

Scienze e Biotecnologie Mediche Sperimentali Applicate. Indirizzo: Genetica e fisiopatologia del danno cardiaco cardiovascolare nelle malattie endocrino-metaboliche.

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e specialistica

Settore Scientifico Disciplinare: MED/09

Ricerca di nuovi marcatori, diagnostici e prognostici,
nella malattia di Fabry

L DOTTORE

Simone Scalia

IL COORDINATORE

Prof. Rosario Scaglione

IL TUTOR

Prof.ssa Tiziana Di Chiara

CO-TUTOR

Prof. Giovanni Duro

CICLO XXVI

2016

INDICE

1. Introduzione	3
2. Malattie lisosomiali.....	4
3. La malattia di Fabry.....	5
3.1 Cenni storici.....	5
3.2 L'incidenza della malattia.....	7
3.3 Diagnosi.....	9
3.4 Manifestazioni cliniche.....	11
3.5 La malattia di Fabry nelle donne.....	15
3.6 Genetica della malattia di Fabry.....	16
3.7 La terapia.....	18
4. Obiettivo dello studio.....	20
5. I miRNA.....	21
6. Materiali e Metodi.....	23
6.1 Analisi enzimatica (Dried Blood spot test).....	23
6.2 Analisi biomolecolare.....	25
6.3 Analisi di <i>microRNA profiling</i>	29
6.4 Attività enzimatica <i>in vitro</i>	30
7. Risultati.....	36
7.1 Identificazione di un profilo di espressione di miRNA circolanti in soggetti con la S126G ed in pazienti Fabry.....	36
7.2 Attività enzimatica <i>in vitro</i> e risposta delle diverse mutazioni alla terapia chaperonica.....	44
8. Discussione.....	51
9. Conclusioni.....	54
10. Bibliografia.....	55

1. INTRODUZIONE

La malattia di Anderson-Fabry (mF), o semplicemente malattia di Fabry, è un disordine metabolico, da accumulo lisosomiale, caratterizzato dal deficit funzionale (totale o parziale) dell'enzima α -galattosidasi A (α -Gal A)⁽¹⁾. Tale deficit è causato da mutazioni nel gene GLA, che codifica per questo enzima, presente nel braccio lungo del cromosoma X. Il difetto funzionale dell' α -galattosidasi A determina un'alterazione del metabolismo di alcuni glicosfingolipidi, prevalentemente il globotriaosilceramide (Gb3) mostrato in fig.1, che di conseguenza si accumulano nei lisosomi⁽²⁾.

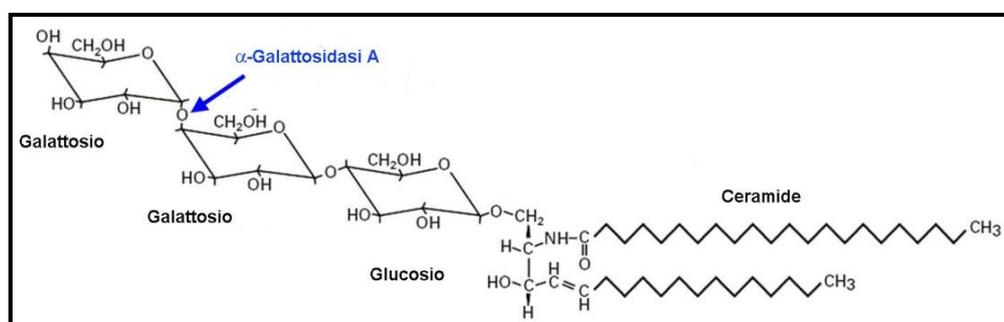


Figura 1: *Struttura del Gb3.*

L'accumulo lisosomiale di glicosfingolipidi complessi, all'interno di numerosi tipi cellulari, causa una perturbazione dell'omeostasi cellulare, soprattutto a livello dell'endotelio vascolare. Ciò provoca manifestazioni cliniche sistemiche e complicanze di natura renale, cardiaca, cerebrovascolare o una combinazione di esse, che possono portare, intorno alla quarta o quinta decade di vita, ad una morte prematura. I primi sintomi possono manifestarsi in età diverse ed avere entità e decorsi differenti. Il sospetto di Fabry viene avanzato in base ai dati clinici, a quelli anamnestico-familiari ed infine confermato attraverso i saggi genetici ed enzimatici. Tuttavia diversi studi recenti evidenziano che in realtà la Fabry potrebbe essere più complessa di quanto sia ritenuto e forse i test diagnostici oggi in uso, potrebbero non essere sempre sufficienti per confermarne la diagnosi clinica. Probabilmente nell'insorgenza della sintomatologia potrebbero essere coinvolti anche altri fattori. Negli ultimi anni è aumentata notevolmente la conoscenza della malattia ma ulteriori studi sono necessari per arrivare ad una diagnosi certa e tempestiva. Individuare precocemente la malattia è essenziale per avviare la terapia enzimatica sostitutiva, che può contribuire a bloccare la progressione e a migliorare la qualità di vita dei pazienti.

