

Università Degli Studi Di Palermo
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica

*Dottorato di Ricerca In" Genetica e fisiopatologia del danno cardiovascolare nelle
malattie endocrino-metaboliche"*
Direttore Prof. Giuseppe Licata

XXII ciclo – Area CUN 6

Titolo della tesi:

**"Estensione della definizione di Malattia di Fabry in base ai
dati ottenuti dallo studio dell'attività enzimatica e degli
aplotipi genetici"**

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Federica Pizzo

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Anna Licata

Co-Tutor:

Chiar.mo Dott. Giuseppe Albeggiani

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

1. INTRODUZIONE	3
2. LE MALATTIE LISOSOMIALI	6
3. LA MALATTIA DI FABRY	8
3.1 NATURA DELLA MALATTIA.....	8
3.2 GENETICA DELLA MALATTIA DI FABRY	10
3.3 L'ENZIMA α -GALATTOSIDASI A	13
3.4 QUADRI CLINICI DI PRESENTAZIONE.....	15
3.4.1 VARIANTI ATIPICHE DELLO STATO EMIZIGOTE.....	20
3.4.2 MANIFESTAZIONI CLINICHE NELL'ETEROZIGOTE	21
3.5 TERAPIA.....	23
4. OBIETTIVO DELLO STUDIO	24
5. MATERIALI E METODI	29
5.1 ANALISI ENZIMATICA	29
5.1.1 MATERIALI.....	30
5.1.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	30
5.1.3 REAGENTI.....	33
5.1.4 PROTOCOLLO DI REAZIONE.....	34
5.1.5 CURVA STANDARD DI CALIBRAZIONE	37
5.2 ANALISI BIOMOLECOLARE.....	39
5.2.1 ESTRAZIONE DEL DNA	39
5.2.2 REAL-TIME PCR IN "HIGH RESOLUTION MELTING"	43
5.3.2 SEQUENZIAMENTO	50
6. RISULTATI	58
6.1 OTTIMIZZAZIONE DEL SAGGIO DI ATTIVITA' DELL' α - GALATTOSIDASI A	58
6.2 DRIED BLOOD FILTER PAPER TEST.....	61

6.3	LEUCOCITI E LINFOCITI	65
6.4	PLASMA	66
6.5	ANALISI BIOMOLECOLARE.....	68
7.	DISCUSSIONE.....	77
8.	BIBLIOGRAFIA	82

1. INTRODUZIONE

La malattia di Anderson-Fabry, o malattia da deficienza della α -galattosidasi A, è una rara malattia ereditaria caratterizzata da un difetto del gene che codifica per l'enzima lisosomiale α -galattosidasi (α -Gal). Tale difetto può portare ad una carenza parziale o totale dell'enzima. La malattia di Anderson-Fabry è classificata tra le sfingolipidosi maggiori ed è considerata rara, avendo una prevalenza di 1:40.000, anche se, come mostrano gli studi degli ultimi anni, è molto più diffusa di quanto comunemente si ritenga [1].

È stato documentato che l'errore enzimatico è trasmesso da un gene costituito da sette esoni, presente sul braccio lungo del cromosoma X, in regione q 21, 22. I maschi trasmettono quindi, il gene difettoso a tutte le figlie ma a nessuno dei figli maschi. Le femmine hanno invece una probabilità del 50% di trasmettere il gene difettoso alla progenie (sia maschi che femmine). A oggi, sono state osservate più di 400 mutazioni nel gene α -galattosidasi A.

L' α -galattosidasi A è una idrolasi lisosomiale che di norma, interviene nel metabolismo glicosfingolipidico, staccando il galattosio legato in α dal globotriaosilceramide (Gb3). L'interruzione di tale processo porta all'accumulo di Gb3 all'interno dei lisosomi danneggiando il normale funzionamento cellulare e dando origine al fenomeno che sta alla base della malattia di Fabry ("ipotesi citotossica" [2]).

L'accumulo di glicosfingolipidi neutri avviene all'interno dei lisosomi delle cellule endoteliali, epiteliali, della muscolatura liscia, delle cellule del miocardio e del rene, nelle cellule del sistema reticoloendoteliale, del tessuto connettivo, dell'epitelio corneale, dei gangli nervosi e nelle

cellule perineurali del sistema nervoso autonomo. Nel 1898 un dermatologo inglese, W. Anderson, pubblicava sul British Journal of Dermatology il caso clinico di un paziente di sesso maschile dell'età di 39 anni, che presentava angiocheratoma diffuso con evidente presenza di proteine nelle urine. Anderson avanzava il sospetto che il paziente non avesse semplicemente una malattia della pelle, ma presentasse una malattia sistemica e che le anomalie dei capillari, che egli osservava a livello cutaneo, potessero essere presenti anche a livello dei capillari renali. Nello stesso anno, senza essere a conoscenza della pubblicazione di W. Anderson, il dermatologo tedesco J. Fabry pubblicava sulla rivista Archives Von Dermatologie und Siphilis, il caso clinico di un maschio di 13 anni che presentava angiocheratoma diffuso, albumina nelle urine, e piccoli aneurismi a carico delle arteriole (fig. 1a, 1b).

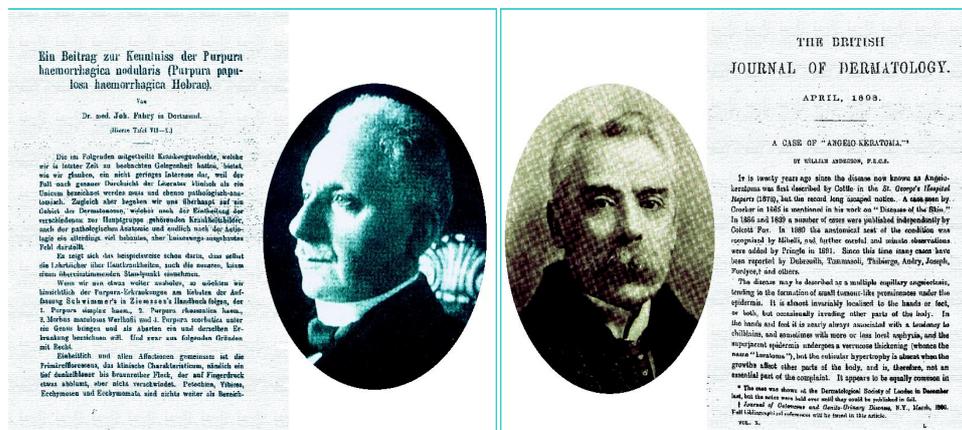


Fig 1: a) William Anderson e la sua pubblicazione originale del 1898. b) Johannes Fabry e la sua pubblicazione originale risalente al 1898.

Bisogna aspettare il 1955 per vedere pubblicato su Archives of Internal Medicine il primo "report" americano su di una malattia rara: la malattia di Fabry.

Nel 1967 Brandy dimostrava che il difetto enzimatico risiedeva nella trioxosidasi ceramide, una idrolasi galattosilica contenuta nei lisosomi del

citoplasma delle cellule. Successivamente il difetto enzimatico della malattia di Anderson-Fabry fu propriamente identificato nella α -galattosidasi A.

Le manifestazioni cliniche della malattia dipendono dalla presenza delle lesioni d'organo, e sono tipicamente severe nei soggetti maschi (emizigoti) e lievi nelle femmine (eterozigoti) spesso considerate completamente asintomatiche. Tuttavia, recenti studi dimostrano che la patologia nelle donne eterozigoti può essere severa come nei maschi, ma con una maggiore variabilità fenotipica (Pinto et al. 2010, [3]). I quadri clinici osservati e descritti nei pazienti con malattia di A.F sono caratteristicamente polimorfi per ragioni ancora non definite, probabilmente in rapporto alla natura ed alla sede dell'errore genetico.

È possibile che i diversi quadri fenotipici siano correlati alla più o meno carente attività enzimatica. Le numerose mutazioni geniche descritte nella malattia di Anderson-Fabry possono configurare diversi tipi di difetto enzimatico, alterando in misura variabile sintesi, stabilità ed attività catalitica dell' α -galattosidasi A.

Diversi studi hanno dimostrato che la terapia enzimatica sostitutiva, oggi disponibile, porta numerosi benefici ai pazienti trattati, i quali, oltre a condurre una vita migliore, hanno una riduzione di molti disturbi associati alla malattia; per beneficiare appieno della terapia sarebbe utile che i pazienti la iniziassero ancor prima della comparsa della sintomatologia.

2. LE MALATTIE LISOSOMIALI

Le malattie da accumulo lisosomiale (Lysosomal Storage Disease, LSDs) sono un gruppo di più di 50 disordini metabolici ereditari, dovuti all'assenza o alla ridotta attività di una specifica idrolasi lisosomiale o altre proteine rilevanti per il normale funzionamento del sistema endosomiale/lisosomiale. Dal punto di vista genetico, tutte le LSDs conosciute sono state caratterizzate; tuttavia, i meccanismi biochimici per i quali una mutazione causa una deficienza sono stati spiegati solo parzialmente.

I decorsi delle malattie lisosomiali possono essere altamente variabili perfino tra fratelli affetti nella stessa famiglia e, nella maggior parte dei casi, non è stata stabilita la netta correlazione genotipo-fenotipo. Secondo l'iniziale ipotesi patogenica postulata, i disordini sono causati da singole deficienze enzimatiche, le quali comportano l'accumulo prevalente del substrato enzimatico. Di conseguenza il substrato non degradato si accumula nel sistema endosomiale/lisosomiale causando l'espansione dei compartimenti cellulari, il collasso delle normali funzioni e la morte cellulare.

Questo effetto è stato indicato come "ipotesi citotossica" (Desnick et al., 1976) [2]. Ritenere che una singola alterazione proteica possa indurre tanti fenotipi clinici differenti è riduttivo. In accordo con questo punto di vista, i lisosomi non possono essere indicati semplicemente come "organelli finali" ma piuttosto come dei coordinatori metabolici centrali, fondamentali per le normali funzioni cellulari (Walkley 2007) [4, 5].

Ormai è noto che le LSDs non sono unicamente conseguenza dell'accumulo, ma, piuttosto che siano il risultato di alterazioni dei complessi meccanismi di segnalazione cellulare.

L'accumulo lisosomiale inoltre, potrebbe avere effetti differenti in base al tipo di cellula in cui si deposita e inoltre l'attivazione di specifici fattori di trascrizione potrebbe far parte della risposta fisiologica cellulare allo stress lisosomiale.

Le LSDs sono malattie genetiche, ereditate per lo più in forma autosomica recessiva, raramente legate al sesso. Tra queste ricordiamo ad esempio, la Gaucher, la Mocolipidosi II, la Niemann-Pick, la Galattosialidosi e molte altre. Fanno eccezione la Mucopolisaccaridosi II, a trasmissione X-linked recessiva, e la malattia di Fabry, trasmessa come carattere "a penetranza incompleta" legato al cromosoma X (Pinto et al. 2010) [3, 6].

In generale l'incidenza delle malattie lisosomiali è bassa, 1/7000-8000 bambini nati vivi, sebbene l'incidenza per alcune singole patologie, come la malattia di Gaucher o la Sialidosi sia rispettivamente di 1/57.000 e di 1/4.2 milioni nati vivi.

Queste cifre sono soggette a variazioni tra popolazioni diverse.

La maggior parte di queste malattie è caratterizzata da un decorso progressivo, con grave morbilità e aumentata mortalità. Attualmente, solo alcune enzimopatie sono curabili e i trattamenti si limitano, in genere, alla cura dei sintomi piuttosto che delle cause. Spesso viene usato il trapianto di midollo osseo per il trattamento di alcune malattie lisosomiali poiché le cellule ematiche normali trapiantate sono in grado di produrre gli enzimi carenti.

I trials con trapianto di midollo, tuttavia, hanno dimostrato un elevato tasso di mortalità.

3. LA MALATTIA DI FABRY

3.1 NATURA DELLA MALATTIA

La malattia di Fabry è una patologia geneticamente determinata che comporta la mancanza/carenza di un enzima chiamato α -galattosidasi A. Tale enzima, all'interno dei lisosomi, distacca il galattosio legato in α da sfingolipidi complessi (Fig 2), garantendo il riutilizzo dei prodotti di scarto.

Gli sfingolipidi sono distribuiti in tutti i tessuti in quanto parte integrante delle membrane plasmatiche e componenti abbondantemente rappresentati nelle membrane del reticolo endoplasmatico e dell'apparato del Golgi. Sono trasportati dal plasma legati alle lipoproteine a bassa densità (LDL).

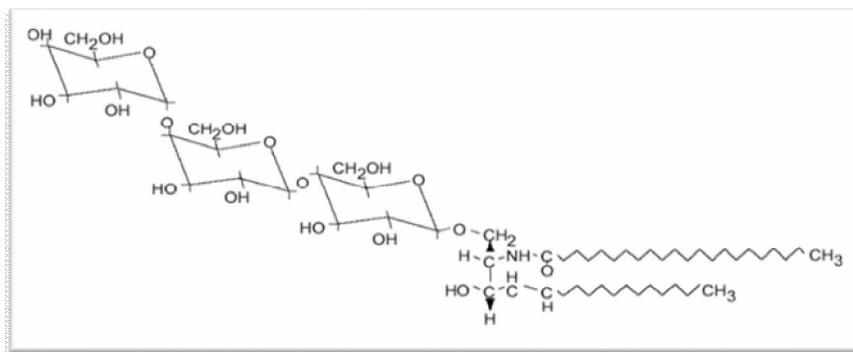


Fig 2: Globotriaosilceramide (Gb3): il più importante sfingolipide che si accumula nella malattia di Fabry.

L'enzima α -galattosidasi A subisce diverse modificazioni prima di entrare a far parte del pool enzimatico dei lisosomi e di essere secreto all'esterno della cellula.

L'mRNA dell'enzima è tradotto nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e una volta ottenuta la proteina matura, questa è complessata con un carboidrato: il mannosio.

Le vescicole contenenti l'enzima si distaccano, per gemmazione, dal RER e si fondono con il reticolo del cis-Golgi.

Il passaggio attraverso il complesso del Golgi porta alla fosforilazione dei residui di mannosio e una volta giunto nel trans-Golgi, al suo legame con i recettori.

La membrana interna delle cisterne del trans Golgi contiene infatti, i recettori per l'enzima e la proteina ha modo di legarsi saldamente.

Tali porzioni di membrana si distaccheranno successivamente dal Golgi, sotto forma di vescicole destinate a diventare lisosomi.

Non appena il pH all'interno di queste vescicole si abbassa, in conseguenza dell'attività di pompe protoniche H⁺-ATPasiche, i recettori perderanno affinità per gli enzimi rilasciandoli nel lume interno delle vescicole. Tali vescicole si trasformano così in lisosomi pienamente attivi pronti a svolgere il loro ruolo (Fig 3).

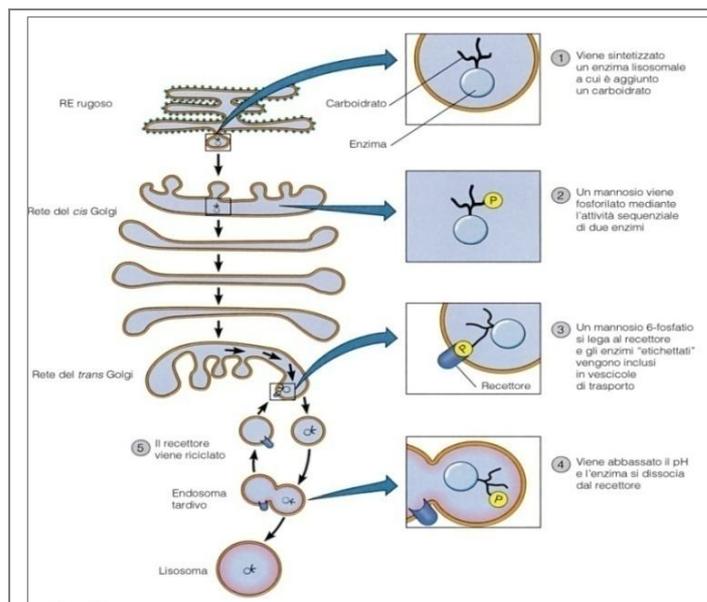


Fig 3: Processo di internalizzazione di enzimi lisosomiali.

Da quanto detto si evince che l' α -galattosidasi A è un enzima ubiquitario che possiamo ritrovare sia nel plasma che all'interno dei lisosomi di qualsiasi tipo di cellula. L'attività difettiva dell'enzima porta dunque all'accumulo nei lisosomi di diversi prodotti, fra cui il principale globotriosilceramide (Gb3) e, in minor misura, il galabiosil-ceramide (Ga). L'accumulo del Gb3, come degli altri sfingolipidi, all'interno delle cellule ne compromette gravemente le normali funzioni cellulari e attiva complessi meccanismi di segnalazione cellulare, finanche la morte cellulare programmata (apoptosi), (Bellettato et al. 2010) [6].

3.2 GENETICA DELLA MALATTIA DI FABRY

Sebbene il carattere ereditario della malattia fosse stato ipotizzato in precedenza [7], soltanto nel 1965, mediante analisi degli alberi genealogici delle famiglie affette, fu documentata la trasmissione ereditaria della malattia di Fabry come carattere X-linked [8], (fig. 4).

Gli studi relativi all'individuazione del locus del gene responsabile ebbero inizio nel 1970, quando Kint individuò nell'enzima α -galattosidasi A l'enzima carente nella malattia di Fabry [9].

Nella seconda metà degli anni '80 il gene dell' α -galattosidasi A (GLA) è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (regione q 21,22) e ne è stata descritta l'intera sequenza nucleotidica [10, 11]

Il gene, della dimensione di circa 12kb, contiene sette esoni (dimensioni variabili tra 92 e 291bp), codificanti un polipeptide maturo di 429 aminoacidi [12].

Gli introni e la regione 3', che presentano estesi tratti di DNA altamente ripetitivo (famiglia Alu), costituiscono circa il 30% dell'intera sequenza [13].

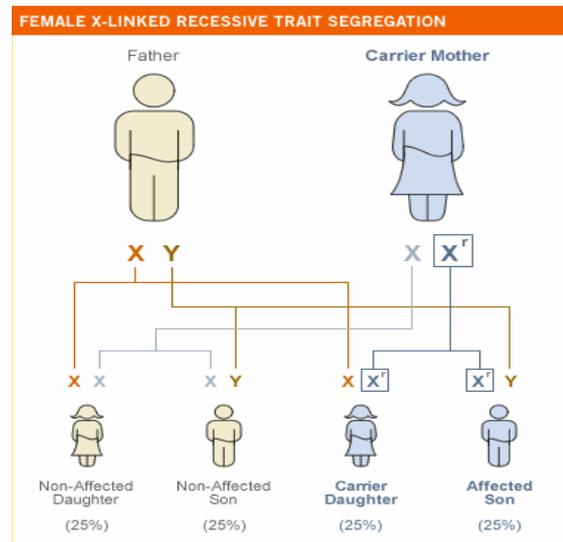


Fig. 4: La malattia di Anderson-Fabry si manifesta come carattere legato al cromosoma X.

Più di 500 mutazioni sono state descritte nel gene GLA dei pazienti Fabry. Circa il 75% delle alterazioni geniche determinanti la malattia di Fabry è costituito da mutazioni puntiformi "nonsense" o "missense", inoltre, sono descritti anche ampi riarrangiamenti, piccole inserzioni o delezioni, difetti dello "splicing", "stop codon", doppie mutazioni e polimorfismi associati alla malattia [13, 14].

Le varianti "atipiche" del fenotipo emizigote, oligosintomatiche, sono in prevalenza associate a mutazioni puntiformi "missense" che esprimono un'attività residua dell' α -galattosidasi A [13].

Il tentativo di prevedere il decorso clinico della malattia corrispondente ad una determinata mutazione genica è, allo stato attuale, estremamente difficoltoso.

La maggior parte delle mutazioni descritte nella malattia di Fabry sono confinate a singoli ceppi familiari ed è impossibile in questi casi lo

studio dell'espressione fenotipica della medesima mutazione in pazienti non imparentati, di differente etnia e provenienza geografica.

Un altro ostacolo alla definizione di correlazioni genotipo/fenotipo è rappresentato dalla continua descrizione di nuove mutazioni del gene GLA.

Un recentissimo studio condotto su 36 famiglie non imparentate ha descritto ventidue nuove mutazioni in altrettanti ceppi familiari (10 "missense", 3 "nonsense", 3 difetti di "splicing" e 6 piccole inserzioni o delezioni); nelle restanti 14 famiglie è stata rilevata una mutazione già identificata in precedenza [15].

Mutazioni puntiformi ma anche grosse delezioni sono state individuate a livello della regione intronica. Queste, se coincidono con i siti di splicing, possono determinare un difetto nel processamento del preRNA e di conseguenza la formazione di un mRNA anomalo.

Anche la sede delle singole alterazioni geniche ed il tipo di sostituzione aminoacidica determinata, non costituiscono, al momento, criteri orientativi per la prognosi; sono descritte, infatti, mutazioni puntiformi "missense" adiacenti, sulla medesima sequenza codificante ma corrispondenti a quadri clinici estremamente diversi [13].

