e il loro fenotipo dovrebbe essere correlato all'attività dell'allele con la mutazione meno grave. In questi casi è quindi fondamentale l'analisi *in vitro* dell'attività enzimatica delle singole mutazioni del gene in modo da poter classificare queste ultime in base alla gravità della sintomatologia a cui sono correlate.

Nonostante l'apparente elevata possibilità di individuazione basata sui sintomi, la diagnosi clinica del deficit di 21 α -idrossilasi è insufficiente nel periodo neonatale. In oltre il 70% dei pazienti con deficit di 21 α -idrossilasi classico, l'alterazione della sintesi di aldosterone può condurre nelle prime settimane di vita a gravi crisi di perdita dei sali potenzialmente mortali. I maschi sono particolarmente a rischio data la difficoltà di diagnosi prima che si verifichi tale evento. La rivelazione di un più elevato numero di pazienti viventi di sesso femminile con malattia, laddove non sia in atto lo screening neonatale, ha infatti indicato come un certo numero di maschi con iperplasia surrenalica muore probabilmente durante l'infanzia ed ha incrementato l'applicazione di questa metodica diagnostica.

Con l'introduzione dello screening neonatale per la sindrome adrenogenitale e, più recentemente, di quello prenatale mediante dosaggio ormonale del 17OH-Progesterone sul liquido amniotico e il test genetico su amniociti, molti pazienti possono essere diagnosticati prima della comparsa di sintomi e segni permanenti.

La genotipizzazione del gene CYP21A2 e la caratterizzazione funzionale di ogni singola mutazione sono quindi fondamentali sia per decidere il miglior trattamento farmacologico per ogni paziente, sia per rendere possibile consulenze genetiche per le famiglie dei malati. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di caratterizzare funzionalmente cinque nuove mutazioni missenso del gene CYP21A2 trovate in cinque distinti gruppi familiari.

La *paziente n° 1*, una bambina affetta da una forma classica di SAG con perdita di sali, presenta sull'allele materno la mutazione de novo L122P, mentre sull'allele paterno presenta la delezione del gene CYP21A2. Grazie all'analisi funzionale è stato calcolato che la mutazione L122P mantiene un'attività nei confronti del 17OH-progesterone pari a 3,97% e nei confronti del progesterone un'attività pari a -1,86%. Dall'analisi strutturale mediante "molecular modelling" è possibile ipotizzare che la sostituzione della leucina con una prolina destabilizza l'alfa elica che il residuo in questione contribuisce a formare, generando un enzima con un'attività notevolmente ridotta rispetto a quella dell'enzima wt.

La mutazione L122P causa quindi una drastica diminuzione dell'attività enzimatica correlabile ad una forma classica con "perdita di sali", concorde con i valori dei dosaggi ormonali realizzati sulla paziente a 0 e 60 minuti dopo la somministrazione di ACTH.

Il *paziente n° 2*, un bambino affetto da una forma non classica di SAG, presenta sull'allele materno la mutazione nota V281L correlata a tale fenotipo, mentre sull'allele paterno presenta la mutazione de novo M150R. L'analisi funzionale ha mostrato un'attività pari a 18,31% per il 17OH-progesterone e pari a 4,57% per il progesterone. La destabilizzazione della regione idrofobica causata dalla sostituzione della metionina con un'arginina genera un'enzima con una ridotta attività enzimatica, inferiore al 20%. Si può ipotizzare pertanto che tale mutazione sia associata al fenotipo classica della sindrome adrenogenitale, con valori compatibili con la forma virilizzante. Sono necessari comunque ulteriori esperimenti per confermare tale ipotesi diagnostica, in particolare per stabilire la possibile produzione di aldosterone.

La *paziente n°3*, una bambina affetta da una forma classica con perdita di sali, presenta sull'allele materno la mutazione de novo Q481X, mentre sull'allele paterno la mutazione nota R356W correlata ad una forma classica della sindrome adrenogenitale. L'attività funzionale della mutazione Q481X è risultata pari a 5,17% per il 17OH-progesterone e 0,07% per il progesterone. La presenza di un codone di stop in posizione 481 priva l'enzima di un foglietto beta antiparallelo che dovrebbe proteggere il core proteico idrofobico. Questa assenza genera un enzima non

funzionante, attività che correla con una forma classica della sindrome adrenogenitale da deficit della 21 α -idrossilasi, come ipotizzabile dai risultati ormonali e dal fenotipo, attività funzionale che peraltro impedisce una sintesi di aldosterone sufficiente alla prevenzione di crisi surrenaliche.

Il *paziente n° 4* è un bambino affetto da una forma non classica di SAG e presenta la mutazione nota V281L correlata a tale forma in omozigosi e sull'allele materno la mutazione de novo R366H. In questo caso, indipendentemente dall'effetto associato a quest'ultima mutazione, il genotipo del paziente correla con i dati clinici e con il fenotipo, infatti poiché il fenotipo è generalmente correlato all'attività dell'allele con la mutazione meno grave prevarrebbe in ogni caso l'effetto dell'allele paterno. Dall'analisi mediante "molecular modelling" sembrerebbe comunque che l'effetto strutturale della mutazione conservativa R366H sia di lieve entità e che quindi questa non influisca significativamente sull'attività dell'enzima, anche in coesistenza sullo stesso allele della mutazione V281L. I dati funzionali confermano tale ipotesi diagnostica, con valori dell'attività enzimatica ridotti ma compatibili con una forma non classica della malattia.