2. LE MALATTIE LISOSOMIALI

Le enzimopatie sono malattie dovute a deficit o inadeguata produzione di enzimi, ma anche ad anomalie nella loro struttura. Possono essere suddivise in enzimopatie acquisite (in cui gli enzimi sono alterati in seguito ad una intossicazione da mercurio o da arsenico, da carenze vitaminiche, da azione dei raggi ultravioletti) ed enzimopatie congenite (che insorgono per alterazione del gene che codifica la sintesi dell'enzima). In entrambi i casi le conseguenze sono principalmente due: la prima è l'accumulo del substrato dell'enzima che può essere dannoso di per sé, o può attivare a sua volta vie metaboliche alternative con produzione di grandi quantità di metaboliti tossici; la seconda conseguenza è il deficit del prodotto (sostanza che l'enzima dovrebbe produrre), che generalmente è il substrato di una successiva reazione, oppure funge da regolatore dell'attività di enzimi che lo producono⁽¹⁾. Fra le enzimopatie vi sono le malattie lisosomiali, che sono causate dall'alterazione genetica di uno degli enzimi coinvolti nella degradazione proteica o di macrocomplessi, determinando l'accumulo del substrato non catalizzato nella maggior parte di cellule e tessuti dell'organismo. Queste malattie sono clinicamente eterogenee e in base all'enzima alterato ed alla molecola accumulata sono classificate in tre gruppi: mucopolisaccaridosi, dovute ad un difetto nella degradazione dei mucopolisaccaridi (molecole di grandi dimensioni che assolvono importanti funzioni a livello del tessuto connettivo); sfingolipidosi, caratterizzate da una incapacità nel degradare gli sfingolipidi (lipidi polari in cui lo scheletro molecolare è una molecola di sfingosina, un ammino-alcool a lunga catena insatura; sono normalmente dei componenti integrali delle membrane plasmatiche, del reticolo endoplasmatico e dell'apparato del Golgi); oligosaccaridosi, causate da un difetto nella degradazione glicoproteica e degli oligosaccaridi. Esistono, inoltre, altre malattie lisosomiali che si sviluppano in seguito a mutazioni geniche che provocano un'alterazione nel trasporto di enzimi lisosomiali o di certe molecole all'interno dei lisosomi. In generale, l'incidenza delle malattie lisosomiali è bassa sebbene, in base alle popolazioni prese in esame, questa può subire delle variazioni: per esempio, l'incidenza della malattia di Gaucher di tipo 1, che nella popolazione generale è di 1/40.000-60.000, si stima essere di 1:1.000 fra gli ebrei Ashkenazi⁽³⁾. La maggior parte di queste malattie è caratterizzata da un decorso sintomatologico progressivo e aumentata mortalità. Attualmente solo alcune enzimopatie sono curabili; i trattamenti si limitano, in genere, alla cura dei sintomi piuttosto che delle cause. È spesso usato il trapianto di midollo osseo per il trattamento di alcune malattie lisosomiali dato che le cellule ematiche normali trapiantate sono in grado di produrre gli enzimi carenti.

3. LA MALATTIA DI FABRY

3.1 CENNI STORICI

La malattia di Fabry è stata descritta per la prima volta da due dermatologi alla fine dell'800, indipendentemente l'uno dall'altro, in Germania ed Inghilterra (Figura 2).



Figura 2: a) William Anderson e la sua pubblicazione originale risalente al 1898.

b) Johannes Fabry e la sua pubblicazione originale risalente al 1898.

Nel 1898 il dermatologo tedesco Johannes 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. Fabry classificò il caso come un *angiokeratoma corporis diffusum*. Nello stesso anno ed in maniera del tutto indipendente, il dermatologo inglese William 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. Inoltre, il paziente mostrava anche una deformazione delle dita, vene varicose e linfoedema. Anderson avanzò il sospetto che il paziente non avesse semplicemente una malattia della pelle, ma presentasse una malattia sistemica. Oggi tale patologia è nota come “malattia di Anderson-Fabry”, anche se viene comunemente chiamata “malattia di Fabry”. Relazioni successive, redatte durante la prima parte del XX secolo, documentano anidrosi, acroparestesie ed effetti oculari che si presentano in associazione con la malattia. Nel 1947 Pompen e colleghi riportavano vacuoli anomali nei vasi sanguigni e sulla base di questi reperti suggerivano che si trattava di una malattia generalizzata d'accumulo.