Recentemente è stato rilevato il ruolo fondamentale della regione carbossi (C)-terminale dell' α -galattosidasi A nella regolazione della attività enzimatica [16].

Mutazioni che determinano una singola sostituzione aminoacidica in questa regione sono descritte in varianti "atipiche" cardiache [17] della malattia di Fabry, mentre l'interruzione della sequenza aminoacidica nella regione C-terminale, conseguente a "stop-codon", è associata invece ad espressione clinica severa anche negli eterozigoti [16].

Studi recenti hanno dimostrato, inoltre, che la riduzione dell'attività enzimatica può essere determinata da mutazioni che non incidono direttamente sull'attività enzimatica ma sono coinvolte nel mantenimento della stabilità strutturale dell'enzima [18]. Queste proteine, non correttamente processate, sono trattenute nel reticolo endoplasmatico e soggette a degradazione con risultante deficit della concentrazione della proteina.

Importante può essere l'identificazione della varietà di mutazioni determinanti un errato folding della proteina, per mettere in evidenza che, la scorretta struttura può essere patogeneticamente significativa nei quadri clinici della malattia.

3.3 L'ENZIMA α -GALATTOSIDASI A

Cominciamo a questo punto a conoscere meglio l' α -galattosidasi A, la sua struttura tridimensionale e i punti caldi che condizionano la sua attività.

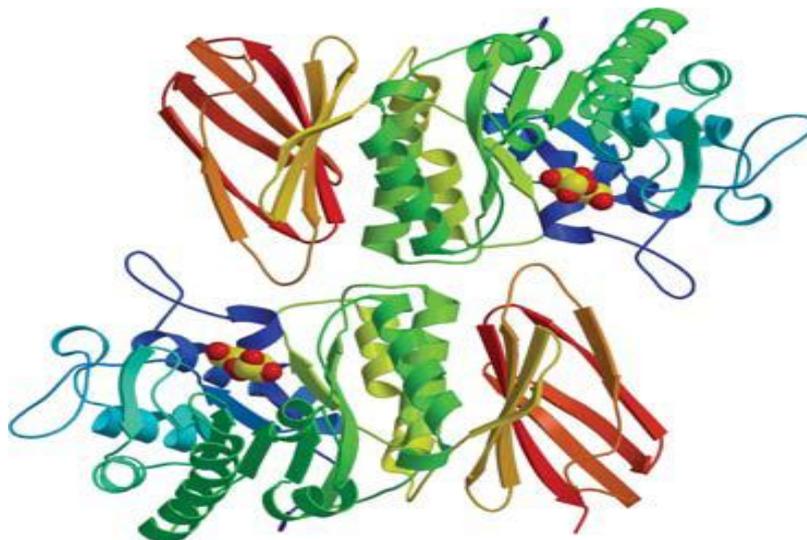


Fig. 5: struttura a nastro (ribbon) dell' α -Gal A

La figura 5 mostra l'omodimero con i suoi due siti attivi, dove le due molecole di galattosio sono rappresentate secondo il modello sferico di Corey–Pauling–Koltun (CPK).

Tale rappresentazione a nastro (ribbon) presenta colori differenti, che variano dal blu al rosso a partire dall'estremità amminoterminale fino alla carbossiterminale della catena polipeptidica.

Ciascun monomero, contiene due domini: α (β/α)₈ a forma di botte (barrel) che includono il sito attivo e mostrati in figura con i colori che vanno dal blu al giallo, mentre il dominio antiparallelo β , nella regione carbossi terminale, ha una colorazione che va dal giallo al rosso.

Osserviamo adesso, in una rappresentazione a barre, l'analisi delle mutazioni riscontrate in pazienti affetti dalla malattia di Fabry e la regione dove cadono queste mutazioni nell'omodimero.

Sostanzialmente distinguiamo: mutazioni che ricadono in porzioni sepolte (buried) all'interno dell'omodimero, mutazioni che cadono in zone semi accessibili e infine mutazioni esposte, definite come effetto "other", con comportamenti variabili.

La figura 6 riporta la struttura enzimatica con colori differenti e chiarisce meglio il concetto

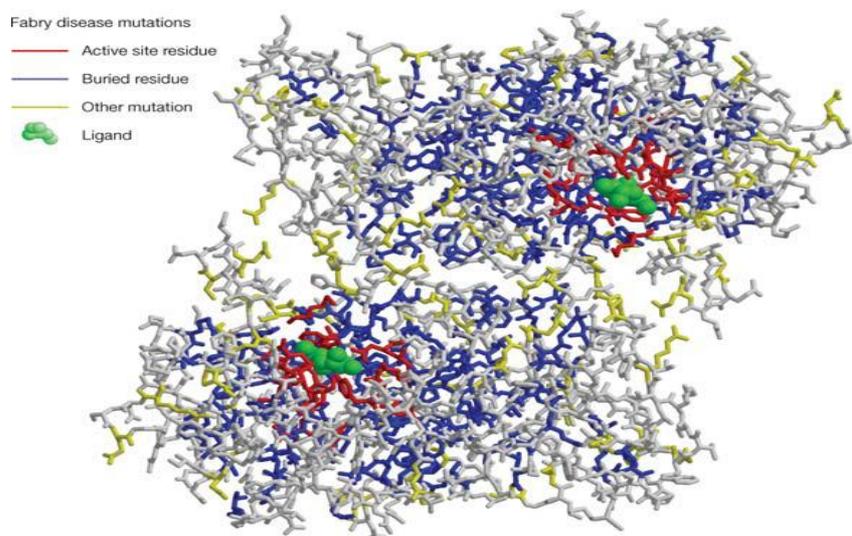


Fig. 6: rappresentazione a bacchette (sticks) della struttura dell' α -Gal A.

In verde sono indicati i ligandi. Le mutazioni che ricadono nel sito attivo sono colorate in rosso, mentre in azzurro sono indicate quelle mutazioni che ricadono in siti inaccessibili e che influenzano poco o nulla il sito attivo. In giallo sono indicate le mutazioni appartenenti alla categoria "other". Le mutazioni ricadono più frequentemente all'interno della zona idrofobica dell'enzima, dimostrando che l'alterazione enzimatica è spesso un'alterazione del folding piuttosto che del sito attivo.

3.4 QUADRI CLINICI DI PRESENTAZIONE

L'esordio clinico della malattia di Fabry avviene usualmente in età pediatrica, ma è possibile rilevare la comparsa dei sintomi fino alla seconda o terza decade di vita [13].

Segni e sintomi della malattia di Fabry rappresentano le sequele anatomiche e fisiologiche del patologico accumulo di trossido galattosil-glucosil-ceramide (Gb3) all'interno dei lisosomi di cellule appartenenti a diversi organi ed apparati.

Altri fattori devono essere considerati, per comprendere la complessità dell'espressione fenotipica della malattia di Fabry (i fenotipi discordanti tra membri della stessa famiglia e l'estrema variabilità sintomatologica nelle femmine eterozigoti) e i meccanismi patofisiologici coinvolti. Alcuni degli elementi importanti da valutare sono:

- 1) La natura della mutazione e la correlazione con l'attività enzimatica.

2) Il gruppo sanguigno del paziente (soggetti con gruppo sanguigno B o AB sono affetti dalla malattia in modo più severo, probabilmente perché, oltre al Gb3 accumulano altri due glicosfingolipidi).

3) I meccanismi di inattivazione asimmetrica del cromosoma X nelle femmine eterozigoti per la malattia di Fabry.

4) I meccanismi di cross-correzione e cross-induzione (ancora in larga parte sconosciuti).

Quest'ultimo meccanismo, di cross-correzione, è definito anche "cooperazione metabolica" in quanto gli enzimi lisosomiali entrano ed escono liberamente dai lisosomi e sono trasferiti da una cellula all'altra per mezzo dell'endocitosi mediata dai recettori del mannosio 6-fosfato. Nella malattia di Fabry la quantità dell'enzima attivo potrebbe essere insufficiente, o l'enzima secreto potrebbe non essere adeguatamente ricaptato dalle cellule, rendendo impossibile la cross-correzione tra le cellule.

Tale conclusione è suggerita dal fatto che l'attività dell'enzima nel plasma o nei leucociti può non rispecchiare la situazione all'interno dei lisosomi di alcuni tipi di cellule implicate maggiormente nella malattia di Fabry. Si ritiene che un pattern di ricaptazione differente, dovuto al recettore del mannosio 6-fosfato e alla localizzazione dei siti di legame nell'enzima, possa essere responsabile della bassa efficienza di ricaptazione, riducendo ampiamente la capacità di cross-correzione nella malattia di Fabry [3, 19, 20].

Un'altra ipotesi, riguardante i possibili meccanismi coinvolti nell'espressione della malattia di Fabry, è il nuovo concetto di "cross-induzione": nelle femmine eterozigoti per la malattia di Fabry sono stati trovati alti livelli di globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) nel plasma e questo è direttamente correlato alla severità del quadro clinico. Se ciò fosse

vero, quando il lyso-Gb3 è ampiamente diffuso nel plasma, ha la capacità di inibire l'attività della α -Gal prodotta dalle cellule con il cromosoma X attivo non mutato, causando la sintomatologia clinica in molte femmine eterozigoti [21].

L'espressione fenotipica della malattia, geneticamente legata al cromosoma X, è più completa e severa nei soggetti maschi, emizigoti, che presentano una penetranza della malattia del 100% e un indice di severità pari all'84% [22].

La realizzazione che le femmine eterozigoti per mutazioni nell' α -Gal possano manifestare la malattia di Fabry è relativamente recente. Prima dell'avvento della terapia enzimatica sostitutiva, la letteratura medica era limitata dal preconcetto di semplice "carrier", implicito nella definizione di condizione X-linked recessiva [22, 23].

I sintomi specifici della malattia erano riportati come eccezione. Oggi, invece, i testi medici evidenziano che le donne possono essere largamente sintomatiche [23]. Deegan et al. [24] hanno mostrato che il 70% delle femmine eterozigoti può mostrare segni e sintomi della malattia e che può essere severa come nei pazienti emizigoti [25, 26, 27]; comunque nelle donne è più comune una lenta progressione e un'alta variabilità fenotipica. [28, 29].

Passiamo adesso a descrivere quali sono le manifestazioni cliniche della malattia di Fabry nelle diverse fasi della vita.

Nell'infanzia, La neuropatia dolorosa, che si manifesta tipicamente con crisi parossistiche (movimenti involontari anormali) di dolore urente alle palme delle mani ed alle piante dei piedi, rappresenta in genere la manifestazione di esordio della malattia in età pediatrica; tuttavia, nel 10-20% dei casi questo sintomo viene negato dai portatori di malattia di Fabry

negando una storia di crisi dolorose o acroparestesie nell'età infantile (formicolio, bruciore, intorpidimento a carico delle estremità) [13].

Il dolore neuropatico può mimare talvolta una colica renale o un'appendicite [30].

Le crisi dolorose sono scatenate in genere da esercizio intenso, variazioni repentine della temperatura ambientale o stress emotivi, durano da pochi minuti ad alcuni giorni e tendono a ridursi per intensità e frequenza con l'avanzare dell'età [13].

La sintomatologia dolorosa, frequentemente associata a febbricola ed aumento della VES, può condurre alla diagnosi errata di malattie infiammatorie come la febbre reumatica [31].

Nei periodi intercritici alcuni pazienti lamentano parestesie urenti alle estremità degli arti, talvolta quotidiane, usualmente nel tardo pomeriggio [13].

La comparsa di teleangectasie (capillari dilatati) retro auricolari può rappresentare il primo segno dell'interessamento dei vasi cutanei [32]; successivamente, un attento esame della cute può rilevare macule o papule angiomatose di colorito rosso porpora o bluastro, spesso isolate, in regione periombelicale o a livello dello scroto [13].

L'intolleranza al caldo conseguente ad ipoidrosi, evidenziabile mediante test con acetilcolina, è un'altra precoce, anche se aspecifica, manifestazione clinica di malattia.

Nell'adolescenza il quadro clinico è dominato dall'interessamento cutaneo, caratterizzato da diffusione delle teleangectasie e soprattutto dall'evidenza degli angiocheratomi, grappoli di lesioni maculo-papulari di color rosso porpora o bluastro che assumono gradualmente una caratteristica distribuzione a "costume da bagno" (coinvolgimento simmetrico della cute di tronco, perineo, pene, scroto).

Data la frequente aspecificità delle manifestazioni cliniche in età pediatrica, il rilievo obiettivo degli angiocheratomi conduce in genere alla diagnosi di malattia di Fabry nell'adolescenza, sebbene siano state descritte varianti atipiche della malattia senza interessamento cutaneo [17, 33, 34].

Il riscontro occasionale di proteinuria isolata, senza alterazione del sedimento urinario, può rappresentare in questa fascia d'età un segno precoce del danno renale, al pari della compromissione della capacità di concentrazione delle urine [14, 35, 36].

La progressione dell'interessamento ghiandolare può determinare anidrosi, che si manifesta clinicamente con collassi da calore [32].

La valutazione oftalmoscopica con lampada a fessura evidenzia le opacità corneali da accumulo, che configurano gradualmente il quadro di "cornea verticillata", patognomica alterazione distrofica corneale presente nel 100% dei maschi affetti da malattia di Fabry e nella maggior parte delle femmine, anche se eterozigoti [37].

Nell'età adulta il quadro clinico è dominato dal graduale deterioramento della funzione renale, fino all'uremia cronica terminale, che nella maggioranza dei casi, si manifesta entro i 40 anni d'età [13].

La progressione del danno cardiaco può manifestarsi nel giovane adulto con: malattia coronarica precoce, ipertrofia ventricolare sinistra "non ostruttiva", valvulopatie (il prolasso della mitrale è l'alterazione più frequente), aritmie [38, 39]

Le manifestazioni neurologiche, risultanti dalla compromissione multifocale del microcircolo cerebrale, possono includere attacchi ischemici transitori (TIA), convulsioni, parkinsonismi, ictus ischemico o emorragico.

La malattia di Fabry dovrebbe pertanto essere considerata nella diagnosi differenziale delle forme di demenza vascolare nel maschio adulto di età inferiore ai 65 anni [40].

Le complicanze di natura cardiovascolare o cerebrovascolare sono la principale causa di morte, che sopravviene in genere in quarta o quinta decade di vita [41].

3.4.1 VARIANTI ATIPICHE DELLO STATO EMIZIGOTE

Sono riportate in letteratura varianti atipiche, mono-oligosintomatiche, della malattia di Fabry allo stato emizigote, con manifestazioni cliniche limitate al cuore e/o ai reni ed attività residua dell' α -galattosidasi A talvolta comparabile con quella descritta nelle donne eterozigoti [42].

L'ipertrofia ventricolare sinistra è stata descritta come unica manifestazione clinica in una variante cardiaca della malattia di Fabry, in assenza di valvulopatie e di ipertensione arteriosa [33, 34].

La variante cardiaca esordisce clinicamente in età media ed è associata ad un'attività residua dell' α -galattosidasi A superiore al 15% [43].

Studi condotti su casistiche non selezionate di maschi adulti con ipertrofia ventricolare sinistra riportano un'incidenza di casi di malattia di Fabry misconosciuta pari al 3%; la percentuale sale al 9% se si considerano i pazienti con cardiomiopatia ipertrofica "non ostruttiva", apparentemente inspiegabile [34, 44].

Il riscontro occasionale di proteinuria glomerulare isolata, con funzione renale conservata, può rappresentare l'unica manifestazione clinica di malattia di Fabry nel giovane adulto [30, 45].

Queste osservazioni supportano l'esistenza di varianti cliniche definite come "atipiche" e confermano l'ipotesi di una sottostima della reale presenza della malattia di Fabry, dovuta alla difficile diagnosi delle varianti oligosintomatiche.

3.4.2 MANIFESTAZIONI CLINICHE NELL'ETEROZIGOTE

Le femmine eterozigoti per la malattia di Fabry hanno un indice di penetranza della patologia alto, pari al 70%, ma un indice di severità basso (4%) [23]. La patologia nelle femmine ha una maggiore variabilità fenotipica rispetto ai maschi ed è stato suggerito che gli studi sull'inattivazione del cromosoma X (processo di Lyonizzazione) potrebbero aiutare a prevedere e capire il perché di tale variabilità. Per alcuni autori, l'inattivazione asimmetrica del cromosoma X gioca un ruolo fondamentale nell'espressione del fenotipo nelle femmine eterozigoti. Dobrovolny et al. [46] hanno dimostrato che le donne con un'inattivazione asimmetrica del cromosoma X presentano una rapida progressione della malattia.

Secondo Chabas et al.[47], il fenotipo e la severità della malattia non sono correlati all'inattivazione preferenziale del cromosoma X e lo studio di quest'ultima nei leucociti non può far presagire la prognosi e definire le opzioni terapeutiche. Questi stessi autori affermano invece, che la progressione della malattia è correlata ai meccanismi di "cross-correzione", i quali avrebbero un'efficienza decrescente nel corso degli anni. E questo spiegherebbe perché le donne Fabry divengono più sintomatiche nel tempo.

L'aspettativa di vita nelle femmine eterozigoti è ridotta di 20 anni [23, 48].

La cornea verticillata, è il segno più frequente, descritto nel 70% delle femmine eterozigoti; lesioni cutanee isolate sono presenti nel 30% delle pazienti, ed il 10% circa lamenta acroparestesie [49].

Il dolore neuropatico è severo, invalidante e comune nelle donne Fabry.

Le complicazioni cerebrovascolari come stroke e attacchi ischemici transitori sono stati documentati nel 5-27% dei casi [50, 51, 52], e sono più frequenti nelle donne che negli uomini con malattia di Fabry (27% comparato col 12%) [52].

Nelle femmine eterozigoti sono descritti proteinuria e riduzione delle funzioni renali, mentre è poco frequente la progressione verso gli stadi finali del danno renale.

I sintomi cardiaci includono ipertrofia settale, cardiomiopatia, insufficienza della valvola mitrale e aritmie.[50, 53].

I sintomi gastrointestinali, simili a quelli del colon irritabile, sono descritti nel 50-60% della femmine Fabry.

La tabella 1 riassume i quadri clinici di presentazione della malattia.

PRINCIPALI MANIFESTAZIONI DELLA MALATTIA DI ANDERSON-FABRY

Manifestazioni dermatologiche

- Angiocheratomi (lesioni vascolari cutanee)

Manifestazioni oculistiche

- Cataratta posteriore
- Cornea verticillata (lesioni distrofiche corneali)
- Vasi retinici a "cavaturaccioli"

Manifestazioni neurologiche

- Crisi dolorose parossistiche
- Acroparestesie (sensazione urente continua alle estremità)
- Interessamento del sistema nervoso autonomo
 - a. Ipoidrosi
 - b. Dismotilità intestinale
 - c. Alterata vasomotilità
- Accidenti cerebrovascolari
- Modificazioni della personalità

Manifestazioni cardiache

- Ipertensione arteriosa
- Malattia coronarica precoce
- Lesioni valvolari (prolasso della mitrale)
- Anomalie elettrocardiografiche (accorciamento dell'intervallo PR)
- Aritmie e turbe della conduzioni atrio-ventricolare
 - a. Fibrillazione atriale parossistica in età giovanile
 - b. Sindrome di Wolff-Parkinson-White
 - c. Fenomeno di Luciani-Wenckebach

Manifestazioni nefrologiche

- Alterazioni urinarie
 - a. Proteinuria, ematuria, cilindruria
 - b. Lipiduria (corpi ovali lipidici, birifrangenza a croce di Malta)
 - Disfunzione tubulare
 - a. Aminoaciduria, glicosuria, acidosi tubulare renale
 - b. Deficit di concentrazione delle urine con poliuria e polidipsia
 - Uremia terminale come complicazione comune nei maschi emizigoti in 3^a-4^a decade
-

Tab. 1: manifestazioni cliniche nella malattia di Fabry

3.5 TERAPIA

Poiché la malattia di Fabry è causata da una singola deficienza enzimatica, la somministrazione esogena di tale enzima rappresenta lo strumento ideale per curare questa condizione.

Prima dell'avvento dell'enzima si eseguiva una terapia analgesica per il controllo della sintomatologia dolorosa o un trattamento a lungo termine con ticlopidina e vitamina E al fine di prevenire possibili complicanze tromboemboliche, dato che questi pazienti presentano una incrementata aggregabilità piastrinica ed una elevata concentrazione plasmatica di β -tromboglobulina.

A partire dagli anni '70 si è cominciato a pensare ad una terapia enzimatica sostitutiva: all'epoca il limite maggiore era costituito dalla scarsa quantità di enzima disponibile [54].

Uno dei primi Trial clinici è stato effettuato su due fratelli affetti da malattia di Fabry e ciò consentì di stabilire che l'enzima esogeno risultava ben tollerato e non determinava reazioni di tipo allergico [55].

Lo sviluppo della terapia enzimatica sostitutiva consente ai soggetti affetti di condurre una vita migliore, soprattutto se il trattamento è iniziato in epoca precoce, in modo da ridurre il rischio di sviluppare gravi problemi di salute [56].