La *paziente n° 5*, una bambina affetta da una forma classica con perdita di sali, presenta sull'allele materno una delezione del gene mentre sull'allele paterno è stata riscontrata la mutazione de novo E161X che porta alla formazione di un codone di stop molto precocemente nella sequenza aminoacidica. Questo determina una interruzione della proteina che ne impedisce la struttura terziaria generando quindi un enzima non funzionante in accordo con i dati clinici e funzionali della paziente.

La sindrome adrenogenitale da deficit della 21-idrossilasi è caratterizzata da una sintomatologia estremamente variabile, che si estende dalla forma neonatale, potenzialmente letale, a forme criptiche scoperte in età adulta. Il nostro studio ha confermato come l'analisi funzionale *in vitro* sia di fondamentale importanza nella caratterizzazione clinica dei pazienti affetti da tale patologia, confermando la buona correlazione genotipo-fenotipo caratteristica della sindrome. Questo approccio permette di individualizzare la terapia più appropriata per il singolo paziente e di fornire il counseling genetico più adeguato, anche in presenza di mutazioni tipicamente associate alla forma lieve della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. **White PC, Speiser PW, 2000:** Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocrine Reviews*, 21 (3): 245-291
2. **Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, Bulun SE 1994:** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342-355
3. **Scott LV, Dinan TG 1998:** Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci* 62:1985-1998
4. **Kagawa N, Waterman MR 1991:** Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the cAMP responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. *J. Biol Chem* 266:11199-11204
5. **Helleday J, Siwers B, Ritzen EM, Carlstrom K 1993:** Subnormal androgen and elevated progesterone levels in women treated for congenital virilising 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin Endocrinol Metab* 76:933-936
6. **Urban Md, Lee PA, Migeon CJ 1978:** Adult height and fertility in men congenital virilising adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 299:1392-1396
7. **Lo JC, Schwitzgebel VM, Tyrrell JB, Fitzgerald PA, Kaplan SL, Conte FA, Grumbach MM 1999:** Normal female infants born of mothers with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84:930-936
8. **Kohn B, Levine LS, Pollack MS, Pang S, Lorenzen F, Levy D, Lerner AJ, Rondanini GF, Dupont B, New MI 1982:** Late onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 55:817-827

9. **Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, Day DJ 1999:** Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84:960-966
10. **Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB, Jelley DH, Blackett PR, Riley WJ 1999:** Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153:1272-1278
11. **Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC 1992:** Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90:584-595
12. **Wudy SA, Dorr HG, Solleder C, Djalali M, Homoki J 1999:** Profiling steroid hormones in amniotic fluid of mid pregnancy by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry: reference values and concentrations in fetuses at risk for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2724-2728
13. **Stratakis CA, Rennert OM 1999:** Congenital adrenal hyperplasia: molecular genetics and alternative approaches to treatment. *Crit Rev Clin Lab Sci* 36:329-363
14. **Tajima T, Fujieda K, Mikami A, Igarashi Y, Nakae J, Cutler Jr GB 1998:** Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by the modified polymerase chain reaction to detect splice site mutations in the CYP21 gene. *Endocr J* 45:291-295
15. **Kominami S, Hara H, Ogishima T, Takemori S 1984:** Interaction between cytochrome P-450 (P-450C21) and NADPH-cytochrome P-450 reductase from adrenocortical microsomes in a reconstituted system. *J Biol Chem* 259:2991-2999
16. **White PC, New MI, Dupont B 1986:** Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5111-5115
17. **Carroll MC, Campbell RD, Porter RR 1985:** Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in Man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:521-525

18. **Chemaitilly W, Betensky B P, Marshall I, Wei J Q, Wilson R C and New MI, 2005:** The natural history and genotype-phenotype nonconcordance of HLA identical sibling with the same mutations of the 21-hydroxylase gene. *Journal of pediatric Endocrinology & Metabolism* 18:143-153
19. **Carroll MC, Palsdottir A, Belt KT, Porter RR, 1985:** Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes class III region. *EMBO J* 4:2547-2552
20. **Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama 1988:** Aberrant splicing and misense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450 (C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7486-7490
21. **Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T 1990:** Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 46:1178-1186
22. **Schneider PM, Carroll MC, Alper CA, Rittner C, Whitehead AS, YUnis EJ, Colten HR 1986:** Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes. *J Clin Invest* 78:650-657
23. **Spiro R P, Christian S L, Ledbetter D H, New M I, Wilson R C, Roizen N, Rosenfield R L, 1999:** Intrauterine growth retardation associated with maternal uniparental disomy for chromosome 6 unmarked by congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res* 46 (5):510
24. **Robins T, Barbaro M, Lajic S and Wedel A, 2004:** Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 90(4):2148-2153
25. **Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, Pirazzoli P, Cacciari E, Cicognani A and Wedell A, 2006:** Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med* 84:521-528
26. **Lajic S, Clauin S, Robins T, Vexiau P, Blanchè H, Bellanne-Chantelot C and Wedell A, 2002:** Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2824-2829

27. **Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, Pirazzoli P, Cacciari E, Cicognani A and Wedell A, 2006:** Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med* 89(5):2402-2407
28. **Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A and Luthman H, 1997:** Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1
29. **Krone N, Riepe F G, Grotzinger J, Partsch C-J and Sippel W G, 2005:** Functional characterization of two novel point mutations in the CYP21 gene causing simple virilising forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1):445-454