Nel 1950 Scriba stabiliva definitivamente la natura lipidica del materiale non degradato e nel 1953 Hornbostel e Scriba furono i primi a confermare la diagnosi, tramite biopsia cutanea.

Nel 1955 viene pubblicato, su *Archives of Internal Medicine*, il primo “report” americano in cui viene utilizzato il nome di “malattia di Anderson-Fabry” per questa rara patologia metabolica. Opitz e colleghi nel 1965, hanno dimostrato che questa malattia viene trasmessa come carattere recessivo legato al cromosoma X, mentre già Wise e colleghi avevano riconosciuto, tre anni prima, il carattere ereditario della patologia. La malattia fu classificata come sfingolipidosi quando, nel 1963, Sweeley e Klionsky isolarono glicosfingolipidi neutri nei pazienti affetti da tale patologia. Nel 1967, Brady *et al.* dimostrarono che il difetto era causato dalla deficienza dell’enzima ceramidetriossidasi⁽¹⁾, una idrolasi galattosilica contenuta nei lisosomi, che nel 1970 venne rinominata “ α -galattosidasi A” da Kint⁽⁴⁾. Nel 1989 Kornreich e colleghi, adoperando tecniche di biologia molecolare, identificarono l’intera sequenza genica dell’ α -galattosidasi A⁽⁵⁾⁽⁶⁾. L’identificazione della sequenza completa dell’ α -galattosidasi A è stato il presupposto per iniziare la produzione in vitro della proteina, rendendo di conseguenza possibile la terapia enzimatica sostitutiva.

3.2 L'INCIDENZA DELLA MALATTIA

Ad oggi, l'incidenza della Fabry è stimata intorno ad 1:40.000 nati vivi. Tuttavia, recenti lavori di screening neonatale hanno evidenziato una sottostima della malattia: infatti, uno studio del 2006 effettuato in Piemonte su 37.104 neonati maschi ha mostrato una incidenza di circa 1:3.100 nati vivi. È interessante notare che gli autori hanno anche trovato un rapporto di 7:1 fra neonati recanti mutazioni causative delle varianti “*late-onset*” e neonati con mutazioni responsabili della forma classica della malattia di Fabry⁽⁷⁾. Pochi anni dopo, è stato effettuato uno studio di screening su un più alto numero di neonati maschi (171.977) in Taiwan, mostrando una incidenza molto più alta, pari a circa 1:1.250. Tale incidenza è stata così elevata per la frequenza con cui è stata trovata una mutazione (la IVS4+919G>A) responsabile di una variante cardiaca della malattia di Fabry⁽⁸⁾.

I due studi di screening finora citati sono stati condotti effettuando inizialmente soltanto saggi dell'attività dell' α -galattosidasi A e successivamente, una volta evidenziati dei valori patologici, è stato analizzato il gene GLA. Altri lavori più recenti, invece, hanno effettuato lo screening analizzando il gene GLA di tutta la popolazione in esame, evidenziando non soltanto l'incidenza della malattia, ma anche la prevalenza dei polimorfismi nel gene GLA. Per esempio, uno di questi studi, effettuato in Giappone su 21.170 neonati, ha mostrato una incidenza della malattia di 1:7.057, mentre ha evidenziato una prevalenza delle alterazioni nel gene GLA di 1:3.024⁽⁹⁾. Un altro studio di screening, effettuato nuovamente in Taiwan, è stato condotto analizzando il gene GLA di 10.499 neonati maschi e 9.564 neonati femmine, trovando mutazioni in questo gene rispettivamente in 12 maschi (1/875) e 24 femmine (1/399)⁽¹⁰⁾. Nello stesso anno, è stato pubblicato un altro studio, realizzato in Ungheria, di screening neonatale su 40.024 soggetti. Tale studio, effettuato con metodiche diagnostiche di spettrometria di massa tandem, ha mostrato una incidenza delle mutazioni causali della malattia pari a 1:13.341, mentre l'incidenza delle alterazioni polimorfiche nel gene GLA era pari a 1:5.003⁽¹¹⁾. Tutti gli studi finora riportati hanno quindi mostrato una maggiore incidenza della malattia rispetto a quella originariamente stimata. Ciò è dovuto principalmente alla sintomatologia della mF, che è sovrapponibile a quella di altre patologie come la Febbre Mediterranea Familiare⁽¹²⁾ o la Sclerosi Multipla⁽¹³⁾. Le difficoltà nel diagnosticare la malattia di Fabry vengono mostrate da studi retrospettivi in cui viene evidenziato un ritardo nella diagnosi in circa il 40% dei pazienti maschi e nel 70% delle femmine. In particolare, dall'insorgenza dei primi sintomi alla corretta diagnosi trascorrono mediamente 13 anni per gli uomini e 17 per le donne⁽¹⁴⁾. Risulta chiaro che l'errore diagnostico sia un rischio concreto