4. OBIETTIVO DELLO STUDIO

La mia attività di ricerca durante il periodo di dottorato ha riguardato la diagnosi laboratoristica della malattia di Fabry, ovvero, l'individuazione e l'ottimizzazione dei metodi più efficienti per la valutazione dell'attività dell'enzima α -galattosidasi A e per l'analisi del gene GLA in soggetti con sospetto clinico della patologia.

La diagnosi di malattia di Fabry è una pratica complessa, che prevede la valutazione incrociata e imprescindibile di tre parametri, ossia: la manifestazione clinica dei sintomi della patologia, il valore di attività enzimatica basso o nullo e, la presenza di mutazioni nelle regioni esoniche o nei siti di splicing (zone introniche) del gene GLA.

Riconoscere le manifestazioni precoci nella pratica clinica può essere difficile a causa di molteplici fattori. La presentazione della malattia è generalmente eterogenea, i sintomi possono assomigliare a malattie più comuni e le principali disfunzioni, renale o cardiaca, sono rare nei pazienti pediatrici.

Ad oggi, i ritardi di diagnosi possono essere ancora notevoli e spesso i pazienti devono essere visitati da diversi medici specialisti prima di avere la corretta diagnosi.

Dati recenti hanno dimostrato che il ritardo diagnostico complessivo è di circa 15 anni per entrambi i sessi [57]. Se l'esame clinico solleva il sospetto di malattia di Fabry, è necessaria la conferma biochimica e genetica [58].

La dimostrazione di un'attività carente dell' α -galattosidasi A nel plasma o nei leucociti è il metodo di laboratorio di riferimento, di norma utilizzato per confermare la diagnosi clinica nei maschi in modo conclusivo

[59]. Il dosaggio plasmatico può occasionalmente portare a false diagnosi e deve essere confermato dal test sui leucociti [60]. Al contrario, nelle femmine eterozigoti, l'attività della α -galattosidasi può essere nel range di normalità [61, 62] e quindi, la conferma diagnostica definitiva deve essere effettuata mediante l'analisi genetica [63].

Lo screening di individui con una storia familiare di malattia di Fabry o programmi di screening neonatale sono gli unici modi concreti per identificare i pazienti prima della comparsa dei sintomi. Inoltre, l'individuazione dei pazienti ad alto rischio, cioè con sintomi a insorgenza tardiva, che non sono stati diagnosticati, può essere fondamentale per l'ottimizzazione della gestione della malattia in questi pazienti.

Ogni screening richiede un metodo affidabile e preferibilmente rapido e poco costoso. È stata proposta la misura del Gb3 urinario [64], ma la sua affidabilità come biomarker di malattia di Fabry, in particolare nelle femmine, non è provata [65, 66].

Lo screening dei gruppi a rischio è spesso condotto misurando l'attività dell' α -galattosidasi A plasmatica, ma i medici dovrebbero essere consapevoli che questo potrebbe non riuscire a rilevare tutti i casi di malattia di Fabry [67]. L'identificazione dell'attività enzimatica carente in spot di sangue essiccato (Dried Blood Spot), è un metodo di screening più affidabile; questo approccio è stato convalidato nei maschi [61, 62, 68, 69, 70] ma non rileva circa un terzo delle femmine eterozigoti [61, 62, 71, 72].

Durante il mio lavoro presso i laboratori dell'IBIM-CNR di Palermo, ho messo a punto e ottimizzato la metodica per l'analisi enzimatica della α -galattosidasi A (la forma umana).

In letteratura ho trovato sostanzialmente tre metodi di analisi; il primo, su plasma, è il più diffuso ed è eseguito da quasi tutti i centri che si occupano del dosaggio dell'enzima. Il secondo, quello sui linfociti, isolati

mediante l'uso di mezzi di purificazione come il Ficole o il Lymphoprep, necessita di una procedura costosa e tediosa. L'ultimo, il Dried Blood Filter Paper Test (DBFPT), è utilizzato prevalentemente come test di screening [73, 74, 75, 76].

Ho notato che tutti i lavori presenti in letteratura evidenziavano valori di riferimento totalmente diversi nella misura dell'attività enzimatica e addirittura molti non davano un "valore" ma la percentuale di attività rispetto ad un soggetto sicuramente sano. Dunque, ciascun laboratorio aveva il "suo valore normale". Inoltre, l'uso del valore percentuale rispetto ad un soggetto "sano" sottendeva un'assoluta mancanza di standardizzazione e una variabilità nei valori assoluti di attività enzimatica che dipendeva, di volta in volta, da "quella procedura sperimentale". Nessuno parlava mai di attività specifica e della possibilità di ottimizzare il sistema.

Il metodo più attendibile per misurare l'attività enzimatica sembrava quello di purificare i globuli bianchi e misurare l'attività enzimatica rapportandola con il dosaggio delle proteine totali. Tale metodica, come detto, è però costosa e lunga, richiede una grossa quantità di sangue (10 ml) e una variabile in più, quale è la determinazione delle proteine totali leucocitarie.

L'analisi su plasma è apparentemente la più facile, ma richiede particolare attenzione nei tempi di esecuzione (l'attività decade in poche ore), nella preparazione dei campioni, nell'uso di un tampone ad elevata forza ionica e nella presenza di fattori plasmatici che possono disturbare la determinazione.

Per questo motivo tale determinazione è solamente indicativa.

Il metodo delle DBFP mi è sembrato subito un ottimo sistema da poter adottare nelle mie determinazioni per i seguenti motivi: l'enzima

essiccato su carta assorbente è molto stabile, così che i dischetti di carta imbibiti di sangue (più semplicemente indicati come "spot") possono essere conservate per più di 20 giorni a temperatura ambiente senza perdere attività o congelati per periodi più lunghi, per ripetere l'analisi successivamente o conservare testimonianza dei test processati. Il sistema può essere automatizzato e adattato all'analisi diretta su piastra multiwell.

Una volta testata la stabilità dell'enzima sulle spot e la variabilità analitica intra- e inter-saggio, restava il grosso problema della standardizzazione della metodica, al fine di poterla adoperare, non solo come una metodica di screening, ma come metodica analitica di riferimento.

La standardizzazione è stata possibile grazie all'ausilio della normalizzazione per globuli bianchi, che mi ha anche permesso di poter misurare l'attività specifica. Tale procedura è stata estesa anche alla determinazione dell'attività enzimatica specifica su leucociti, minimizzando la quantità di sangue adoperato (350 µl) ed ottenendo così un doppio riferimento DBFP(sangue intero)/leucociti con un'identica metodica.

Ciò mi ha permesso di osservare con precisione alterazioni nella fisiologia dell'attività enzimatica, alterazioni che non avrei notato se non avessi potuto paragonare attività enzimatiche specifiche.

Lo studio genetico è estremamente importante per la diagnosi della malattia di Fabry, soprattutto nelle donne, per le quali, a volte, l'indagine enzimatica non è indicativa.

L'analisi genetica consiste nella ricerca e caratterizzazione di eventuali mutazioni presenti nella sequenza del gene GLA. Il metodo d'elezione è il sequenziamento, anche se presenta parecchi limiti. È infatti, una tecnica costosa e lunga e non può essere utilizzata come indagine di routine su un elevato numero di pazienti. Non può essere applicata su sequenze lunghe, per cui l'analisi è spesso limitata alle regioni esoniche e

introniche fiancheggianti. Inoltre, le grosse delezioni geniche non possono essere rilevate con il sequenziamento; per questo è raccomandato l'uso della metodica Multiplex ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) nei casi in cui l'attività enzimatica ridotta non è associato con l'identificazione di una mutazione puntiforme patogena [77]. Un metodo considerato utile per lo screening è la Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC), basata sull'analisi dei profili di denaturazione degli eterduplex, i quali risultano anomali nel caso di mutazioni nella sequenza del frammento amplificato.

In laboratorio ho messo a punto uno screening genetico combinando il metodo di PCR in tempo reale (Real-Time PCR) con lo studio dei profili di denaturazione (curve di melting) dei frammenti di DNA amplificati (ovvero con il principio della DHPLC). Ciò mi è stato possibile grazie all'utilizzo di uno specifico termociclatore in Real-Time (Light Cycler 480-Roche) che dispone di un software (High Resolution Melting) in grado di elaborare le temperature di melting dei frammenti amplificati, identificando mutazioni ignote presenti nelle zone del gene studiate. Gli ampliconi con curve di melting anomale, rispetto ai controlli wilde type, sono stati sequenziati per caratterizzare la mutazione.

5. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su campioni di sangue in EDTA che arrivavano al nostro laboratorio da diverse strutture ospedaliere entro 24 ore dal prelievo, a freddo. Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso all'analisi, previa informazione riguardo alle indagini a cui sarebbero stati sottoposti e alle finalità dello studio.

I pazienti reclutati per lo studio presentavano manifestazioni cliniche correlabili alla malattia di Fabry, quali angiocheratoma, ipertrofia ventricolare sinistra, deterioramento della funzione renale e manifestazioni neurologiche come ictus e TIA.

Lo studio è stato eseguito in doppio cieco insieme all'analisi genetica, mediante l'esame della sequenza del gene GLA, tramite Real-Time PCR.

5.1 ANALISI ENZIMATICA

Per misurarne l'attività dell' α -galattosidasi A in vitro si utilizza un substrato sintetico, il 4-Methylumbelliferil-Galactopiranoside, che una volta idrolizzato dall'enzima, libera un composto fluorescente, 4-methylumbelliferone, la cui presenza è rilevabile attraverso lettura spettrofluorimetrica (fig. 7).

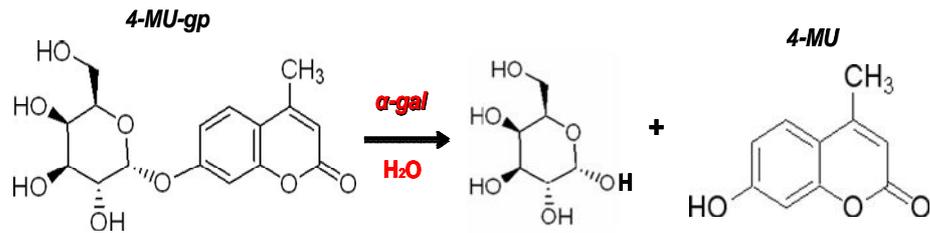


Fig 7: L' α -galattosidasi catalizza la liberazione della molecola fluorescente 4-metil-umbelliferone.

5.1.1 MATERIALI

Phosphate-Citrate Buffer ph 5 TabletsP4809-50 TAB – Sigma.

Ethylenediamina 99% 03550 – Fluka.

4-methylumbelliferyl- α -galactopyranoside M7633 – Sigma.

4-Methylumbelliferone sodium salt M1508 – Sigma.

N-Acetyl-D-galactosamine A2795-1G – Sigma.

Deoxygalactonojirimycin hydrochloride D9641 – Sigma.

H2O grado milliQ.

Piastre 96 well, nere, per fluorimetria Perkin Elmer.

Spettrofluorimetro automatico Wallac Perkin Elmer.

Spettrofotometro DU 50 Beckmann.

Pipetta a pressione positiva 10 μ l Drummonds.

Pipette Gilson (10-20-100-200-1000) μ L.

5.1.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

DRIED BLOOD FILTER PAPER

Il termine "Dried Blood Filter Paper" deriva dall'impiego di dischetti di carta assorbente; nel nostro caso viene utilizzata della carta Whatman 113, da 90 mm di diametro, forata manualmente (con un foro documenti singolo) in numerosi dischetti da 6 mm di diametro, sui quali vengono caricati 5.5 μ l di sangue periferico con la pipetta a pressione positiva Drummond. La quantità di sangue deposta è in grado di imbibire tutto il dischetto, senza però saturarlo.

I dischetti sono inseriti all'interno di una piastra nera da 96 pozzetti, non adesiva (Multiwell Perkin-Elmer) e lasciati ad asciugare "overnight". La conservazione dei campioni avviene a -20°C, previa etichettatura. In questo modo è possibile ripetere più volte il saggio enzimatico per uno stesso soggetto.

PLASMA

Il plasma è preparato utilizzando un'aliquota di 500 μ l di sangue intero, centrifugata a 4000 rpm per 10 minuti; successivamente si aspira il plasma, evitando di raccogliere l'interfaccia, poiché in questa regione sono presenti i globuli bianchi che contengono l'enzima. Il plasma ottenuto è utilizzato direttamente, in aliquote da 10 μ l per l'esecuzione del saggio con metodica cinetica.

LINFOCITI

La tecnica più comune per separare i linfociti è quella di stratificare il sangue intero su un composto che aggrega gli eritrociti, aumentandone il valore di sedimentazione, centrifugare e raccogliere i linfociti che si stratificano al di sotto dell'interfaccia con il plasma.

Ho isolato i linfociti con l'ausilio del Lymphoprep TM (Axis-Shield); la loro sedimentazione dei linfociti avviene nella parte intermedia del tubo dove formano un anello bianco.

Data la quantità modesta di sangue dei campioni pervenuti abbiamo adoperato una procedura diversa rispetto a quella classica. Per ottenere l'isolamento dei linfociti abbiamo utilizzato dei vecchi tubi da ematocrito (tubi wintrobe da 1 ml), in modo tale da avere un anello di linfociti facilmente distinguibile pur utilizzando una modesta quantità di sangue intero (350 μ l contro i 10 ml della metodica classica).

Il campione di sangue intero (350 μ l) è stato diluito con 350 μ l di NaCl 0,9%. Nel tubo di ematocrito si inseriscono 300 μ l di Lymphoprep TM con l'ausilio di una pasteur. L'aliquota di sangue diluito (700 μ l) viene stratificato sul Lymphoprep TM all'interno del tubo da ematocrito.

Per ottenere la banda di cellule mononucleate, il tubo da ematocrito viene centrifugato a 800 x g per 20 minuti a 18°C.

L'anello di linfociti ottenuto viene aspirato con una pasteur ed inserito all'interno di un eppendorf da 1.5 ml.

La fase successiva è quella di lavaggio che viene effettuata con PBS 1X, centrifugando a 4000 rpm per 6 minuti.

A questo punto al fondo dell'eppendorf sarà presente il pellet di linfociti, si decanta per allontanare la soluzione presente (PBS) e si conserva a -20 °C.

Per utilizzare il campione di linfociti purificato per l'analisi enzimatica è necessario rompere i linfociti.

Al pellet proveniente da 350 μ l di sangue intero si aggiungono 350 μ l di H₂O milliQ ripristinando così il volume di partenza; si esegue il freeze thawing per 3 volte e si sonica per 4 minuti.

Aliquote da 5.5 μ l del campione venivano utilizzate per il saggio, condotto come per le spot, adoperando la metodica cinetica.

La quantità di campione utilizzata viene posta direttamente all'interno dei pozzetti.

LEUCOCITI

La separazione dei leucociti si effettua per emolisi dei globuli rossi. In un eppendorf si aliquotano 350 μ l di sangue intero, aggiungendo un volume di una soluzione di lisi contenente nitrato d'ammonio e PBS (Red Blood Cell Lysis Buffer, Roche). Si effettua una prima centrifugazione a 2500rpm per 5 minuti, decantando con decisione. Al pellet si aggiungono altri 350 μ l di soluzione di lisi, si risospende e si effettua un'altra centrifugazione per 3 minuti a 2500rpm. A questo punto sarà possibile notare sul fondo un pellet bianco, identificabile con i leucociti. Si elimina il sovrinatante che presenta ancora qualche traccia di emoglobina e il pellet è conservato a -20° per l'indagine enzimatica.

5.1.3 REAGENTI

Etilendiammina 0,1 M

Diluire 6,01 ml di etilendiammina 99% (frigo 4°) in un litro d'acqua per avere una soluzione 0,1 M portare, se necessario, a pH 11,4 (aggiungendo NaOH 1N).

Tampone citrato 0.5M

Prendere una pillola di tampone citrato e sciogliere in 33 ml di acqua distillata in un falcon da 50 ml. La soluzione così ottenuta è a pH di

circa 5. Portare a pH 4.4 con HCl 2 M circa 250 μ l (poche gocce) controllando il pH con le cartine tornasole.

N-acetil D-galattosammina 0,25 M (inibitore) A2795

Pesare 55 mg di N-acetil D-galattosammina (nel frigo -20 °C) e portarlo ad 1 ml con la il tampone citrato.

4 MU- α -D-galattopiranoside 5mM (substrato) M7633

Pesare 5 mg di 4 MU- α -D-galattopiranoside (nel frigo -20° cassetto Fabry) e portarli a 3 ml la con il tampone citrato in un tubo . Dopo aver agitato al vortex filtrare la soluzione con un filtro per siringa. (0,45 μ m Whattman).

INIBITORE α -GAL A DGJ (Deoxygalactonojirimycin-hydrochloride)- SIGMA D9641-2mg

Sciogliere la bottiglietta in 1 ml di H₂O mQ; aliquotare a 100 μ l in eppendorf da 50 μ l e conservare a -20°C. Utilizzare l'inibitore diluendolo 1:3 con tampone CPB e dispensare, poi, 3 μ l di inibitore per campione file 9 e 10.

5.1.4 PROTOCOLLO DI REAZIONE

DRIED BLOOD FILTER PAPER TEST SU PIASTRA

Il saggio per la valutazione dell'attività enzimatica su spot di sangue viene eseguito utilizzando delle piastre nere da 96 pozzetti, specifiche per fluorimetria, per evitare il propagarsi della luce di emissione e caratterizzate dalla non adesività al sangue.

In ogni fila della piastra si inseriscono 10 spot di sangue per campione; per ogni dischetto si dispensano 70 μ l della miscela di reazione composta da 20 μ l di soluzione contenente N-acetil D-galattosammina 0,25

M in tampone citrato 0,15 M pH 4.4 e 50 μ l della soluzione contenente il substrato 4-Methylumbelliferyl- α -D-galattopiranoside 5mM in tampone citrato 0,15 M pH4.4.

L'N-acetil D-galattosammina è l'inibitore dell'isoforma B dell' α -galattosidasi, che ha la stessa capacità dell' α -galattosidasi A di processare il substrato sintetico 4-Methylumbelliferil-Galactopiranoside liberando il 4-Methylumbelliferone.

L'inibizione dell'isoforma B dell'enzima α -galattosidasi (che interferirebbe nella reazione) è di fondamentale importanza per un'accurata analisi dell'attività enzimatica dell'isoforma A.

Per ogni soggetto si realizzano tre reazioni con tempi diversi di incubazione: ad una, due e tre ore, al termine di ciascuna delle quali l'attività enzimatica viene bloccata con 250 μ l del tampone basico Ethylendiamine 0,1 M a pH 11.4 .

Il saggio è sempre condotto in doppio e per ciascun soggetto si preparano:

un bianco costituito dal dischetto di sangue, dai 70 μ l della miscela di reazione e dai 250 μ l Ethylendiamina, ovvero, tutti i componenti della reazione che possono dare una fluorescenza aspecifica, non derivante dall'attività della α -Gal A, il cui valore di emissione verrà poi sottratto alla fluorescenza delle reazioni enzimatiche.

L'inibito, nel quale oltre alla mix di reazione si aggiunge il DGJ (Deoxygalctonojirimycin hydrochloride), l'inibitore specifico della α -Gal A, in modo da essere sicuri che il prodotto liberato sia effettivamente dovuto all'attività dell'enzima α -galattosidasi A. L'inibitore della forma α è adoperato come sistema di controllo della specificità della reazione enzimatica intrasaggio sul substrato sintetico 4-Methylumbelliferil-Galactopiranoside. Se tutto è andato a buon fine, dopo un ora di

incubazione a 37°C i risultati ottenuti dalla lettura allo spettrofluorimetro sono sovrapponibili a quelli del bianco.

Inoltre, per ogni saggio viene condotta in parallelo l'analisi su due soggetti controllo, ovvero, un individuo affetto da malattia di Fabry ed uno sano.

DRIED BLOOD FILTER PAPER TEST IN FASE LIQUIDA

La metodica in fase liquida si basa sullo stesso principio del DBFPT su piastra e utilizza gli stessi reagenti. La differenza è dovuta esclusivamente allo sviluppo delle tre reazioni valutate a intervalli di un'ora.

Nel DBFPT su piastra, le tre reazioni (a end point) sono condotte separatamente (ciascuna in un differente pozzetto della piastra).

Nel DBFPT in fase liquida le tre reazioni sono effettuate partendo da un'unica miscela di reazione, eseguendo e quantizzando nel tempo i valori cinetici.

Si inseriscono 5 spot di sangue in un eppendorf conica da 2ml (Sigma) e si dispensati 350 µl (ovvero, 70 µl per ciascuna delle 5 spot) di miscela di reazione. Si centrifuga a 3000 rpm per 2 minuti in modo da incentivare l'inizio della reazione enzimatica.