che può determinare una sottostima del reale numero dei soggetti affetti. Queste considerazioni sono riassunte in un articolo di Hoffmann e Mayatepek secondo cui la malattia di Fabry è un disordine spesso visto ma raramente diagnosticato⁽¹⁵⁾.

3.3 DIAGNOSI

Ad oggi, la conferma dell'ipotesi diagnostica della mF avviene tramite analisi enzimatica e genetica per i maschi, mentre per le femmine viene effettuato il test genetico. Infatti, il saggio dell'attività enzimatica nelle donne non ha valenza diagnostica poiché, anche in presenza di mutazioni nel gene GLA associate alla malattia, nelle femmine è possibile ottenere una attività enzimatica normale a causa del fenomeno della Lyonizzazione. Il saggio enzimatico è quindi un efficiente e potente metodo per la diagnosi dei maschi affetti da mF, poiché mostra chiaramente la deficienza dell'attività enzimatica; per le donne eterozigoti, i valori dell'attività dell' α -Gal A sono poco indicativi e quindi l'unico test con valore diagnostico rimane l'analisi genetica. Nel corso degli anni sono stati fatti diversi tentativi per prevedere il decorso clinico della malattia, corrispondente ad una determinata mutazione genica, ma ad oggi la prognosi della malattia risulta ancora estremamente difficoltosa⁽¹⁶⁾. Un ostacolo alla definizione di correlazioni genotipo/fenotipo è rappresentato dalla continua descrizione di nuove mutazioni del gene GLA, spesso associate a singoli gruppi familiari.

Anche la sede delle singole alterazioni geniche ed il tipo di sostituzione aminoacidica determinata dalle mutazioni, al momento, non costituiscono criteri orientativi per la prognosi; sono descritte, infatti, mutazioni puntiformi *missense* adiacenti, sulla medesima sequenza codificante ma corrispondenti a quadri clinici estremamente diversi. Recentemente, è stato proposto un modello sperimentare che consenta di predire, seppur non in modo preciso, se un determinato genotipo è causativo di fenotipo classico, atipico o "mild": tale modello, proposto da Lukas J *et al.*, si basa su un sistema di colture cellulari in cui viene trasfettato il gene GLA con la mutazione in esame e, dopo 60 ore, viene effettuata l'attività enzimatica *in vitro*. Tale metodica è stata saggiata su 171 mutazioni, mostrando una corrispondenza fra le manifestazioni cliniche e l'attività *in vitro* in circa l'80% delle mutazioni studiate⁽¹⁷⁾.

Il dosaggio plasmatico ed urinario del Gb3 è stato anche proposto ed utilizzato nella diagnosi biochimica della mF⁽¹⁸⁾, ma è un metodo che richiede tempo e per tale motivo difficilmente applicabile come strumento diagnostico di routine. Inoltre, le femmine affette da mF, possono avere livelli normali di Gb3 sia nel plasma che nelle urine⁽¹⁹⁾.

Sebbene la determinazione dei livelli di Gb3 nel plasma e nelle urine rimane una analisi richiesta per specifici casi, non sempre questi correlano con la severità e l'insorgenza delle manifestazioni cliniche. Evidenze recenti suggeriscono che il Lyso-Gb3 (la forma deacetilata del Gb3) sia un marcatore molto più attendibile del Gb3 tradizionale in quanto esiste una più chiara correlazione tra i livelli di Gb3 deacetilato e l'insorgenza di sintomi nei soggetti

Fabry⁽²⁰⁾. Tuttavia, recentemente è stato messo in dubbio la validità anche di questo biomarcatore, poiché si è rivelato attendibile solo nel 71,4% dei pazienti maschi e nel 66,7% delle pazienti femmine⁽¹⁷⁾. Attualmente, molti sforzi sono impiegati per trovare nuovi biomarker da utilizzare per la diagnosi della malattia.

3.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE

I sintomi clinici precoci della mF possono manifestarsi durante l'infanzia, di solito tra i 3-10 anni, ed in genere più tardivamente nelle ragazze rispetto ai ragazzi. Tra i segni precoci che si manifestano nell'infanzia, e che possono protrarsi fino all'età adulta, troviamo il coinvolgimento gastrointestinale descritto nel 30-40% dei casi.

Il dolore è uno dei primi sintomi e si può distinguere in: a) crisi episodiche ("crisi Fabry") caratterizzate da dolore intenso a carico delle estremità che si irradia agli arti e altre parti del corpo; b) dolore cronico caratterizzato da bruciore, formicolio, parestesie.

Le crisi dolorose possono essere scatenate da febbre, esercizio fisico, stress, brusche variazioni di temperatura. Quando le crisi sono innescate o accompagnate da febbre, i pazienti di solito presentano anche un aumento del tasso di sedimentazione degli eritrociti. Per tale motivo la mF può essere talvolta "misdiagnosticata" con altre condizioni patologiche tra cui artrite reumatoide, febbre reumatica, febbre mediterranea familiare, fenomeno di Raynaud, lupus eritematoso sistemico e "dolori della crescita". Il dolore può ridursi come intensità in età adulta. Per tale motivo, è importante ricercare nella storia di ogni paziente la presenza di acroparestesie durante l'infanzia⁽²¹⁾.

I soggetti Fabry possono presentare anche dolore addominale (post-prandiale), diarrea, nausea e vomito. Questi sintomi gastrointestinali possono essere legati alla deposizione di Gb3 nei gangli autonomici dell'intestino e dei vasi sanguigni mesenterici.

L'assenza di sudorazione (anidrosi) o una minore capacità di sudare (ipoidrosi) rappresentano un sintomo clinico comune tra i pazienti.

Dal punto di vista dermatologico⁽²¹⁾, la manifestazione clinica più comune è l'angiocheratoma: si tratta di aree di dimensioni variabili, di colorito viola-rossastro, tipicamente distribuite sulle natiche, inguine, ombelico e cosce, ma a volte anche su aree mucose, come il cavo orale.

Istologicamente, le lesioni cutanee sono costituite da piccoli angiomi superficiali che aumentano in numero e dimensioni con l'avanzare dell'età e che possono essere isolate oppure organizzate in gruppi. Altre manifestazioni cutanee comprendono le teleangiectasie, l'edema sottocutaneo.

Dal punto di vista oftalmologico, la mF è caratterizzata da vari segni oculari con coinvolgimento dei vasi congiuntivali e retinici, della cornea e del cristallino⁽²¹⁾ tra cui: *cornea verticillata*, cataratta sottocapsulare posteriore con aspetto "raggiato", alterazioni di decorso e tortuosità dei vasi congiuntivali e dei vasi retinici.

L'acufene può essere un sintomo precoce, così come la riduzione della soglia uditiva è stata segnalata anche in età pediatrica⁽²¹⁾. La progressiva riduzione della soglia uditiva è stata riscontrata nell'80% dei maschi e nel 77% delle femmine quando valutati con i test da stimolo. Nonostante l'assenza di una disfunzione d'organo severa, questi sintomi, da soli o in associazione, possono essere causa di limitato sviluppo psico-fisico, talvolta severo, che può compromettere l'integrazione sociale e lo svolgimento delle fisiologiche attività del soggetto. Le anomalie cardiache possono essere presenti durante l'adolescenza in entrambi i sessi ed essere di vario tipo: alterazioni di conduzione (ridotto intervallo PR, aritmie, alterata variabilità della frequenza cardiaca, insufficienza valvolare), ipertensione ortostatica e cardiopatia ipertrofica ventricolare.

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)⁽²¹⁾.

L'interessamento del microcircolo cerebrale può essere responsabile di quadri ischemici anche in età adulta. Le manifestazioni neurologiche, risultanti dalla compromissione multifocale del microcircolo cerebrale, possono includere attacchi ischemici transitori (TIA), convulsioni, parkinsonismi, ictus ischemico o emorragico. I primi danni neurologici, inoltre, sono espressione di un coinvolgimento delle fibre nervose somatiche periferiche e del sistema nervoso autonomo. L'inizio dei sintomi correlati si verifica in genere in età più precoce nei maschi che nelle femmine.