In entrambe le metodiche si realizzano tre reazioni con tempi diversi di incubazione: ad una, due e tre ore, al termine di ciascuna delle quali l'attività enzimatica è bloccata con 250 µl del tampone basico Ethylendiamine 0,1 M a pH 11.4. Se nel metodo su piastra la reazione si bloccava inserendo nei pozzetti l'Ethylendiamine allo scadere di ogni ora, in fase liquida, allo scadere di ogni ora, si prelevano dall'eppendorf 70µl di miscela di reazione e si dispensano in un pozzetto di una piastra pulita, bloccando la reazione con 250µl di Ethylendiamine 0,1 M a pH 11.4. Si preleva una spot dall'eppendorf si centrifuga a 3000rpm per 2 minuti, e si

lascia ad incubare a 37°C per l'ora successiva. Al termine delle tre ore, la piastra contenente la miscela prelevata nel corso delle tre ore sarà letta allo spettrofluorimetro.

Anche in questo caso, il saggio si esegue pure su un controllo positivo (soggetto sano) e in presenza dell'inibitore dell'isoforma A dell'enzima, il DGJ (Deoxygalctonojirimycin hydrochloride), in modo da essere sicuri che il prodotto liberato sia effettivamente dovuto all'attività dell'enzima α -galattosidasi A.

Per la determinazione dell'attività su plasma, leucociti e linfociti, si procede con lo stesso protocollo utilizzato per il DBFP test in fase liquida, testando in fase liquida e negli appositi eppendorf, rispettivamente, 40 μ l di plasma, 22 μ l di leucociti e 22 μ l di linfociti.

5.1.5 CURVA STANDARD DI CALIBRAZIONE

La curva standard di calibrazione permette il confronto con il valore di emissione del campione, in modo da ottenere le nanomoli di prodotto liberato (4-MU), (fig.8).

Per costruire la curva abbiamo preparato dei campioni a concentrazione standard, che contengono rispettivamente 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5 nanomoli di 4-MU in 200 μ l (che è la quantità adoperata per la lettura in piastra) di tampone Etilendiamina 0.1M pH 11.4.

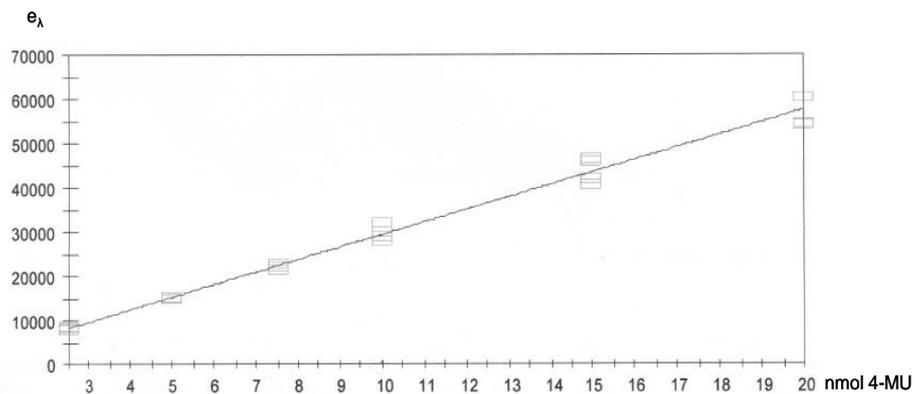


Fig 8: Grafico dell'emissione del 4-MU in funzione del numero di nmol.

La retta di regressione lineare che si ottiene ha equazione:

$$Y = 1125.7 + 2826.8x \text{ e coefficiente di Pearson } R = 0.9947;$$

dunque è statisticamente valida per essere utilizzata come curva di calibrazione.

In base al confronto con questa retta di regressione è possibile determinare il valore di attività enzimatica del campione in esame come nanomoli di prodotto liberato (4-MU) per ora di incubazione per ml di sangue (nmol/h/ml) tramite il seguente procedimento: alle letture di ogni ora di incubazione dei nostri campioni si sottrae il bianco, ottenendo i campioni corretti per bianco. Questi valori sono i ΔEx della reazione. Successivamente si calcola l'incremento medio (ΔEx medio) della fluorescenza nell'arco delle tre ore di incubazione effettuando la media dei valori di Δex .

Per il calcolo dell'attività enzimatica si procede allo stesso modo in entrambi i saggi: sostituiamo il nostro ΔEx medio all'incognita y dell'equazione della curva di calibrazione ($y = 1125.7 + 2826.8x$), ottenendo così un valore in termini di nmol/h/ml.

Nella metodica in fase liquida si analizza solo la cinetica della reazione senza l'utilizzo di un bianco di riferimento. Quindi in questo caso basta calcolare il solo ΔEx medio.

5.2 ANALISI BIOMOLECOLARE

L'analisi biomolecolare della malattia di Anderson-Fabry si prefigge di evidenziare eventuali mutazioni in soggetti la cui attività enzimatica risulti inferiore rispetto al normale.

Essa consta di una fase di estrazione del DNA genomico da sangue periferico; di un primo screening genetico volto ad individuare la presenza di eventuali mutazioni tramite Real-Time PCR-High Resolution Melting (amplificazione dei sette esoni che compongono il gene gla in Real-Time e studio dei profili delle curve di melting, utilizzando la tecnica HRM); del sequenziamento dei singoli amplificati (mediante una prima PCR selettiva e una seconda con primers marcati); e dell'analisi della sequenza.

5.2.1 ESTRAZIONE DEL DNA

Al tradizionale procedimento di estrazione del DNA con fenolo-cloroformio, lungo e laborioso, è stata preferita l'adozione del kit commerciale "GENE-ELUTE BLOOD GENOMIC DNA" (Sigma), per l'estrazione del DNA dai campioni in studio.

È un sistema a colonnine basato sul principio della cromatografia a scambio ionico. La matrice della colonnina è una resina carica positivamente che ha forte affinità per le molecole di acido desossiribonucleico (con carica complessiva negativa) presenti nella fase mobile (lisato cellulare). Una serie consecutiva di lavaggi con opportuni tamponi, e centrifugazioni, permette di eliminare gli altri componenti cellulari. Infine, si eluisce il DNA utilizzando una soluzione competitiva (ad alta concentrazione anionica) che diminuisce l'affinità tra DNA/matrice.

PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE

Il protocollo è rapido e prevede i seguenti passaggi: il primo è la lisi dei componenti corpuscolati del sangue che si ottiene aggiungendo 200 µl di "soluzione di lisi" e 20 µl di soluzione con proteinasi K a 200 µl di sangue in un eppendorf da 1.5 ml; si miscela accuratamente con un vortex per 10-15 secondi e si incuba a 55 °C per 10 minuti. Durante l'incubazione, si attiva la "colonna" (inserita nel "collection tube", fornito dal Kit) mediante una "soluzione di preparazione", si centrifuga a 12000 rpm per un minuto in una microcentrifuga, modello eppendorf. Dopo i 10 minuti di incubazione, si aggiungono 200 µl di etOH (95-100%) al lisato ottenuto; quest'ultimo si trasferisce nella "colonna" precedentemente attivata e si centrifuga per 1 minuto a 6000 rpm. Si scarta il liquido eluito e si sistema nuovamente la "colonna GFX" in un tubo nuovo.

La fase successiva è il lavaggio, effettuato con 500 µl di "prewash solution", centrifugando a 6000 rpm, e ancora, 500 µl di "wash solution" a 13000 rpm per 3 minuti, in modo da asciugare la colonnina.

A questo punto, si elimina il "collection tube", si pone la "colonna" in un eppendorf nuovo da 1.5 ml e si eluisce con 200 µl di "soluzione di eluizione". Per una maggiore efficienza, si lascia a temperatura ambiente per 5 minuti prima di effettuare la centrifugazione a 6000 rpm per 1 minuto.

Dopo avere estratto il DNA genomico è necessario controllare sia l'avvenuta estrazione che l'integrità dell'acido nucleico stesso. Tale verifica è effettuata mediante elettroforesi analitica su gel di agarosio allo 0.8%.

Il DNA potrà essere conservato per le successive applicazioni, a -20°C.

PROTOCOLLO DI ELETTROFORESI

Il gel d'agarosio è un supporto per la migrazione delle molecole cariche all'interno di un campo elettrico, generato da un alimentatore che crea una differenza di potenziale tra le due estremità del gel. Si prepara quindi, un gel d'agarosio allo 0.8%, dove la percentuale si riferisce ai grammi di agarosio da miscelare a 100 ml di soluzione tampone TBE 1X (Tris Borato EDTA, preparato con 108 g di Trizma Base, 55 g di Acido Borico, 40 ml di EDTA 0.5 M (pH 8) e H₂O fino a volume di 1 Litro), e determina la porosità del gel, che deve essere adeguata per consentire la migrazione delle grosse molecole di DNA genomico in base al peso molecolare.

Dopo aver pesato l'agarosio in una beuta e aver aggiunto il TBE, la sospensione è sciolta al microonde. Si versa nel lettino di polimerizzazione e si inserisce il pettine, necessario per la formazione dei pozzetti nel gel, nei quali verranno poi caricati i campioni da analizzare (fig. 9).

I campioni sono preparati miscelando 2.5 µl di loading buffer 4X con 7.5 µl di soluzione contenente il DNA genomico per un volume finale di 10 µl, da caricare sul gel.

Elettroforesi su gel d'agarosio

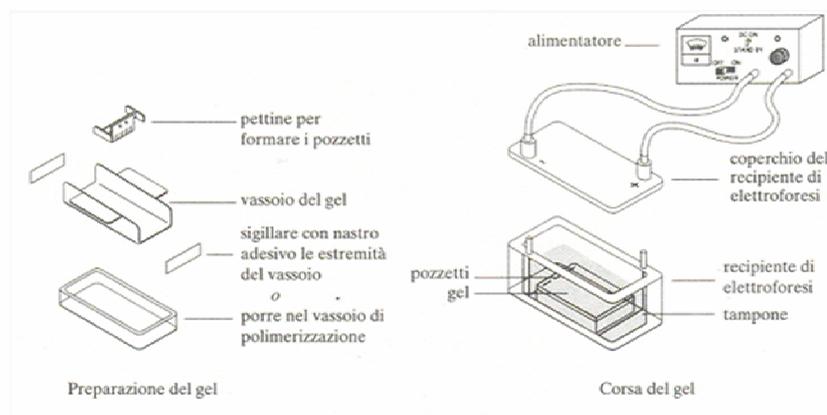


Fig 9: Apparato per elettroforesi su gel di agarosio: vassoio per il gel, pettine e vassoio per colare l'agarosio da polimerizzare, recipiente per l'elettroforesi con coperchio, alimentatore e fili di alimentazione.

Il gel solidificato è adagiato all'interno della vasca per la corsa, collegata al generatore di potenziale e contenete il buffer di scorrimento TBE 1X, ovvero, una soluzione salina che fornisce un'adeguata forza ionica e conducibilità al sistema elettroforetico.

Oltre ai campioni da analizzare, si carica su gel anche il marker di peso molecolare (miscela di frammenti di dimensioni standard), che permette di identificarne facilmente il peso molecolare dei campioni. Il marker utilizzato in questo caso è costituito da una miscela di frammenti diversi, di lunghezza compresa in un range tra 500 e 23000 bp (fago ϕ digerito con Hind III).

La corsa elettroforetica è eseguita a 50V per 1 ora. Trascorso il tempo necessario, il gel è colorato con "SYBR® Safe DNA gel stain" che emette fluorescenza se esposto a raggi ultravioletti a una λ ottimale di 300nm, permettendo così la visualizzazione al transilluminatore delle bande di DNA separate. Infine, si visualizzano le bande e si acquisisce l'immagine mediante un sistema computerizzato. L'estrazione del DNA e la sua integrità sono confermate dalla presenza delle bande dalla caratteristica altezza di circa 23 Kb, (fig. 10).

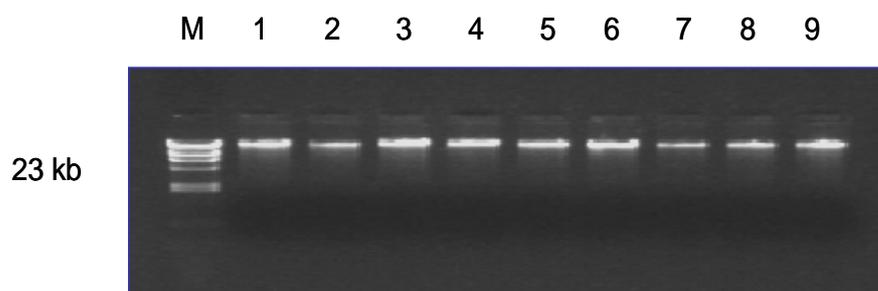


Fig 10: Immagine ottenuta al transilluminatore del gel di agarosio allo 0,8%. 1-9: Bande di DNA genomico M - Marker di peso molecolare.

Grossi frammenti di DNA genomico penetrano con difficoltà attraverso le maglie del gel, ed è per tal motivo che le bande risultano essere così alte e molto vicine ai pozzetti.

5.2.2 REAL-TIME PCR IN “HIGH RESOLUTION MELTING”

Lo screening genetico individua la presenza di eventuali mutazioni nelle regioni del gene GLA amplificate, tramite Real-Time PCR in “High Resolution Melting”. Il sistema utilizzato, il “Light Cycler®480” della Roche (fig. 11), si serve del programma “Gene scanning”, che individua la presenza di variazioni di sequenza all’interno degli ampliconi del gene GLA.

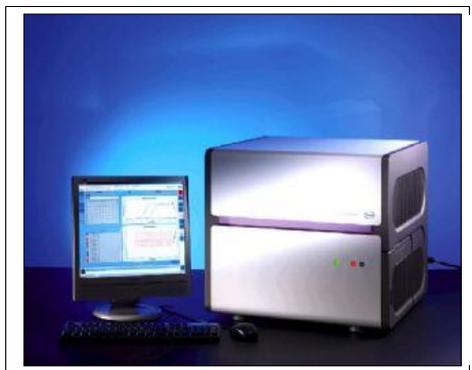


Fig 11: Immagine Light Cycler 480-Roche

IL software è in grado di individuare le mutazioni genetiche, calcolando la temperatura di dissociazione (T_m) dei filamenti a doppia elica amplificati e confrontando le curve di melting risultanti. L’amplificazione dei sette esoni in Real Time PCR e la dissociazione dei due filamenti di DNA sono eseguite in presenza di un marcatore fluorescente (Light Cycler® 480 High Resolution Melting Dye) che si lega ad ogni solco minore del DNA a doppia elica ed è saturante. Il fluoroforo, che sfrutta la chimica del SYBR

Green, non interagisce mai col DNA a singolo filamento, ma emette fluorescenza solo in presenza di DNA a doppio filamento (fig.12). Questo cambiamento della fluorescenza liberata permette di monitorare in tempo reale l'incremento della concentrazione del DNA durante la PCR (sintesi), e di rilevare direttamente la dissociazione termicamente indotta del DNA durante l'High Resolution Melting.

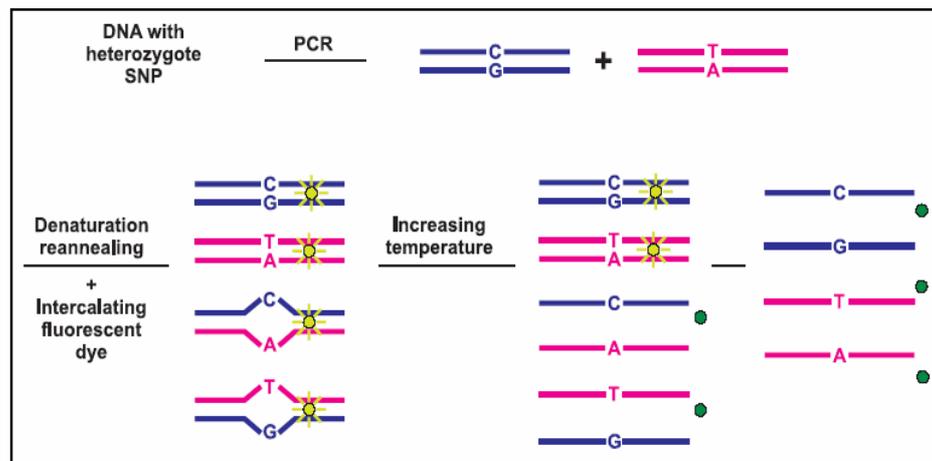


Fig 12: Biochimica del SYBR Green

La Real Time PCR è un tipo di PCR quantitativa che utilizza termociclatori con individuazione della fluorescenza per amplificare specifiche sequenze di acidi nucleici e contemporaneamente misurare la loro concentrazione; poi, qualsiasi PCR classica, necessita di: una Taq polimerasi, che è un enzima termostabile, dotato di elevata processività e fedeltà di incorporazione, capace di sintetizzare il filamento di DNA complementare allo stampo; i nucleotidi da aggiungere alla catena in crescita, sotto forma di deossinucleotidi trifosfato; una coppia di primers, ovvero brevi sequenze di DNA che fungono da inneschi per la DNA polimerasi, complementari alle regioni 5' e 3' del frammento da amplificare; il DNA stampo e opportuni cofattori quali lo ione magnesio. Il processo

complessivo si articola nell'alternanza di tre cicli: denaturazione delle doppie eliche, appaiamento dei primers alle sequenze complementari su entrambi i filamenti, sintesi della catena mediante incorporazione dei nucleotidi. Le temperature di denaturazione e di sintesi sono standard, mentre la temperatura di appaiamento si sceglie in base alla T_m dei primers utilizzati, che dipende a sua volta, dalla lunghezza e dal tipo di sequenza (contenuto in AT e GC) di questi ultimi.

Al termine dell'amplificazione dei sette esoni del gene GLA in Real Time PCR, si calcola la temperatura di la separazione dei due filamenti. All'inizio del calcolo, la fluorescenza emessa è massima perché tutti i frammenti sono ancora a doppia elica e quindi il fluoroforo è legato ai solchi minori del DNA. Non appena, la temperatura aumenta, i frammenti si dissociano e la fluorescenza diminuisce.

Ogni profilo di melting è caratteristico di un dato campione di DNA. Il software individua le curve di melting anomale confrontando queste ultime con le curve di campioni controllo. L'analisi, infatti, è eseguita utilizzando per ciascun esone, due controlli wild type, un controllo mutato maschio e un controllo mutato femmina, in quanto, essendo il primo emizigote e il secondo eterozigote per la mutazione, presentano un andamento diverso delle curve di melting.

PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE

Utilizzando il software Light Cycler® Probe Design Software 2.0, ho disegnato sette coppie di primers, in modo tale che ciascuna permettesse l'amplificazione dell'esone e delle regioni introniche fiancheggianti (tab. 2). Lo studio delle regioni introniche è importante poiché in esse sono presenti

siti di splicing e sequenze regolatrici, che se mutati, possono alterare o anche impedire l'espressione del gene.

Esoni	Primers	Dimensione Amplicone	Dimensione Esoni
Esoni 1	5'-TCTTACGTGACTGATTATTGGTCT-3' 5'-CACACCCAAACACATGGAAA-3'	416 bp	254 bp
Esoni 2	5'-TGAAATCCCAAGGTGCCTAATA-3' 5'-GTACAGAAGTGCTTACAGTCC-3'	314 bp	174 bp
Esoni 3	5'-CTTTCTGCTACCTCACGAT-3' 5'-CTCAGCTACCATGGCCT-3'	302 bp	178 bp
Esoni 4	5'-ACAGACTGAACCCCATCTC-3' 5'-GAGACCTTGGTTTCCTTGT-3'	208 bp	91 bp
Esoni 5	5'-AGGATGTTAGTAGAAAGTAAACAGAAG-3' 5'-AATAGGAAACAAGCCTACCG-3'	263 bp	161 bp
Esoni 6	5'-GATGCTGTGGAAAGTGGTT-3' 5'-GCCCAAGACAAAGTTGGTAT-3'	355 bp	198 bp
Esoni 7	5'-TGCTAAGCAACCACACTTTC-3' 5'-TGCTGGGATTACAGGCAT-3'	421 bp	295 bp

Tab 2: sequenza primers, dimensione dei prodotti di PCR e dimensione degli esoni

Tuttavia, ho cercato di limitare le dimensioni degli ampliconi, in quanto, regioni molto estese diminuiscono l'efficienza della reazione di PCR e, soprattutto, rendono più difficoltosa l'individuazione di mutazioni all'analisi delle curve di melting. Le mutazioni puntiformi, infatti, modificano maggiormente il profilo di melting di un amplicone compreso tra 100 e 250 bp, rispetto a uno di 500 bp.

Ho effettuato una serie di esperimenti per stabilire la concentrazione giusta di primers (purificati in HPLC) da utilizzare, cioè, quella che mi desse la minima formazione di primer-dimers (dimeri di

primer che si formano per interazioni aspecifiche), e questa si è attestata a 0,2 μ M.

La temperatura di appaiamento di questi primers è stata valutata tra 60-62 °C; questa è calcolata in base al contenuto in GC, sottraendo poi, 3-5 °C alla temperatura di melting, definita come il valore della temperatura a cui si ha il 50% di transizione tra stato a doppia ed a singola elica. L'applicazione di una temperatura più elevata, aumenterebbe la specificità (stringenza) della reazione, ma ne pregiudicherebbe l'efficienza (favorendo la dissociazione dei primers dalla sequenza bersaglio), mentre, una più bassa, aumenterebbe l'efficienza della reazione, ma favorirebbe la formazione di appaiamenti di primers casuali e quindi di amplificati aspecifici (diminuzione della specificità).

Nella fase di sintesi della catena, la temperatura da adottare è quella cui corrisponde la massima attività enzimatica (con la polimerasi Taq si utilizza una temperatura di 70-72 °C). Il tempo in cui tale temperatura è applicata varia a seconda della lunghezza del frammento da amplificare (di solito, un minuto è sufficiente per sintetizzare frammenti di 2 Kb). In genere, l'ultimo step di sintesi della reazione di amplificazione dura più a lungo, al fine di poter ottenere prodotti completi. Tale passo risulta estremamente importante in situazioni in cui i prodotti di reazione debbano avere estremità ben definite, per poterli utilizzare, ad esempio, nel sequenziamento o nel clonaggio.

Altra condizione fondamentale, da cui dipende la buona riuscita dell'amplificazione, è la concentrazione dello ione Mg^{2+} , cofattore essenziale per la Taq polimerasi. Ho individuato questa concentrazione sperimentalmente per ogni esone tra 3 e 3.5 mM. La quantità di $MgCl_2$ condiziona l'andamento delle curve di melting: frammenti che a basse concentrazioni di $MgCl_2$ presentano curve con una singola inflessione, ad

alte concentrazioni, possono presentare inflessioni multiple, ovvero un calo di specificità e attendibilità di analisi.

La PCR è stata condotta in un volume finale di 20 μ l e ogni miscela di reazione contiene:

Mix 1x (Vf 20 μ l)	
Master Mix 2X*	10 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3 μ l
Primer F (2,5 μ M)	2 μ l
Primer R (2,5 μ M)	2 μ l
DNA (5-30 ng)	3 μ l

(* FastStart Taq DNA Polymerase, buffer di reazione, dNTP e HRM-Dye)

La miscela di reazione, contenente la mix, i primers specifici per i sette esoni da amplificare e il DNA genomico dei campioni in studio è dispensata in una piastra da 96 pozzetti, che è inserita all'interno del Light Cycler 480.

Il programma di amplificazione in PCR Real Time prevede un ciclo di pre-incubazione a 95°C per 10 minuti, in cui avviene l'attivazione della "FastStart Taq DNA Polymerase" e la denaturazione dello stampo di DNA. Seguono i 45 cicli di amplificazione del DNA target, ognuno dei quali prevede la denaturazione a 95°C per 10 secondi, l'appaiamento a 62°C per 15 secondi e la sintesi a 72°C per 18 secondi. Infine, l'High Resolution Melting prevede un ciclo a 95°C per 1', uno a 40° per 1' (pre-hold step), uno a 60° per 1" e uno continuo a 95°. Il pre-hold step assicura che tutti i prodotti di PCR siano riassociati, favorendo la formazione di eteroduplex (Fig.13).

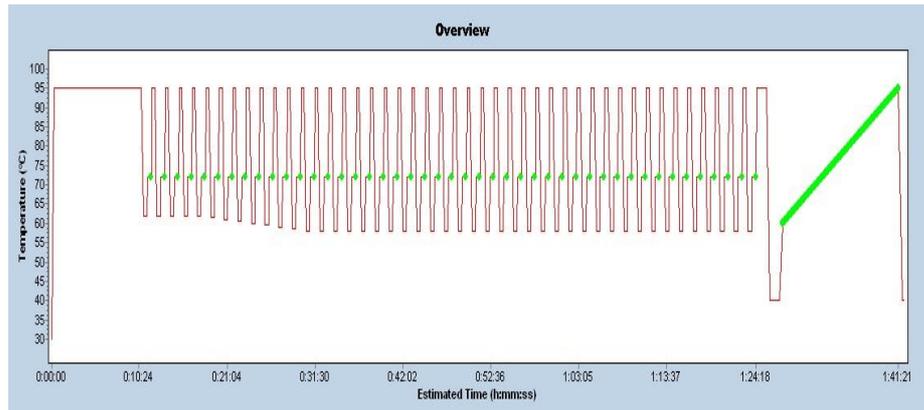


Fig. 13: Programma di amplificazione in Real-Time PCR (High Resolution Melting).

Il software Ligh Cyler 480 Gene Scanning confronta i profili di melting di ogni esone (per ciascun campione) con quelli wild type e mutati. In questo modo, è in grado di individuare variazioni di sequenza nei prodotti di PCR.

Questo programma esegue quattro passaggi di base:

4. Individuazione dei campioni negativi: individua eventuali campioni per i quali la reazione di PRC non ha avuto un'efficienza ottimale e che presentano quindi, valori bassi di fluorescenza. Tali campioni sono esclusi dalla successiva analisi di melting;

5. Normalizzazione: consiste nel fissare un valore di fluorescenza iniziale (pre-melt) e uno finale (post-melt) per le curve di melting, uguale per tutti i campioni. Il valore di pre-melt è fissato come il 100%, mentre il post-melt è fissato ad un valore pari allo 0%. In questo modo, si considera esclusivamente l'intervallo di fluorescenza relativo alla dissociazione dei due filamenti (Fig.14).

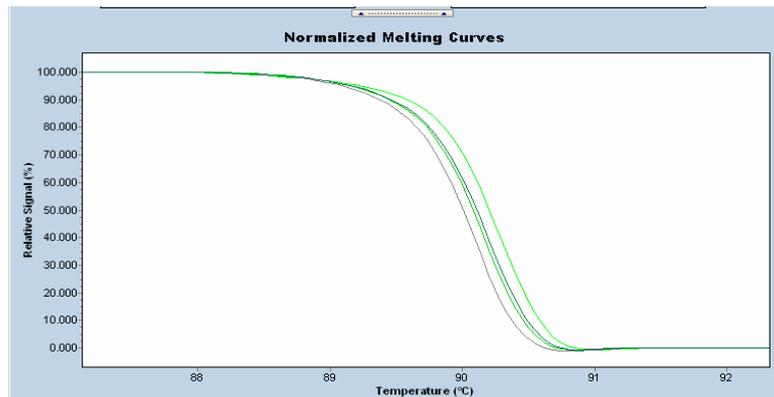


Fig 14: Curve di melting normalizzate

6. Difference plot: è un tipo di visualizzazione grafica che permette il confronto immediato, visivo, delle curve di melting dei campioni, rispetto a una curva scelta come riferimento (standard), quale ad esempio, la curva di un campione controllo (wild type o mutato), (Fig.15).

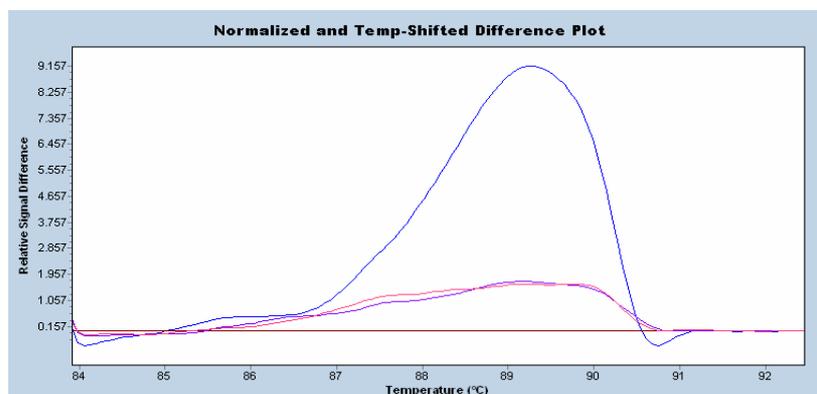


Fig 15: visualizzazione delle curve di melting rispetto alla curva WT

5.3.2 SEQUENZIAMENTO

Gli esoni rivelati mutati con l'High Resolution Melting sono sequenziati, poiché, per determinare il tipo di mutazione non si può prescindere dal sequenziamento.

Il principio di questa procedura, nota come metodo di Sanger, si basa sul fatto che la sintesi di DNA necessita di deossinucleotidi. L'aggiunta di basi al filamento che è in corso di sintesi, richiede la formazione di un legame covalente fosfodiesterico tra il fosfato al 5' del nucleotide che deve essere aggiunto e il gruppo 3'-OH della molecola che deve essere allungata.

Il substrato di questa reazione è un 5'-dNTP, vale a dire un deossiribonucleotide con tre gruppi fosfato nella posizione 5' del ribosio che, a sua volta, porta con sé un gruppo 3'-OH, in modo da permettere il legame col nucleotide successivo.

Nella tecnica di Sanger si sostituiscono i dNTP con dei dideossiribonucleotidi (ddNTP), ovvero, molecole che non possiedono il gruppo 3'-OH terminale.

La reazione di allungamento non sarà più possibile e la sintesi si fermerà all'incorporazione del ddNTP.

Il sequenziamento prevede complessivamente due amplificazioni: la prima, detta selettiva, è finalizzata a selezionare e amplificare, appunto, la sequenza genica da studiare. La seconda, è la reazione di Sanger vera e propria, cioè, un tipo di amplificazione il cui prodotto finale è la miscela di filamenti di diversa lunghezza a partire dallo stesso stampo.

Il sequenziatore, LI-COR 4300 DNA Analyzer utilizzato, analizza il DNA grazie alla rilevazione della fluorescenza emessa da due tipi di marcatori associati ai primers. Questi fluorofori emettono nell'infrarosso (IR) e sono rispettivamente, IRDye™ 700, che assorbe a 681 nm ed emette a 712 nm, e IRDye™ 800 con assorbimento a 787 nm ed emissione a 812 nm.

I due primers sono allungati dalla DNA polimerasi che aggiunge i dNTP alla catena, e sporadicamente i ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP e

ddTTP), presenti nella miscela di reazione a concentrazione più bassa rispetto ai dNTP.

Ogni volta che viene incorporato un ddNTP, si arresta l'allungamento di quello specifico filamento, cosicché, alla fine della reazione di amplificazione, si avrà una miscela di filamenti di diversa lunghezza, marcati dal primer specifico per il filamento.

Quando i frammenti di DNA migrano su gel di acrilamide, secondo il proprio peso molecolare (Fig.16), il fluoroforo legato ai primers sarà eccitato da un laser e la fluorescenza, emessa rispettivamente ad una lunghezza d'onda (λ) di 700 e di 800 nm, e sarà rivelata da un detector.

I dati sono elaborati dal software, che riproduce l'immagine di due gel di sequenza, uno per ciascun filamento (forward e revers), con lo specifico fluoroforo, dove i vari frammenti si susseguono verticalmente, apparendo come spot neri (Fig.17).

L'immagine è analizzata usando il software e-Seq.

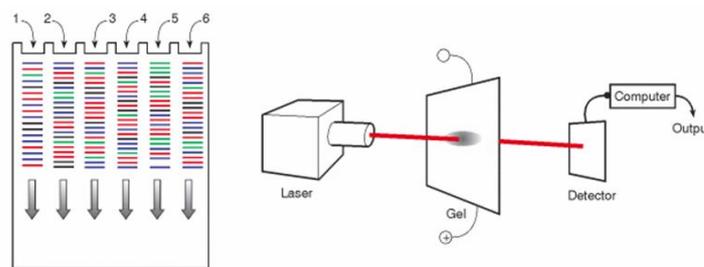


Fig 16: Gel di acrilamide in cui corre il mix di amplificazione e sua successiva analisi mediante laser ed elaborazione informatica sottoforma di elettroferogramma.

La sequenza è elaborata anche sotto forma di elettroferogramma, ovvero, picchi di luminescenza, ognuno dei quali rappresenta il dideossinucleotide che ha bloccato l'allungamento del filamento. Leggendo in ordine i picchi, o gli spot neri sul gel, dal basso verso l'alto, risulterà la sequenza del filamento amplificato (Fig.15).

(* Taq (0.05unità/ μ l); MgCl₂ (3mM); dNTP (0.4mM))

La miscela è posta all'interno del termociclatore, settato con uno specifico programma che prevede 35 cicli di amplificazione. Ogni ciclo è caratterizzato dalle seguenti fasi: denaturazione dello stampo a 95 °C per 45"; appaiamento dei primers per 30" alla temperatura di 58 °C e un'ultima fase di 30" a 72 °C per l'estensione effettuata dalla Taq polimerasi; infine, si effettua un passaggio di 10' a 72 °C per il completamento della molecola (Fig. 18).

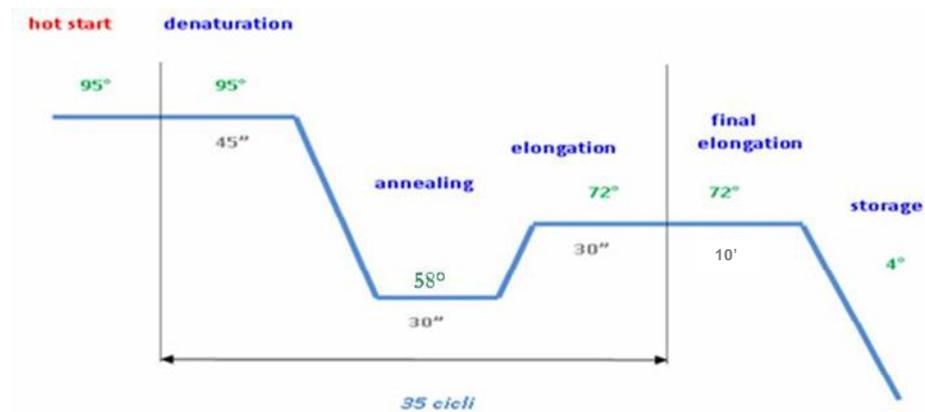


Fig 18: Rappresentazione grafica del programma adatto all'amplificazione del frammento in esame. Sono indicati gli steps di ogni ciclo con temperatura e durata.

L'intero processo di amplificazione dura circa due ore, al termine delle quali, si analizza un'aliquota di ogni campione trattato, mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2%, per verificare che l'amplificazione sia avvenuta correttamente e che l'eventuale prodotto di PCR sia quello specifico (Fig. 19).

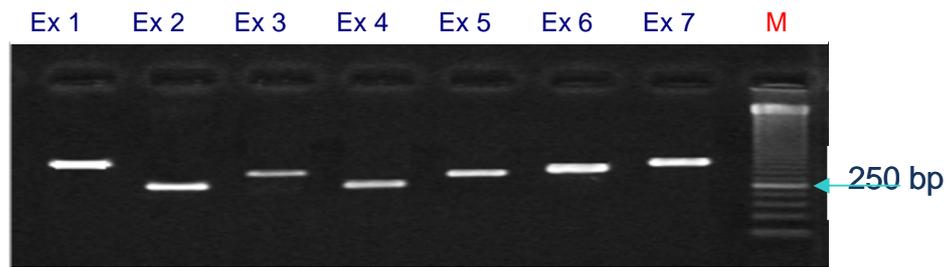


Fig 19: Immagine ottenuta al transilluminatore del gel di agarosio al 2%. Ex-esone. M- marker di peso molecolare.

SECONDA AMPLIFICAZIONE (REAZIONE DI SANGER)

La reazione di Sanger prevede, per ciascun campione (ovvero, per ciascun frammento genico di cui si desidera studiare la sequenza), la preparazione di quattro reazioni di PCR separate, ognuna delle quali contenente un differente ddNTP nella miscela. Al termine dell'amplificazione si ottengono quattro prodotti, in quattro provette diverse, contenenti i filamenti (forward e revers) terminati a livello del ddNTP presente nella miscela, e marcati con il fluoroforo del primer complementare specifico. Ad esempio, nell'eppendorf contenente il ddATP, avremo tutti filamenti che terminano con il nucleotide Adenina.

Successivamente, i prodotti della reazione di Sanger si caricano sul gel di poliacrilamide del sequenziatore, dove migrano in base al loro peso molecolare.

Ogni campione è rappresentato, sul gel, da quattro "corsie", ciascuna specifica per il tipo di nucleotide.

	Mix Primer (0,05 μ M)
Primer F (1 μ M)	1,5 μ l;
Primer R (1 μ M)	1,5 μ l;
H2O	19,5 μ l

DMSO (50%) 6,5 μ l

Miscela di reazione

Mix Primer 6,5 μ l

Terminatori (ddNTP)* 1,5 μ l

DNA 2 μ l

(* *Taq Thermo Sequenase DNA Polymerase*; ddNTP (3,1 μ M); dNTP (0,94 mM); Tris HCl (250 mM, pH 9,5); MgCl₂ (12,5 mM))

Le quattro miscele di reazione sono inserite all'interno del termociclatore settando il programma esposto nella tabella 3:

	Temperatura	Tempo	Numero Cicli
Preriscaldamento	94°C	2'	
Denaturazione	95 °C	30"	27
Appaiamento	58 °C	30"	
Estensione	70 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	10'	

Tab. 3: programma di amplificazione

Finita la seconda amplificazione, i campioni, denaturati a 72 °C per 2', sono caricati su gel di poliacrilamide, che richiede il seguente protocollo di preparazione:

Acrilamide-Bisacrilamide 6,5% 30 ml

APS 10% 240 μ l

TEMED 28 μ l

Il caricamento è effettuato secondo un determinato ordine delle basi e la corsa è programmata per 10-13 ore in modo da consentire il sequenziamento anche di esoni di maggiori dimensioni.

I dati ottenuti sono rielaborati dal software "e-Seq", che effettua la lettura della sequenza direttamente dal gel, rilevando la corsia di migrazione e l'altezza (peso molecolare) di ciascun frammento, da cui se ne deduce, rispettivamente, il tipo di nucleotide e la posizione di quest'ultimo all'interno del filamento.

Alla fine dell'elaborazione, il software fornisce tre tipi di visualizzazione della sequenza: l'elettroferogramma, l'immagine del gel (che consente all'operatore di effettuare la lettura manuale) e, la successione delle basi letta direttamente dal software.

Successivamente, con l'ausilio del software "AlignIR", è possibile studiare la sequenza ottenuta, confrontandola con la sequenza del gene wild-type, individuando con esattezza la posizione e il tipo di eventuali anomalie.

6. RISULTATI

6.1 OTTIMIZZAZIONE DEL SAGGIO DI ATTIVITA' DELL' α -GALATTOSIDASI A

Abbiamo ottimizzato il saggio riferendoci all'attività specifica dell' α -galattosidasi A calcolata mediante la normalizzazione per il numero di leucociti. Avevamo notato che il valore dell'attività enzimatica era direttamente associata al numero di globuli bianchi, infatti in precedenti esperimenti avevamo notato che pazienti con un numero di globuli bianchi elevati possedevano un'attività enzimatica alta, l'opposto avveniva per pazienti con attività bassa. In una serie di esperimenti precedentemente svolti si evidenziava infatti la relazione lineare tra globuli bianchi ed attività enzimatica.

Abbiamo contato i leucociti per microlitro di sangue intero del campione, paragonandoli con il valore medio dei leucociti di un soggetto sano (5000/ μ l). Abbiamo applicato dunque la seguente formula ricavata dalla forma esplicita della proporzione di raffronto: 5000 leucociti/leucociti del campione x attività enzimatica.

Adoperando tale metodo abbiamo notato come la forbice di variabilità che ottenevamo precedentemente si sia enormemente ristretta (fig.20).

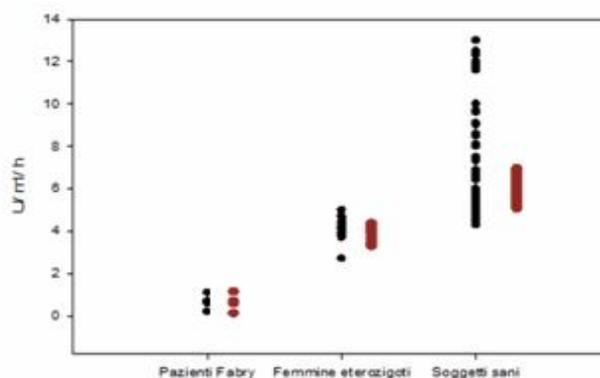


Fig.20: In Nero, i valori di attività enzimatica nei pazienti Fabry, nelle femmine eterozigoti e nei soggetti sani. In Rosso, i valori di attività enzimatica normalizzati nei pazienti Fabry, nelle femmine eterozigoti e nei soggetti sani

Un discorso a parte che voglio introdurre a questo punto è quello che adoperando tale metodo abbiamo ridotto anche la variabilità dovuta semplicemente ad altri fattori come per esempio l'alimentazione del soggetto. Quando perviene un campione presso il nostro laboratorio viene spesso detto al paziente che non c'è nessuna necessità di rimanere digiuno fino al prelievo dal momento che si esegue un test genetico. È un fenomeno noto che dopo l'assunzione di cibo si ha la cosiddetta "marea post-prandiale" che determina un aumento dei leucociti circolanti. Così abbiamo verificato se effettivamente, dopo l'assunzione di cibo, si aveva un aumento dell'attività enzimatica.

Dall'analisi eseguita su campioni di sangue di soggetti volontari, abbiamo ottenuto un aumento dell'attività enzimatica dopo 45 minuti e un 1:30 minuti dall'assunzione di 250 gr di latte intero (Fig.21). La figura è rappresentativa di un esperimento tipo.