Il corso naturale della nefropatia della mF nei bambini o negli adolescenti non è ancora in gran parte compreso. Segni indicativi di un precoce danno renale includono lo sviluppo di microalbuminuria e proteinuria già nella seconda decade di vita.

Dal punto di vista istologico⁽²¹⁾, cambiamenti irreversibili a carico dei glomeruli, dei tubuli interstiziali e delle strutture vascolari possono essere osservati mediante biopsia renale talvolta prima della comparsa di microalbuminuria.

Una riduzione dell'indice di filtrazione glomerulare (GFR) è raro in età pediatrica mentre è più frequente nell'adolescenza.

Come accade nella maggior parte dei casi, la patologia renale si aggrava con l'età. Le lesioni renali sono secondarie al deposito di Gb3 in cellule endoteliali glomerulari, mesangiali, interstiziali e nei podociti⁽¹⁸⁾. L'insufficienza renale si manifesta con microalbuminuria e proteinuria a partire dalla seconda o terza decade di vita. I segni clinici di coinvolgimento delle vie respiratorie, sono rappresentati da dispnea da sforzo, tosse cronica, asma, e sono frequenti in entrambi i sessi con mF.

Le manifestazioni classiche della malattia di Fabry sono riassunte nella *tabella 1*:

Manifestazioni precoci (infanzia e adolescenza)	
1	Parestesia e acroparestesia intermittente
2	Episodi di "crisi Fabry" : dolore agonizzante, febbre, stress
3	Febbre ricorrente
4	Opacità corneal
5	Angiocheratoma
6	Dolore gastrointestinale
7	Ipidrosi o anidrosi
8	Proteinuria e alterata GFR
9	Intolleranza al caldo e al freddo
Manifestazioni tardive (età adulta)	
10	Disfunzioni renali, uremia e ipertensione
11	Disfunzioni cardiovascolari: infarto del miocardio, aritmia ipertrofia cardiaca, disfunzioni valvolari
12	Rischio elevato di infarto cerebrale
13	Complicazioni polmonari: dispnea, ostruzioni

Tabella 1: Sintomi caratteristici della forma classica della malattia di Fabry.

Mentre nella forma classica della malattia si osserva una sintomatologia sistemica, nelle varianti atipiche della mF, meno rare della forma classica, è possibile notare l'interessamento di un singolo organo. Tali forme si presentano principalmente nelle varianti cardiaca, renale e cerebrovascolare.

Le varianti atipiche hanno pochi o nessun sintomo caratteristico della forma classica della malattia, ma hanno manifestazioni confinate prevalentemente ad un organo⁽²²⁾. Ciò implica che siano spesso individuate "per caso"⁽²³⁾. A differenza della forma classica, i pazienti con

variante atipica hanno un'attività residua dell'enzima α -Gal A compresa tra il 2-20% rispetto al normale e, per questo, la sintomatologia si presenta più tardivamente (quarta-sesta decade di vita)⁽²⁴⁾.

All'interno delle varianti atipiche è stato descritto un fenotipo intermedio (varianti intermedie) in quei pazienti privi dei segni cardine di mF, soprattutto nel periodo compreso tra i 3 e i 6 anni di vita, ma che mostravano cardiomiopatia ipertrofica seguita da progressiva insufficienza renale terminale intorno ai 40 anni⁽¹⁵⁾.

3.5 LA MALATTIA DI FABRY NELLE DONNE

Fino a qualche anno fa, le femmine eterozigoti venivano considerate come "portatrici" del gene mutato e si pensava che non sviluppassero i sintomi della malattia.

In realtà, come riportato in letteratura, anche le donne eterozigoti per mutazioni a carico del gene GLA possono sviluppare un quadro clinico di tipo "mild"⁽²⁴⁾.

I segni e i sintomi clinici, che generalmente insorgono fra i 13-20 anni, variano molto nelle femmine eterozigoti. Questa eterogeneità fenotipica può essere in parte dovuta al processo di Lyonizzazione; le femmine eterozigoti costituiscono un "mosaico" di cellule normali e mutate in proporzioni variabili⁽²⁵⁾.

Nelle malattie genetiche *X-linked*, le femmine eterozigoti possono essere sintomatiche, probabilmente come conseguenza della inattivazione non casuale del cromosoma X, che si traduce in una più alta percentuale di espressione in un determinato tessuto del cromosoma X che porta il gene mutato^(26,27).

Nel caso della malattia di Fabry, generalmente, le femmine eterozigoti possono sviluppare danno d'organo a carico di cuore, cervello o reni (seppur più lentamente rispetto ai maschi)⁽²⁸⁾.

Solo occasionalmente sono stati osservati fenotipi "classici" di tipo severo come nei maschi⁽²⁹⁾. Possono manifestarsi sintomi come dolore, ipertensione ortostatica, angiocheratoma, anomalie oculari, coinvolgimento cocleare (e quindi riduzione della soglia uditiva), sintomi gastrointestinali e coinvolgimento delle vie respiratorie.

3.6 GENETICA DELLA MALATTIA DI FABRY

La mF è trasmessa come carattere legato al cromosoma X; essa è caratterizzata dal deficit dell'enzima lisosomiale α -galattosidasi A, codificato dal gene GLA (Xq22)⁽³⁰⁾, il quale è costituito da sette esoni distribuiti su 12.436 paia di basi⁽⁶⁾. La mF può essere causata da una varietà di mutazioni nel gene GLA, la maggior parte delle quali rendono l'enzima non funzionante⁽³¹⁾. Ad oggi, sono state identificate più di 770 mutazioni esoniche nel gene GLA associate a malattia di Fabry (HGMD® <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GLA>). Circa il 75% delle alterazioni geniche determinanti la mF è costituito da mutazioni puntiformi *nonsense* o *missense*.

Sono stati descritti anche ampi riarrangiamenti, piccole inserzioni o delezioni, difetti del processo di *splicing*, o a carico del codone di stop, doppie mutazioni associate alla malattia.

Le varianti atipiche del fenotipo emizigote, oligosintomatiche, sono in prevalenza associate a mutazioni puntiformi *missense* che esprimono un'attività residua dell' α -galattosidasi A⁽³²⁾.

Studi recenti hanno dimostrato, inoltre, che la riduzione dell'attività enzimatica può essere determinata da mutazioni che non incidono direttamente sull'attività stessa ma sono coinvolte nel mantenimento della stabilità strutturale dell'enzima⁽³³⁾. 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⁽³³⁾, per mettere in evidenza che la scorretta struttura può essere patogeneticamente significativa nei quadri clinici della malattia (Figura 3).

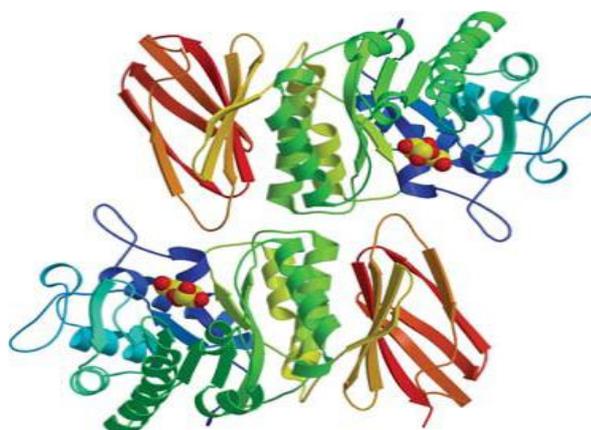


Figura 3: Struttura conformazionale della proteina enzimatica.

Alterazioni nella regione 5' non tradotta

Sono state anche descritte alterazioni nella regione 5' non tradotta nel gene GLA che tuttavia, ad oggi, non sono state associate alla malattia di Fabry, pur essendo state identificate in soggetti con una sintomatologia riconducibile alla mF. Fra queste, tre polimorfismi a singolo nucleotide sono stati trovati nella regione 5' non tradotta (UTR) dell'esone 1 del gene GLA. Questi polimorfismi (indicati come -30G>A, -12C>T e -10C>T, che quindi ricadono a monte del codone d'inizio della traduzione) sono stati localizzati all'interno di una ipotetica sequenza riconosciuta da una proteina capace di legare il DNA (la "MDBP")⁽³⁴⁾. I trascritti contenenti questi polimorfismi non sono tradotti, per cui sono stati inizialmente considerati come varianti molecolari neutrali⁽³⁵⁾. Questa supposizione teorica era, però, messa in discussione dalla dimostrazione che gli emizigoti recanti l'alterazione -30G>A avevano un'incrementata attività dell' α -Gal tre volte maggiore del normale^(36,37). Inoltre, un recente studio effettuato su una famiglia portoghese ha messo in evidenza che il polimorfismo -10C>T era associato ad una ridotta espressione dell' α -Gal, ipotizzando una minore trascrizione del gene GLA e/o traduzione del messaggero⁽³⁸⁾. Tuttavia, dal momento che queste alterazioni introniche si ritrovano anche in soggetti sani, il significato di tali mutazioni rimane dubbio.