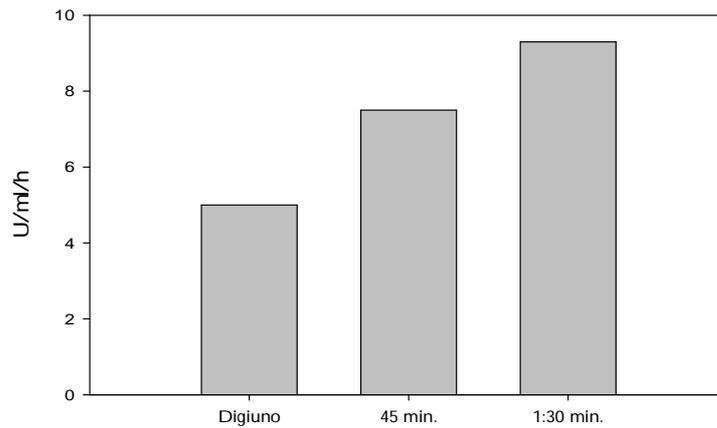


Fig. 21: Attività enzimatica assoluta

Quando il valore dell'attività enzimatica viene normalizzato per il numero dei leucociti, l'attività rimane inalterata dimostrando con ciò che quella misurata dopo la normalizzazione, risulta essere l'attività specifica di 5000 leucociti. Così l'attività enzimatica specifica era dovuta solamente allo stato "fisiologico cellulare" e non ad altre variabili come l'alimentazione e il numero di globuli bianchi (Fig. 22).

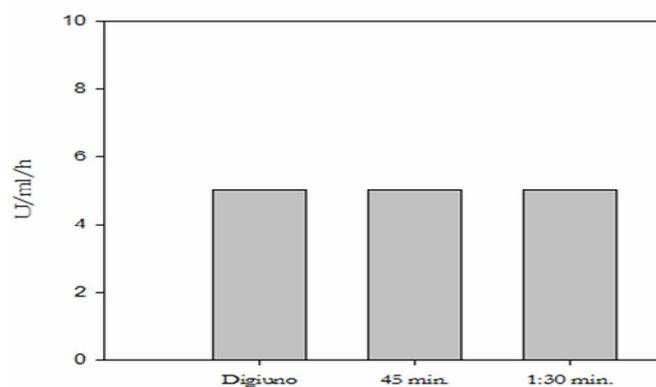


Fig. 22: Attività enzimatica specifica

Ancora abbiamo sottoposto a normalizzazione i campioni maschili e femminili da noi analizzati; la figura 23 mostra la media e la mediana nei soggetti maschili e femminili. Osservando tale grafico ci siamo accorti che la

media e la mediana differivano di poco, suggerendo che il metodo adottato per la determinazione dell'attività specifica era quello giusto. Inoltre osservando tale grafico abbiamo confermato alcuni dati presenti in letteratura che danno un valore più alto nella popolazione femminile.

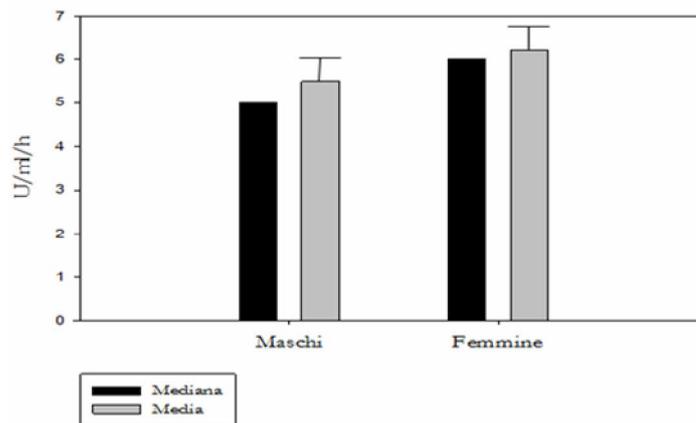


Fig. 23: Valori di media e mediana in soggetti maschi e femmine

6.2 DRIED BLOOD FILTER PAPER TEST

È importante sottolineare a questo punto la differente tipologia di analisi dell'attività dell'enzima α -galattosidasi A alla base delle due metodiche DBFPT su piastra e in fase liquida. In primo luogo, con il metodo su piastra il saggio è effettuato in doppio e per ogni campione si prepara un bianco, costituito dal dischetto di sangue, dai 70 μ l della miscela di reazione e dai 250 μ l Ethylendiamina, ovvero, tutti i componenti della reazione che possono dare una fluorescenza aspecifica (non derivante, cioè, dall'attività della α -Gal A) e il cui valore di emissione verrà poi sottratto alla fluorescenza delle reazioni enzimatiche e, l'inibito, ovvero, oltre alla mix di reazione si aggiunge il DGJ (Deoxygalctonojirimycin hydrochloride), l'inibitore specifico della α -Gal A, in modo da essere sicuri che il prodotto liberato sia effettivamente dovuto all'attività dell'enzima α -galattosidasi A.

Se tutto è andato a buon fine, dopo un'ora di incubazione a 37°C i risultati ottenuti dalla lettura allo spettrofluorimetro sono sovrapponibili a quelli del bianco. (Fig. 24)

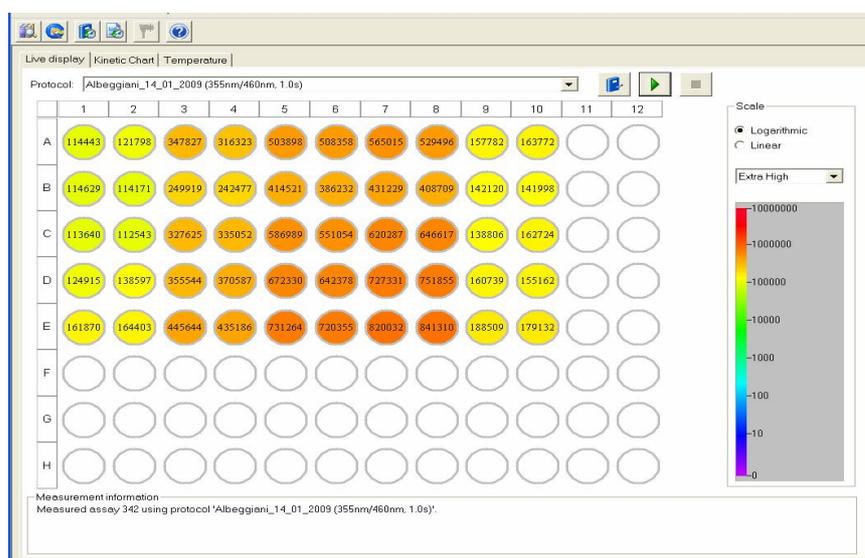


Fig.24: Lettura spettrofluorimetrica del saggio DBFP su piastra. I campioni sono tutti in doppio: le colonne 1 e 2 rappresentano i bianchi, le colonne 9 e 10 i campioni dove era presente il DGJ incubati per un'ora che dimostrano la specificità della reazione. Le colonne 3 e 4 rappresentano la prima ora di incubazione, la 5 e la 6 la seconda, la 7 e la 8 la terza.

La reazione in fase liquida, non prevede la preparazione di un bianco, si realizzano direttamente le reazioni nelle tre ore di incubazione dell'enzima.

L'importante differenza riguarda quindi il tipo di studio della cinetica di reazione. Il DBFPT su piastra calcola l'attività enzimatica utilizzando una lettura "end point", ciò significa che si fa partire la reazione da un punto (bianco) e dopo un tempo determinato, l'end-point, viene bloccata la reazione ed eseguita la lettura. Invece, nella metodica in fase liquida si utilizza una reazione di cinetica "classica". In questo tipo di reazione, ad intervalli regolari (ogni ora), si preleva una quantità discreta

della miscela di reazione insieme all'enzima passato in soluzione dalle spot, si blocca la reazione con Ethylendiamina e successivamente si rileva la fluorescenza emessa dal prodotto di reazione. L'eliminazione di una spot ogni volta che si preleva una certa quantità di soluzione ci garantisce di operare sempre con la concentrazione costante di enzima adeguato. La reazione è svolta come se conducessimo il saggio in quintuplo visto l'utilizzo di 5 spot in un unico sistema. Ciò riduce la variabilità della cinetica dipendente da una serie di fattori che condizionavano i singoli steps in end-point della metodica classica, dove l'osservazione dell'andamento cinetico veniva utilizzato per il controllo dell'affidabilità della reazione.

Abbiamo paragonato i valori ottenuti con il metodo su piastra e i valori ottenuti con il saggio in fase liquida in modo da valutare un eventuale variazione nell'analisi quantitativa dell'attività enzimatica. Sono stati presi in esame 18 campioni pervenuti in laboratorio e sono stati condotti due esperimenti in parallelo.

Il grafico in Fig 25 mostra la cinetica di reazione ottenuta sui 18 campioni. È possibile notare come (ad eccezione del campione 6 definito con cinetica zero) nelle tre ore di incubazione la cinetica cresca con un andamento tipico delle reazioni end-point.

Il valore bianco e l'inibito sono perfettamente alla stessa altezza e ciò dimostra la specificità della reazione.

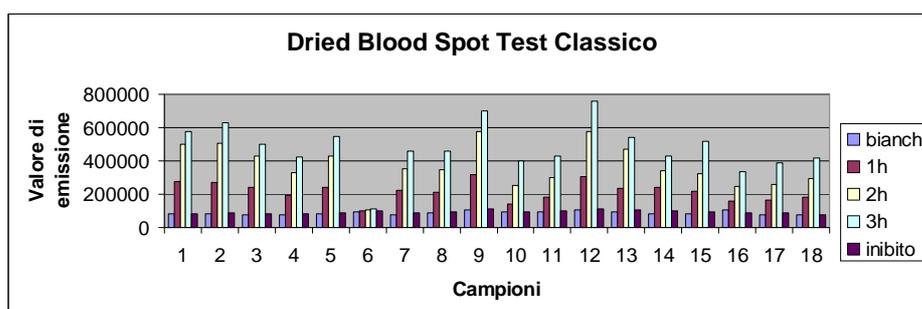


Fig. 25: Cinetica DBFPT su piastra

Lo stesso succede per la metodica in fase liquida; la cinetica nelle tre ore di incubazione aumenta con un andamento lineare marcato rispetto alla metodica precedente.(Fig. 26)

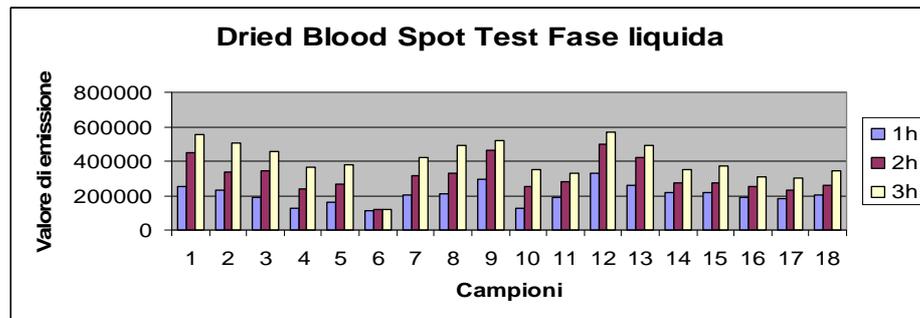


Fig 26: Cinetica DBFPT in fase liquida

Abbiamo inoltre paragonato i valori ottenuti con il metodo su piastra con quelli ottenuti con il metodo in fase liquida (Fig 27).

Questi ultimi risultano lievemente più bassi ma appartenenti comunque allo stesso range di valutazione e ciò dimostra l'alta sensibilità della metodica in fase liquida.

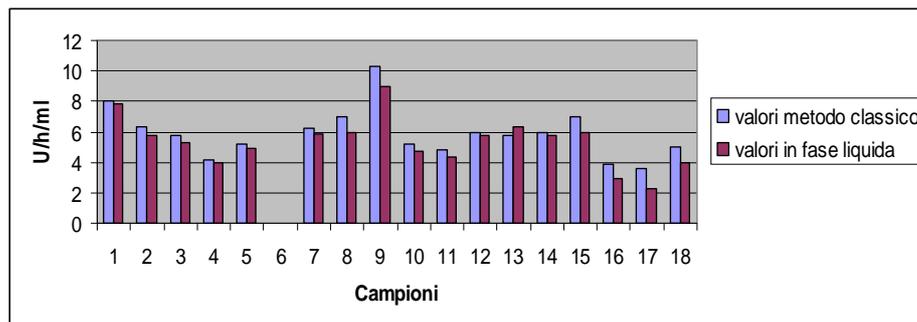


Fig 27: Confronto tra i risultati della metodica su piastra (classica) e i risultati in fase liquida I valori di attività enzimatica non sono normalizzati

6.3 LEUCOCITI E LINFOCITI

Nell'ottica di adoperare un sistema unico abbiamo applicato la stessa metodologia di analisi in fase liquida per saggiare i leucociti e i linfociti. Tale metodo c'è stato particolarmente utile dal momento che avevamo a disposizione una quantità modesta di sangue intero.

Introducendo anche qui la normalizzazione per numero di cellule (leucociti), e non quella per proteine totali, abbiamo adoperato lo stesso sistema di normalizzazione utilizzato per le spot di sangue. In questo caso abbiamo ottenuto valori di attività enzimatica sui linfociti con un range di 14-16 U/ml/h, e un range di 14-20 U/ml/h sui leucociti (Fig.28).

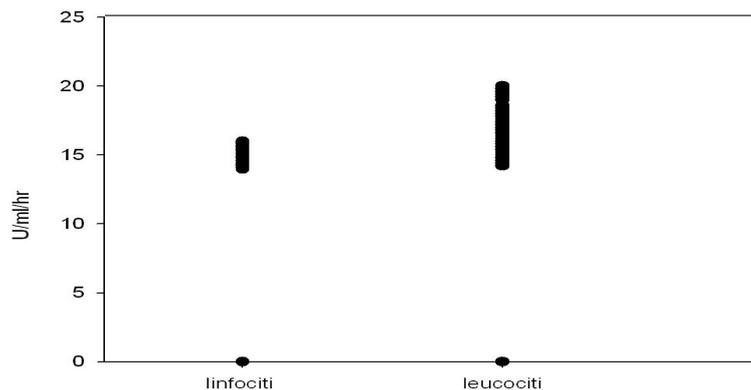


Fig.28: Range di riferimento per l'attività enzimatica normalizzata su leucociti e linfociti.

L'analisi cinetica dei linfociti in piastra dà un'immagine di questo tipo con valori che sono nell'intorno di 15 U/ml/hr (Fig. 29)

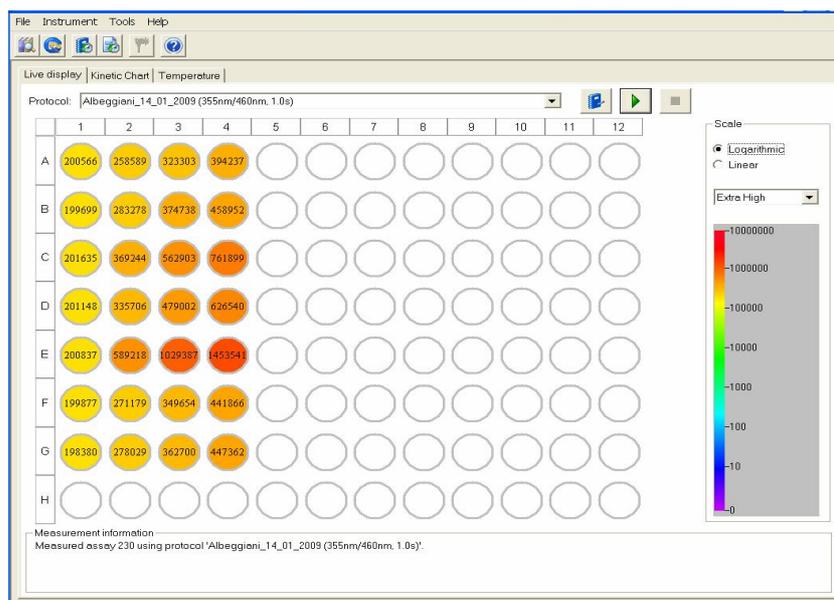


Fig. 29: lettura spettrofluorimetrica del saggio sui linfociti

Si noti la linearità dell'incremento cinetico. Il campione "E" sembra possedere un'attività particolarmente elevata, ma normalizzando per numero di leucociti (12.500/ μ l), la sua attività specifica risultava essere di 16,2 U/ml/hr.

6.4 PLASMA

L'analisi del plasma ha l'inconveniente di non poter essere normalizzata, dunque quello che osserviamo è l'attività enzimatica dovuta anche ad altri tipi di cellule secernenti α -galattosidasi A come ad esempio i fibroblasti e che è influenzata da fattori fisiologici non eliminabili.

Anche dal punto di vista di analisi biochimica ci sono numerosi inconvenienti che rendono questa analisi inconcludente in quanto soggetta a numerose variabili. Un primo punto da osservare è che l' α -galattosidasi A nel plasma (pH 7.2) non è nella sua forma attiva perché a questo pH l'attività risulta quasi totalmente inibita. È solamente nel sistema in vitro a

pH 4.5 dove l'attività risulta misurabile. In più l'attività plasmatica dell' α -galattosidasi A dopo due ore di incubazione, prima dell'esame a 37°C, risulta ridotta dell'80%.

Questo ci dà un'indicazione sul fatto che la frazione che noi misuriamo nel plasma è termolabile(44), probabilmente per il fatto che non si trova all'interno di un ambiente a pH acido. Abbiamo controllato se il pH acido stabilizzava l'enzima, dal momento che la reazione può essere condotta a 37°C per tre ore a pH 4,5. Per far ciò abbiamo incubato separatamente un campione di plasma a 37°C con un analogo campione di plasma portato a pH 4,5 con tampone citrato. Abbiamo constatato che mentre per il primo campione sottoposto ad analisi l'attività si riduceva quasi a zero, ciò non avveniva per il campione incubato in presenza del tampone citrato (Fig. 30-31)

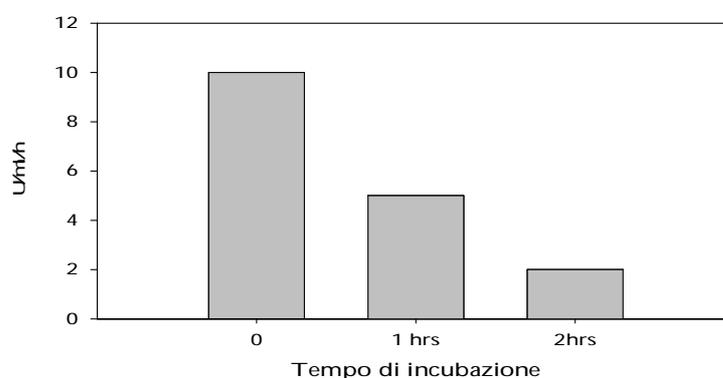


Fig. 30: Decremento orario dell'attività enzimatica su plasma a 37°C

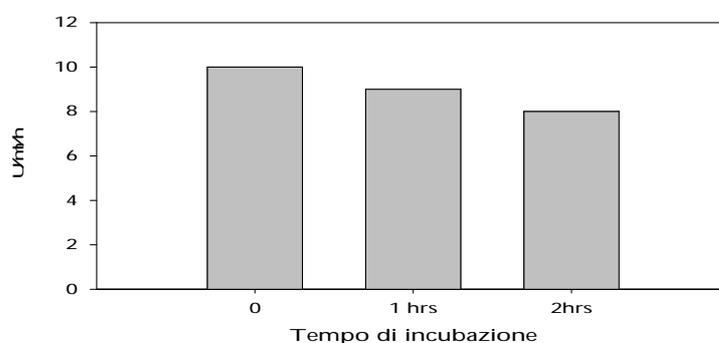


Fig. 31: Decremento orario dell'attività enzimatica su plasma a 37°C a pH 4,5

Non è infrequente comunque che alla terza ora di reazione ci sia un decremento dell'emissione fluorescente rispetto al valore teorico ipotizzato sulla base del valore della seconda ora. Molte sostanze infatti, come i medicinali assunti dai pazienti possono interferire con l'attività enzimatica e altre, come l'emoglobina e la bilirubina possono ridurre significativamente la fluorescenza.

Inoltre la lettura del bianco può variare considerevolmente da un campione all'altro e i risultati ottenuti da plasma lipemico possono essere sospetti perché in funzione della severità della lipemia, dopo l'aggiunta della soluzione di Ethylendiamina il campione può diventare torbido abbassando notevolmente il valore della fluorescenza emessa.

Questo è il motivo per il quale l'analisi dell'attività enzimatica sul plasma non viene da noi considerata come metodica di prima scelta in quanto il campione perviene dopo 24 ore e il prelievo non può essere eseguito e processato subito.

6.5 ANALISI BIOMOLECOLARE

A titolo di esempio riporto di seguito il tipo grafici e di dati da elaborare per la caratterizzazione delle mutazioni, su un pool di 15 soggetti.

Come si evince dalla figura (fig. 32), le curve di amplificazione di tutti i campioni in studio, sono da considerare ottimali, in quanto, la fluorescenza è emessa da tutti allo stesso ciclo di amplificazione (intorno al 25° ciclo), hanno un andamento perfettamente sigmoide e vanno a plateau .

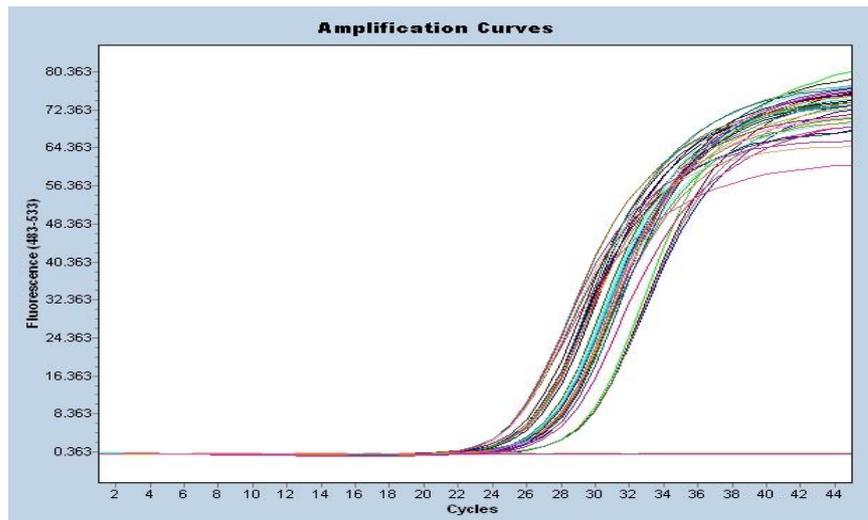


Fig 32: Curve di amplificazione in Real-Time PCR dei campioni in studio

Le curve di melting, per i campioni in analisi non presentano altri picchi aspecifici come è possibile osservare dalla estrapolazione del punto di flesso (fig. 33).

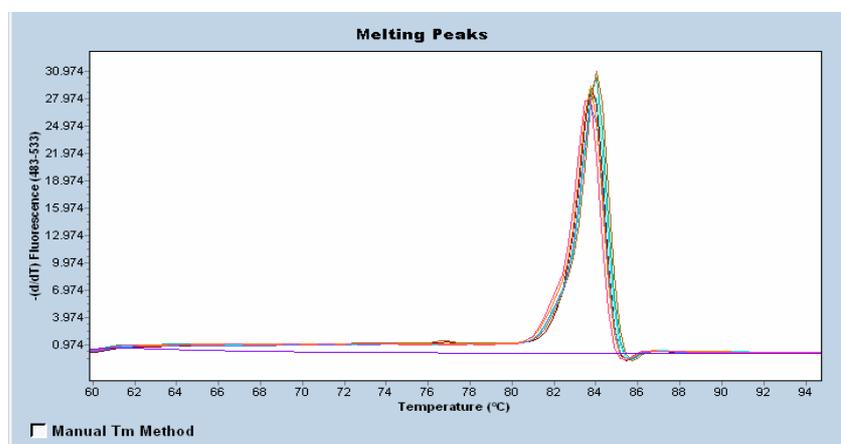


Fig 33: Analisi delle curve di Melting- Estrapolazione del punto di flesso

L'amplificazione dei sette esoni di ogni campione, in Real-Time PCR è da considerarsi ottimale per il successivo studio delle curve di melting. L'analisi delle curve di melting non ha rivelato anomalie nei esoni del gene di tutti gli individui analizzati, tranne che per il soggetto S042, in cui ho caratterizzato tre mutazioni:

Esone 3: mutazione IVS2-76_80del5

Dall'analisi delle curve di melting dell'esone 3 dei soggetti studiati, si possono distinguere due popolazioni diverse, ovvero due profili di melting differenti. In ogni analisi, infatti, oltre ai campioni in studio, si inseriscono anche due controlli wild type e due controlli mutati, un eterozigote, ed un emizigote per la mutazione che seguono due profili di melting diversi. L'esone tre del soggetto S042 rientra nella popolazione mutata e ha un profilo completamente diverso rispetto alla popolazione wild type (fig. 34).

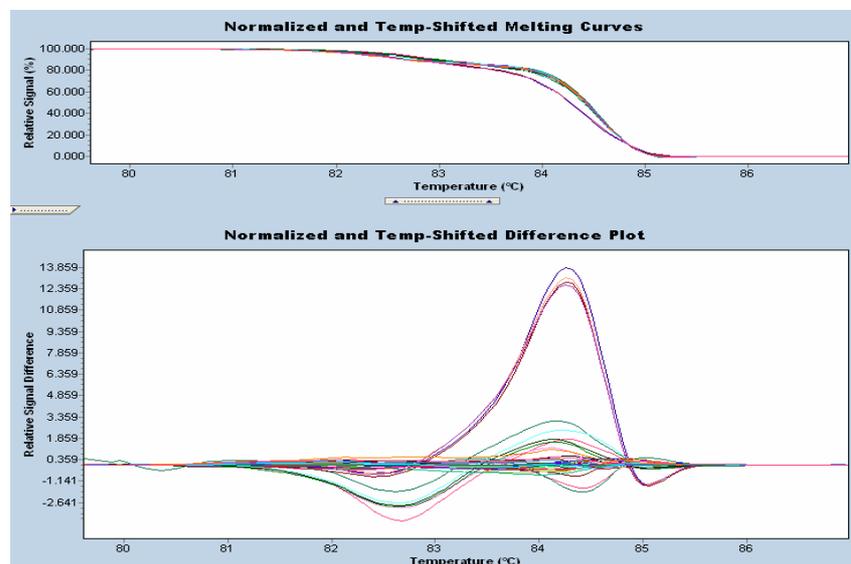


Fig. 34: L'analisi delle curve di melting (in alto) mostra due popolazioni diverse (una WT e una mutata). Il grafico in basso (normalizzazione rispetto al WT) evidenzia un andamento della melting dell'esone 3 del soggetto A042 diverso rispetto ai WT.

Questo esone è stato sequenziato ed è stata riscontrata la seguente mutazione, IVS2-76_80del5 [80] (fig. 35).

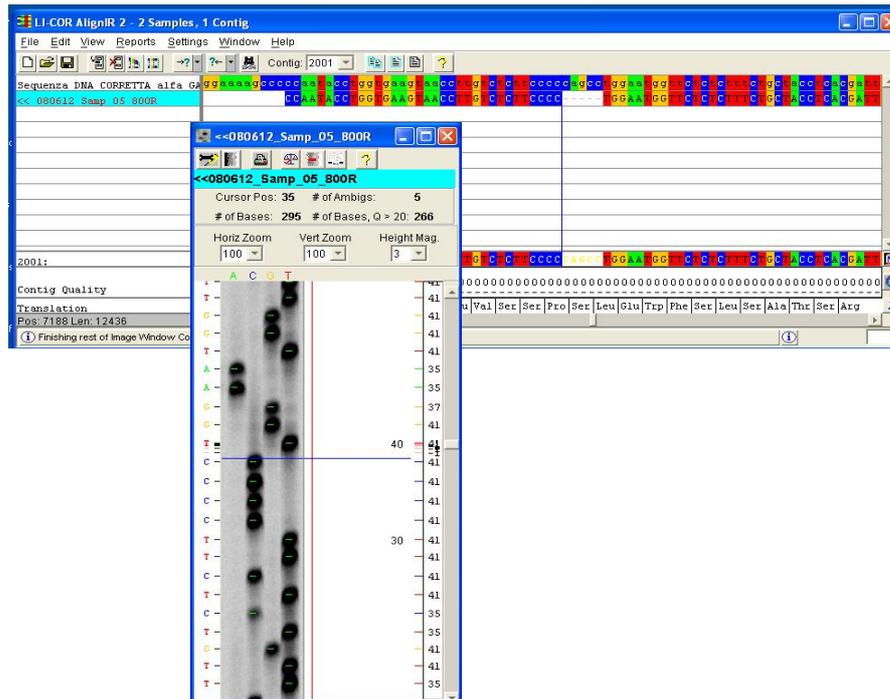


Fig. 35: Mutazione IVS2-76_80del5

La delezione, già descritta in letteratura [80] è un polimorfismo, (ovvero, ha una frequenza nella popolazione superiore all'1%) che solitamente è associato ad altri polimorfismi.

Esone 5: mutazione IVS4-16 A>G

La curva di melting dell'esone 5, ha seguito un andamento comparabile al profilo dei controlli mutati per questo esone (fig. 36)

un motivo di regolazione esonica "TCAT" definito un enhancer di splicing esonico. Questo motivo di sequenza è anche un enhancer intronico (fig. 38).

Introne4 : IVS4-16 A>G
<pre> >introne4 GTGAGATAGTGAGCCCAGAATCCAATAGAACTGTACTGATAGATAGAACTTGACAACAAAGGAAACCAAGGTCTCCTTCA AAGTCCAACGTTACTTACTATCATCCTACCATCTCTCCAGGTTCCAACCACCTTCTCACCATCCCCTGCTGTAATTAT AGCCTAAGCTACCATCACCCTGGAAAGTCATCCTTGTGTCTTCCCTTTATTTTACCATTTCATGTCTGTCTATCAACAGT CCTTCCACCAGTATCTCTAAAATATCTCCTGAATCAGCCACTTCTTCCATCTTCACTACATGCACCCCTGGCCTTCCAA GCTACTATCGGCTCTCAACCAGACTGCTGGGACCACCTGATCTCTCTGCTTCCACTCTGTCTCAACCCCATCTATTTTC CAAGCAGCACTAGAGTTATCATATTTAAATGTAATATCAGTTTTTTTTTTAAAGAAAAAACCCCTGAGACTTAACAGAG TTATAAAAAATATAAATGTCATCATCAGTTCCCTGCTTAAAACCCCTTAACTCGCTTCCAATTGCACTTGGAAATGAAACCA AACTGCACTGATCCAGCCCTTGCCTGCCTCCCCAAAGTCCAAGGGGTCATGGCTCTTCCCTGGCTACACTGGTTTTCTT TCTGTCCCTCAACACTGCAAGCCTATTGCTGCCCCAGGGCCTTTACACTTGCTTTTTTTCTGCCTAGAAGCAGTTCTTCCC CAAAGATTTTTAAAGGGCCGGCTCCTTAACATTGAAGTGCAGACCAAACGCCACATATGCAGACAGTTCTTCTCTAAC TACTTTAAAATAGCCCTCTGTCCATTCTTTCATCACATTAACCTGTTAATTTTTCTTCTCAGAGCTCCACACTATTT GGAAGTATTTGTTGACTTGTTACCATGTCTCCCCACTAGAGTGAAGTTTCATGAGGGCAGGGACCTTGTCTGACTTTGA CTGTATCTCTCGATATGGTTAAGTGTGTAATGTTATTTATGGAATGAATCCCTATTATCCCTCATTATCTCTGCAAA ATAGTCTTTTTTCTCAACATCTTAAACCTGATATCCACCTGCCTATCTACAACTTTTTTTTTGCGACAGAGTCTCACT GTCACCCAGGCTAGAGTGCAGTGGCGCCATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCGGGTTAAGCGATTCTCTGCCT CAGCCTCCAGTAGCTGGGATTATAGGCGTGCCTACCACATCTGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGATGGTTTCAC CATGTTGGCCAGCTTGTCTCGAACTCCTGACCTCAGATGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGG CATGAGCCACCGTGGCCAGCCTTACAACTTTTTATTCCATTAACAACTATATGCCTGGGATTTAAGTTTTCTTAATA CTTGATGGAGTCTATGTAATTTTGCAGCTTTAATTTTACTAAGACCATTTTAGTTCTGATTATAGAAGTAAATTAAC TTAAGGGATTTCAAGTTATATGGCCTACTTCTGAAGCAAACCTTCTACAGTGAAAATTCATTATAAGGGTTTAGACCTCC TTATGGAGACGTTCAATCTGTAACTCAAGAGAAGGCTACAAGTGCCTCCTTTAAACTGTTTTTCATCTCACAAAGGATGT AGTAGAAAGTAAACAGAAGAGTCAATATCTGTTTTTCACAG </pre>

Fig. 38: Sequenza intronica (introne 4) in cui ricade il sito di regolazione esonica TCAT. La mutazione IVS4-16 A>G colpisce la A della sequenza evidenziata.

Esone 7: mutazione IVS6-22 C>T

Nel soggetto S042, dall'analisi della curva di melting dell'esone 7 si evince che ha un andamento diverso rispetto alle curve wild type.

L'esone 7 è stato sequenziato (fig. 39) ed è stata individuato un polimorfismo, noto in letteratura(14), IVS6-22 C>T, presente nella popolazione generale e nei soggetti Fabry con una frequenza simile.

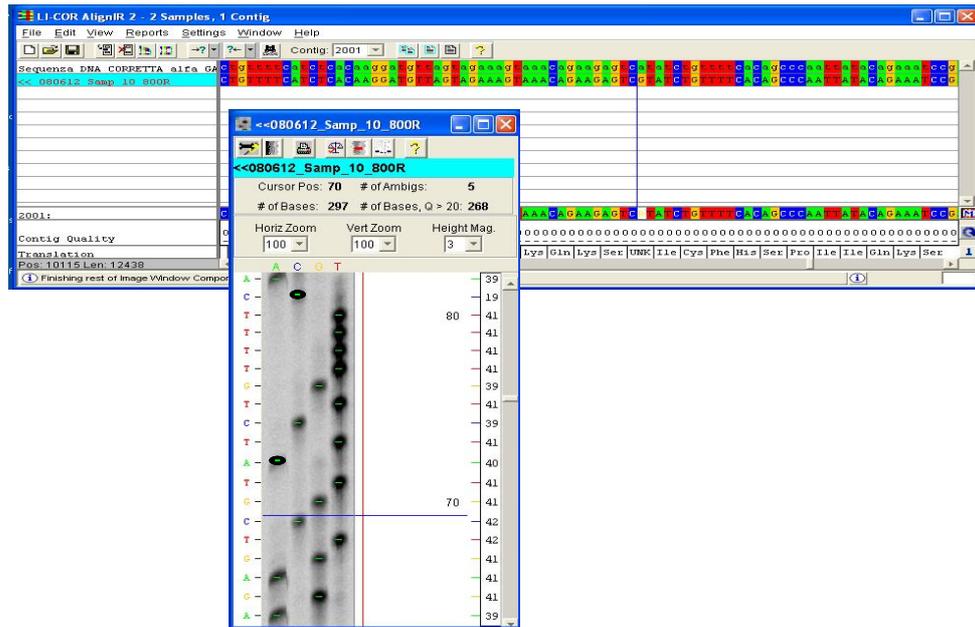


Fig. 39: Mutazione IVS6-22 C>T

La transizione C>T nell'introne 6 localizzata 22 paia di basi a monte dell'esone 7 ricade all'interno del sito di regolazione esonica "ACCA" (fig. 40). Questa sequenza rientra nella classe dei silenziatori esonici ovvero sequenze a cui si legano fattori di splicing dell'RNA e ne inibiscono l'assemblaggio dello spliceosoma.

<i>Introne 6: IVS6-22 C>T</i>
GTAAATAAGAGTATATATTTTAAGATGGCTTTATATACCAATACCAACTTTGTCTTGGGCCTAAA TCTATTTTTTTCCCTTGCCTTGTACTATCAGTAATAAAGCTTCTTGCTAGAAACATTACTT TATTTCCAAAATAATGCTACAGGATCATTTTAATTTTTCTACAAGTGCCTTGATAGTTCGACATT AAGAATGAATGCCAACTAACAGGGCCACTTATCAC TAGTTGCTAAGCAACCACTTTCTTGTT TTTCAG

Fig. 40: Sequenza intronica (introne 6) in cui ricade il sito di regolazione esonica ACCA. La mutazione IVS6-22 C>T colpisce la prima C della sequenza evidenziata.

Lo screening genetico si è rivelato veloce e affidabile e mi ha permesso di studiare un gran numero di soggetti con sospetto di malattia di Fabry.

Ho individuato molte mutazioni missense e non, confermando quanto detto sino a ora sulla malattia di Fabry, ovvero, che i difetti nel gene che codifica GLA α -galattosidasi A sono eterogenei, con oltre 585 mutazioni

registrate [78, 79], la maggior parte di queste mutazioni rendono l'enzima non funzionante [78]. La maggior parte delle famiglie ha mutazioni uniche che potenzialmente spiegano la marcata variabilità dell'attività residua dell'enzima, ma solo in parte il corso naturale della malattia, poiché esiste la variabilità sintomatologica intra-familiare.

Un dato estremamente interessante è stato il riscontro di mutazioni polimorfiche associate, nel gene GLA, in un numero molto elevato dei soggetti da noi studiati (con sospetto di malattia di Fabry). Questi polimorfismi si presentano in due serie di aplotipi (Fig.41) (si definisce aplotipo una combinazione di varianti alleliche lungo un cromosoma o segmento cromosomico contenente loci in linkage disequilibrium, cioè associati tra di loro). A oggi, sono molti gli interrogativi sul significato e sull'effetto di questi polimorfismi sui meccanismi patofisiologici e sulla severità della malattia di Fabry.

Sui dati ottenuti ho condotto della analisi statistiche:

Aplotipo I

E' costituito dalle seguenti mutazioni:

-10 C>T

IVS2-76_80del5

IVS4-16 A>G

IVS6-22C>T

Polimorfismi associati a costituire l'aplotipo ancestrale

Lo studio preliminare d'associazione è stato effettuato su 365 soggetti escludendo i membri appartenenti alla stessa famiglia.

20 su 365 presentano tale aplotipo, ma l'eterogeneità delle sintomatologie riscontrate nei 20 soggetti attualmente non consentono d'identificare alcuna correlazione diretta tra genotipo e fenotipo. Non è

escluso comunque che tale associazione aplotipica possa determinare una certa "predisposizione" verso particolari patologie.

Aplotipo II

E' costituito dalle seguenti mutazioni:

-12G>A	}	Polimorfismi associati a costituire l'aplotipo ancestrale
IVS4+68 A>G		
IVS6-22C>T		
IVS4+866_867delAG		

Lo studio preliminare d'associazione è stato effettuato su 365 soggetti escludendo i membri appartenenti alla stessa famiglia.

Lo studio d'associazione ha rilevato che questo aplotipo può essere correlato a neuropatie, questo è dimostrato dai dati preliminari ottenuti stratificando i soggetti per ictus.

Si dimostra infatti che su 26 soggetti che presentano neuropatie ben 8 hanno l'aplotipo II, e su 339 che non hanno sintomatologie riconducibili e neuropatie nessuno risulta avere l'aplotipo II.

	Totale sog (*)	Neuropatie	Presenza Aplotipo
Aplotipo II	356	26	8

	Totale sog (*)	NO Neuropatie	Presenza Aplotipo
Aplotipo II	356	339	0

(*) *soggetti che non hanno tra loro nessuna parentela*

7. DISCUSSIONE

Alcune riflessioni sull'attività enzimatica dell'enzima α -Gal A, sulla genetica della malattia di Anderson Fabry suggeriscono un'estensione nella definizione di tale patologia.

La possibilità di rilevare e confrontare l'attività enzimatica di uno stesso soggetto in più distretti contemporaneamente, con la stessa metodica, mi ha permesso di osservare alterazioni degli equilibri dell'attività enzimatica nelle diverse sedi. In particolare, sono giunti alla mia attenzione non pochi soggetti con clinica e dati genetico-enzimatici in netta contraddizione, che mal si associano con la classica definizione di malattia di Fabry. A questo proposito, è molto utile riflettere anche su dati, informazioni e spunti riscontrati in letteratura:

Screening neonatale di Spada [1]

In questo lavoro condotto mediante screening neonatale su DBFP il numero di individui affetti con attività enzimatica bassa o nulla è di 1:3000 nati vivi.

Ciò è in contrasto con il valore 13 volte inferiore (1:40.000) riportato in gran parte della letteratura. Come è possibile spiegare questa discrepanza? Lo screening è stato condotto sulle spot di sangue provenienti da diversi istituti di neonatologia. Normalmente invece, tale esame è condotto su soggetti di cui si sospetta la malattia di Fabry. Concentriamo allora la nostra attenzione su due aspetti che probabilmente spesso non correlano fra loro: la diagnostica e la clinica.

Nella prima indagine guardiamo solamente l'attività enzimatica, nel secondo caso partiamo dal quadro clinico e analizziamo il sospetto campione come probando.

Nel primo caso (screening neonatale) troviamo valori 13 volte più alti nell'alterazione della attività enzimatica rispetto ai campioni provenienti da una selezione clinica che dovrebbero, in virtù di ciò, essere più numerosi. Per quale motivo l'analisi enzimatica di screening dà tale sovrastima? E' possibile che l'assenza o la ridotta attività enzimatica non correli con la manifestazione clinica della malattia e che ci siano individui con mutazione nel gene GLA che non manifestino la malattia e che dunque una mutazione in GLA possa essere compensata per esempio da un pathway metabolico alternativo?

Le mutazioni del gene GLA sono mutazioni "private" praticamente tante quanto la lunghezza del gene senza punti "hot spot" e senza alcuna pressione selettiva. Ciò equivale a dire che potrebbero essere presenti in individui che non manifestano la malattia che sopperirebbero con un pathway metabolico alternativo alla deficienza enzimatica. In tale maniera renderebbero il gene GLA poco conservato.

Consideriamo a questo punto l'osservazione condotta dalla prof.ssa Daniela Concolino su quattro fratelli maschi (emizigoti) con identica mutazione nel gene GLA. Detti fratelli presentavano ciascuno una patologia d'organo differente, il che vuol dire che il gene non è determinante per la manifestazione fenotipica della malattia (altamente variabile).

A differenza di quasi tutte le malattie lisosomiali La malattia di Fabry presenta un tempo eccezionalmente lungo nella presentazione dei sintomi della malattia, nella sua evoluzione e nella aspettativa di vita, suggerendo anche qui, l'intervento di metabolismi di supporto.

Nelle malattie autosomiche da deficit enzimatico quasi sempre esse si manifestano in omozigosi in quanto nei mammiferi avviene il fenomeno del "compenso di dose cromosomica". L'espressione genica è modulata per i due cromosomi cosicché, se i due cromosomi sono wild type, l'espressione

del gene sarà per ciascun cromosoma al 50%. Se un cromosoma è alterato l'espressione dell'altro sarà al 100%. Per quanto riguarda i prodotti di natura enzimatica poi, per il fenomeno detto di ridondanza metabolica, basta che sia presente il 10% dell'enzima funzionante per compensare la patologia.

Consideriamo ora le due malattie lisosomiali X-linked e il loro differente comportamento: rispettivamente la sindrome di Hunter (o Mucopolisaccaridoso II) e la malattia di Fabry. Entrambe le patologie sono causate da deficit di enzimi lisosomiali. Ma, mentre nella Hunter la manifestazione della malattia è eccezionalmente rara nelle donne (in seguito ad una estrema Lyonizzazione), nella malattia di Fabry non è così. Ciò suggerisce che bassi livelli di attività enzimatica riescono a sopperire ed a correggere il metabolismo delle cellule affette. Ciò non vale per le donne portatrici della malattia di Fabry che, anche con valori di attività plasmatica normali, manifestano segni della malattia suggerendo un'alterazione dell'uptake dell'enzima in cellule anomale. Tale situazione si verifica anche in vitro. Le colture di cellule affette da malattia di Hunter vengono cross-corrette dalla cocoltura con cellule sane. Ciò non avviene realizzando identico tipo di cocolture nella malattia di Fabry.

Nel nostro laboratorio abbiamo condotto test enzimatici che sono stati tutti normalizzati riducendo così la variabilità del range dei valori normali e abbiamo ridefinito dei "valori specifici di attività" che ci hanno permesso di interpretare meglio le variazioni di attività enzimatica.

Abbiamo così analizzato le attività specifiche e definito gli intorni numerici rappresentativi per le singole fonti di α -Gal A analizzate. La cosa interessante è l'aver notato che tali valori sono in equilibrio fra loro e che indipendentemente dai valori assoluti, in presenza di alcuni polimorfismi o di una clinica che suggerisce la malattia di Fabry, tale equilibrio è rotto.

Prendiamo ad esempio la mutazione D313Y: i valori di attività enzimatica su spot, linfociti, leucociti sono assolutamente normali mentre su plasma il valore è inferiore a 3 U/ml/hr.

Ancora, abbiamo analizzato recentemente un paziente che presentava una clinica da malattia di Fabry. Il paziente era geneticamente wild type, presentava però, ridotta attività su spot (2,4 U/ml/hr), ridotta attività leucocitaria (6U/ml/hr) ed elevata attività plasmatica (14U/ml/hr). Di nuovo un disequilibrio in un paziente wild type, ma con tutti i segni della malattia. Ciò suggerisce che altri fattori metabolici possano indurre la patologia. A rafforzare questa convinzione, c'è l'analisi di altri due casi ancora più interessanti. Alla nostra osservazione è giunto il campione di una signora ottantenne alla quale era stata diagnosticata, 15 anni fa, un'ipertrofia ventricolare sinistra. L'attività enzimatica era bassa (2.3 U/ml/hr) e il gene presentava una mutazione importante associata alla malattia di Fabry. Ambedue i genitori della signora erano morti in età avanzata e la signora non dichiarava, nonostante l'età, di soffrire di altri disturbi. Abbiamo allora contattato la figlia, di anni 56. La signora non presentava alcun disturbo. All'analisi genetica è stata individuata la stessa mutazione della madre ma la sua attività enzimatica su spot, plasma, leucociti e linfociti era nulla. Quali metabolismi alternativi sono attivi nelle pazienti? Tale alterazione genetica/enzimatica sarebbe passata inosservata se le due donne fossero state valutate solo dal punto di vista clinico, mentre nello screening di Spada sarebbe risultate positive pur non avendo la manifestazione della malattia. È probabile quindi, che molti soggetti che presentano deficienza enzimatica non vanno incontro alla patologia.

Il secondo caso è stato quello di un soggetto di anni 60 con ipertrofia ventricolare sinistra. Anche qui attività zero e nessun particolare

disturbo accusato in precedenza. Essendo medico si era sottoposto a un ecodoppler per controllare la funzionalità cardiaca.

Da quanto esposto possiamo formulare una suggestiva ipotesi sulla malattia di Fabry. L'alterazione genetica con bassa attività enzimatica non è condizione necessaria e sufficiente per l'esordio della patologia. Probabilmente gli eventi causali sono invece alterazioni del traffico vescicolare, con un eventuale interessamento del gene della galattosidasi, che ha la prevalenza di 1:3500 (come evidenziato nello screening neonatale di Spada), indipendentemente dall'alterazione o meno del traffico vescicolare.

8. BIBLIOGRAFIA

[1] Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukul T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ.: High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet.* 2006 Jul;79(1):31-40. Epub 2006 Apr 28.

[2] Desnick RJ, Thorpe SR, Fiddler M: Toward enzyme therapy for lysosomal storage diseases. *Physiol Rev* 56:57–99. (1976).

[3] Louise LC Pinto, Taiane A Vieira, Roberto Giugliani, and Ida VD Schwartz: Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 5: 14. Published online 2010 May 28. doi: 10.1186/1750-1172-5-14.

[4] Walkley SU (2007) Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosomes. *Acta Paediatr* 96:26–32

[5] Walkley SU (2009) Pathogenic cascades in lysosomal disease—Why so complex? *J Inherit Metab Dis* 32:181–189

[6] Cinzia Maria Bellettato, Maurizio Scarpa: Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* (2010) 33:347–362. DOI 10.1007/s10545-010-9075-9

[7] Wise D, Wallace HJ, Jellinck EH: Angiokeratoma corporis diffusum: a clinical study of eight affected families. *Q J Med* 1962; 31: 177.

[8] Opitz JM, Stiles FC, Wise D, et al. The genetics of angiokeratomacorporis diffusum (Fabry's disease) and its linkage with Xg(a) locus. *Am J Hum Genet* 1965; 17: 325

[9] Kint JA. Fabry's disease, α -galactosidase deficiency. *Science* 1970; 167: 1268.

[10] Bishop DF, Calhoun DH, Bernstein HS, Quinn M, Hantzopoulos P, Desnick RJ. Molecular cloning and nucleotidesequencing of a cDNA encoding human α -galattosidase A. *Am J Hum Genet* 1985; 37: A144.

[11] Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. Nucleotide sequence of the human α -galactosidase A. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3301.

[12] Bishop DF, Calhoun DH, Bernstein HS, Hanzopoulos P, Quinn M, Desnick RJ. Human α -galactosidase A: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:4859-63.

[13] Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. α -galactosidase A deficiency. Fabry disease The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: Mc Graw Hill 1995; 2741-84.

[14] Desnick RJ. Enzyme replacement and beyond. *J Inherit Metabol Dis* 2001; 24:251-65.

[15] Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the α -galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Invest Med* 2000; 48 (4): 227-35.

[16] Miyamura N, Araki E, Matsuda K, et al. A Carboxy-terminal Truncation of Human α -Galactosidase A in a Heterozygous Female with Fabry disease and Modification of the Enzymatic Activity by the Carboxy-terminal Domain *J Clin Invest* 1996;98 (8): 1809-17.

[17] Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1995; 333: 288-93.

[18] Satoshi I, Hui-Hwa C, Kunito K, Kayo Y, Hui-Li W, Scott C, Jian-Qiang F. Mutant α -Galactosidase A enzymes identified in Fabry patients with residual enzyme activity: Biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochemical Journal* 2007 Jun; BJ20070479

[19] Whybra C, Kampmann C, Willers I, Davies J, Winchester B, Kriegsmann J, Brühl K, Gal A, Bunge S, Beck M: Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J Inherit Metab Dis*. 2001 Dec;24(7):715-24.

[20] Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editor. III. New York: MacGraw-Hill; 2001. α galactosidase A deficiency: Fabry disease; pp. 3773–3774.

[21] Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wijburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkman J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ.: Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2812-7. Epub 2008 Feb 19.

[22] Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Oosterwijk JC, Ober C. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet A*. 2004 Aug 30;129A(2):136-43.

[23] Patrick B Deegan, Frank Bähler, Miguel Barba, Derralynn A Hughes, and Michael Beck. In: *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. 30. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Fabry disease in females: clinical characteristics and effects of enzyme replacement therapy.

[24] Deegan PB, Bahner F, Barba Romero MA, Hughes DA, Kapmann C, Beck M. on behalf of European FOS Investigators. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. *J Med Genet*. 2005;43:347–352. doi: 10.1136/jmg.2005.036327.

[25] Gibas AL, Klatt R, Johson J, Clarke JTR, Katz J. Disease rarity carrier status and gender: a triple disadvantage for women with Fabry disease. *J Genet Couns*. 2008;17:528–537. doi: 10.1007/s10897-008-9179-7.

[26] Baehner F, Kapmann C, Whybra C, Miebach E, Wiethoff CM, Beck M. Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIB study. *J Inherited Metab Dis*. 2003;26:617–27. doi: 10.1023/B:BOLI.0000005658.14563.77.

[27] Migeon BR. *Females are Mosaics: X inactivation and sex differences in disease*. New York: Oxford University Press; 2007.

[28] MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate Carrier females. *J Med Genet*. 2001;38:769–775. doi: 10.1136/jmg.38.11.769.

[29] Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, Roscher AA, Muntau AC. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr*. 2006;95(Suppl):30–38. doi: 10.1080/08035320600618809.

[30] Rahman AN, Simcone NA, Hackel DB, Hall P, Hirsh EZ, Harris JW. Angiokeratoma corporis diffusum universale (hereditary dystopic lipidosis). *Trans Assoc Am Physicians* 1961; 74:366.

[31] Sheth KJ, Bernahard GC: The arthropathy of Fabry disease. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 781.

[32] Shelley ED, Shelley WB, Kurczynski TW: Painful fingers, heat intolerance and teleangiectases of the ear: easily ignored childhood signs of Fabry disease. *Pediatric Dermatology* 1995;12, n°3: 215-9.

- [33] Chimenti C Ricci R, Pieroni M, Natale L, Russo M, Frustaci A. Cardiac variant of Fabry's disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiologia* 1999; 44: 469-7.
- [34] Meroni M, Spini C, Tazzari S, Sessa A, et al. Isolated glomerular proteinuria as the only clinical manifestation of Fabry's disease in an adult male. *Nephron Dial Transplant* 1997; 12:221-3.
- [35] Meroni M, Sessa A, Battini G, Tazzari S, Torri Tarelli L. Kidney involvement in Anderson-Fabry disease". *Contrib Nephrol* 1997; 122: 178-84.
- [36] Sessa A, Meroni M, Battini G. Eterogeneità fenotipica della malattia di Fabry: malattia rara? *Giornale Italiano di Nefrologia* 1997; 14 n°4: 195-201.
- [37] Kolodny EH. Fabry disease. In: Bogousslavsky J, Caplan L, eds. *Stroke Syndromes*. New York: Cambridge University Press 1995;
- [38] Efthimiou J, Mc Lelland J, Bettridge DJ: Short P-R interval and tachyarrhythmias in Fabry's disease. *Postgrad Med J* 1986; 62:285.
- [39] Goldman M, Cantor R, Schwartz MF, Baker M, Desnick RJ. Echocardiographic abnormalities and disease severity in Fabry's disease. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 1157.
- [40] Mendez M, Stanley T, Medel N, Zhaoping L, Tedesco T. The vascular dementia of Fabry's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1997; 8: 252-7.
- [41] Menkes DL, O'Neil TJ, Saenz KK. Fabry's disease presenting as syncope, angiokeratomas, and spoke-like cataracts in a young man: discussion of the differential diagnosis. *Mil Med* 1997;162(11):773-6.
- [42] Elleder M, Bradova V, Smid F, et al. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol* 1990; 417: 449-55.
- [43] Nagao Y, Nakashima H, Fukuara Y, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in late-onset variant of Fabry disease with high residual activity of α -galactosidase A. *Clin Genet* 1991; 39: 233-7.
- [44] Kuhn H, Kohler E, Hort W, Frenzel H. Concealed myocardial storage (Fabry's disease): pitfall in the diagnosis of hypertrophic non obstructive cardiomyopathy. *Circulation* 1982; 66 (suppl II): II-117.
- [45] Ko Y, Kim H, Roh Y, Park C, Kwon C, Park M. Atypical Fabry's disease. An oligosymptomatic variant. *Arch Patol Lab Med* 1996; 120: 86-8.

[46] Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvinova J, Magage S, Bultas J, Lubanda JC, Elleder M, Karetova D, Pavlikova M, Hrebicek M: Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *J Mol Med.* 2005 Aug;83(8):647-54. Epub 2005 Apr 2.

[47] Chabas A, Happle R. Understanding the biology of X linked diseases. *Acta Paediatr.* 2006;451(Suppl 95):9–10. doi: 10.1080/08035320600619104.

[48] Nakayama Y, Tsumura K, Yamashita N, Yoshimaru K. Dynamic left ventricular arterial pressure gradient and sick sinus syndrome with heterozygous Fabry's disease improved following implantation of a dual chamber pacemaker. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1999;22:1114–15.

[49] Franceschetti AT. Fabry disease. Ocular manifestations. In Bergsmu D, Bron AJ, Cotlier E (eds): *The Eye and inborn error of metabolism.* New York, AR Liss, 1976, pag. 195.

[50] MacDermot KD, Holmes A, Miners AH. Anderson–Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet.* 2001;38:769–75.

[51] Galanos J, Nicholls K, Grigg L, Kiers L, Crawford A, Becker G. Clinical features of Fabry's disease in Australian patients. *Intern Med J.* 2002;32:575–84.

[52] Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C. et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest.* 2004;34:236–42.

[53] Whybra C, Kampmann C, Willers I, Davies J, Winchester B, Kriegsmann J. et al. Anderson–Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J Inherit Metab Dis.* 2001;24:715–24.

[54] Schiffmann R, Murray GJ, et al. Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry's disease. *PNAS* 2000; 97: 365-70.

[55] Kramer W, Thormann J, Mueller K, Frenzel H. Progressive cardiac involvement by Fabry's disease despite successful renal allotransplantation. *Int J Cardiol* 1984; 7: 72.

[56] Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA 3rd, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;285:2743–2749.

[57] Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP; Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab*. 2008 Feb;93(2):112-28. Epub 2007 Nov 26.

[58] Linthorst GE, De Rie MA, Tjiam KH, Aerts JM, Dingemans KP, Hollak CE. Misdiagnosis of Fabry disease: importance of biochemical confirmation of clinical or pathological suspicion. *Br J Dermatol*. 2004 Mar;150(3):575-7.

[59] Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta*. 1981 May 5;112(2):247-51.

[60] Hoffmann B, Georg Koch H, Schweitzer-Krantz S, Wendel U, Mayatepek E. Deficient alpha-galactosidase A activity in plasma but no Fabry disease--a pitfall in diagnosis. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1276-7.

[61] Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta*. 2005 Mar;353(1-2):201-3.

[62] Caudron E, Molière D, Zhou JY, Prognon P, Germain DP. Recent advances of Fabry disease screening for at risk population. *Med Sci (Paris)*. 2005 Dec;21(11 Suppl):48-50.

[63] Germain DP, Benistan K, Angelova L. [X-linked inheritance and its implication in the diagnosis and management of female patients in Fabry disease] *Rev Med Int*. 2010;31:S209–S214.

[64] Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, Giguere R, Drouin R. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:106. doi: 10.1007/s10545-006-0444-3.

[65] Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, Lee P, Waldek S, Winchester B. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl*. 2005;94:51–54. doi: 10.1080/08035320510028111.

[66] Bekri S, Lidove O, Jaussaud R, Knebelmann B, Barbey F. The role of ceramide trihexoside (globotriaosylceramide) in the diagnosis and follow-up of the efficacy of treatment of Fabry disease: a review of the literature. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2006;4:289–297. doi: 10.2174/187152506778520718.

[67] Andrade J, Waters PJ, Singh RS, Levin A, Toh BC, Vallance HD, Sirrs S. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:139–145. doi: 10.2215/CJN.02490607.

[68] Brouns R, Thijs V, Eyskens F, Van den Broeck M, Belachew S, Van Broeckhoven C, Redondo P, Hemelsoet D, Fumal A, Jeangette S, Verslegers W, Baker R, Hughes D, De Deyn PP. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke.* 2010;41:863–868. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.579409.

[69] Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem.* 2004;50:1785–1796. doi: 10.1373/clinchem.2004.035907.

[70] Gelb MH, Turecek F, Scott CR, Chamoles NA. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29:397–404. doi: 10.1007/s10545-006-0265-4.

[71] Lukacs Z, Keil A, Kohlschutter A, Beck M, Mengel E. The ratio of alpha-galactosidase to beta-glucuronidase activities in dried blood for the identification of female Fabry disease patients. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28:803–805. doi: 10.1007/s10545-005-0039-4.

[72] Dominique P Germain: Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 5: 30. doi: 10.1186/1750-1172-5-30.

[73] Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med.* 1973 Feb;81(2):157-7

[74] Marge A. Brewster, Steve A. Whaley, and Ann C. Kane Variables in the Laboratory Diagnosis of Fabry's Disease by Measurement of Methylumbelliferyl- α -Galactosidase Activity by *Clin. Chem.* 20/3 383-386 (1974).

[75] Armando G. Poepl, Gary J. Murray, JeVrey A. Medin.: Enhanced Wlter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease. *Analytical Biochemistry* 337 (2005) 161–163.

[76] N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli.: Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clinica Chimica Acta* 308 (2001). 195–196.

[77] Schirinzi A, Centra M, Prattichizzo C, Gigante M, De Fabritiis M, Giancaspro V, Petrarulo F, Santacroce R, Margaglione M, Gesualdo L, Ranieri E. Identification of GLA gene deletions in Fabry patients by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) *Mol Genet Metab.* 2008;94:382–385. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.03.017.

[78] Gal A. In: Fabry disease. Elstein D, Altarescu G, Beck M, editor. Dordrecht, Heidelberg, London, New-York: Springer; 2010. Molecular genetics of Fabry disease and Genotype-phenotype correlation; pp. 3–19. full_text.

[79] The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. <http://www.hgmd.cf.ac.uk>.

[80] Joanna P Davies, Bryan G Winchester, Sue Malcolm. Sequence variations in the first exon of α -Galactosidase A. *F Med Genet* 1993;30:658-63.

[81] Shiffmann R, Murray GJ, et al. Infusion of α -galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry's disease. *PNAS* 2000; 97: 365-70.

[82] Kramer W, Thormann J, Mueller K, Frenzel H. Progressive cardiac involvement by Fabry's disease despite successful renal allotransplantation. *Int J Cardiol* 1984; 7: 72.

[83] Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA 3rd, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;285:2743–2749

[84] Yoshimitsu M, Higuchi K, Ramsbir S, Nonaka T, Rasaiah VI, Siatskas C, Liang SB, Murray GJ, Brady RO, Medin JA. Efficient correction of Fabry mice and patient cells mediated by lentiviral transduction of hematopoietic stem/progenitor cells. *Gene Ther.* 2007 Feb;14(3):256-65. Epub 2006 Aug 24

[85] Yoshimitsu M, Higuchi K, Dawood F, Rasaiah VI, Ayach B, Chen M, Liu P, Medin JA Correction of cardiac abnormalities in Fabry mice by direct intraventricular injection of a recombinant lentiviral vector that engineers expression of alpha-galactosidase A. *Circ J.* 2006 Nov;70(11):1503-8

[86] Calhoun DH, Bishop DF, Bernstein HS, Quinn M, Hantzopoulos P, Desnick RJ. Fabry disease: isolation of a cDNA clone encoding human alpha-galactosidase A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Nov;82(21):7364-8.

[87] Mehta A, Parini R. Fabry disease beyond men. *Acta Paediatr Suppl.* 2008 Apr;97(457):31-2.