3.7 TERAPIA

La terapia sintomatica della mF si avvale dell'impiego di farmaci volti a controllare le crisi dolorose. Se indicata la terapia farmacologica aspecifica (antiaggreganti, anticoagulanti, antipertensivi, statine), va proseguita anche quando si fa ricorso alla terapia enzimatica sostitutiva^(39,40). Quest'ultima prevede la somministrazione endovenosa ogni due settimane dell'enzima carente.

Gli studi riportati in letteratura hanno dimostrato l'efficacia della terapia enzimatica nel rallentare la progressione del danno renale e cardiaco e nel migliorare i sintomi legati al coinvolgimento del sistema nervoso periferico⁽⁴¹⁾. In genere ben tollerata, è stato dimostrato che la terapia enzimatica determina un miglioramento significativo della qualità di vita dei pazienti dopo circa 1-2 anni dall'avvio della terapia con agalsidasi A⁽⁴²⁾(Tabella 2).

Organ/system	Assessment	Guidelines
General	General status, quality of life (SF36® Health survey, EuroQOL or PedsQL® measurement mode), school or work performance, depression, anxiety, drug use, somatic growth	Baseline (at first visit), every 12 months
	Complete physical examination	Baseline, every 12 months
	Genetic counseling	Baseline, on request
	Alpha-galactosidase A activity and genotype	If not previously performed or determined
Kidney	Serum creatinine, ionogram, BUN; morning spot urine for urinary protein/creatinine ratio and albumin/creatinine ratio	Baseline. Every 3 months if CKD stage 1 or 2 and >1 g/day of proteinuria or CKD stage 4
	Urinary Gb ₃ (optional)	Every 6 months if CKD stage 3 Every 12 months if CKD stage 1 or 2 and <1 g/day of proteinuria
Cardiac	Palpitations, angina	Baseline, every 6 months
	Blood pressure, rhythm	Every evaluation visit
	ECG, echocardiography 2-D with Doppler	Baseline, every 12 months
	Holter monitoring	If an arrhythmia is suspected or palpitations are present
	Cardiac MRI	Every other year
Neurologic	Coronary angiography	If clinical signs of angina
	Acroparesthesias, fatigue, fever, heat and cold tolerance, stroke-related symptoms, TIA	Baseline, every 12 months
	Neurologic examination, questionnaires (Brief Pain Inventory)	Baseline, every 12 months
	Brain MRI without contrast	Baseline At time of a TIA or stroke event In females to document CNS involvement Every 3 years
	Magnetic resonance angiography	If cerebral vasculopathy should be excluded
ENT	Comorbid stroke risk factors: Cholesterol (Total, LDL, HDL), triglycerides, Lpa, total plasma homocysteine	Baseline, every 12-24 months
	Tinnitus, hearing loss, vertigo, dizziness	Baseline, every 6 months
Ophthalmologic	Audiometry, tympanometry, otoacoustic emissions	Baseline, every 12 months thereafter
	General ophthalmologic exam (slit-lamp, direct ophthalmoscopy, best corrected visual acuity, visual fields)	Baseline, every 12-24 months
Pulmonology	Cough, exertional dyspnea, wheezing, exercise intolerance	Baseline, every 12 months
	Spirometry	If clinical signs
Gastrointestinal	Postprandial abdominal pain, bloating, diarrhea, nausea, vomiting, early satiety, difficulty gaining weight	Baseline, every 12 months
	Endoscopic evaluations	If symptoms persist or worsen despite treatment
Skeletal	Bone mineral density, 25(OH) vitamin D levels	Baseline

Tabella 2: Trattamento della malattia di Fabry “multi-organo”.

Quest'ultima prevede la somministrazione endovenosa ogni due settimane dell'enzima carente. Gli studi riportati in letteratura hanno dimostrato l'efficacia della terapia enzimatica nel rallentare la progressione del danno renale e cardiaco e nel migliorare i sintomi legati al coinvolgimento del sistema nervoso periferico⁽⁴¹⁾. In genere ben tollerata, è stato dimostrato che la terapia enzimatica determina un miglioramento significativo della qualità di vita dei pazienti dopo circa 1-2 anni dall'avvio della terapia con agalsidasi A⁽⁴²⁾.

4. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Dal 2005, nei laboratori di Biotecnologie Applicate alle Scienze Mediche dell'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, il gruppo di ricerca guidato dal Prof. Giovanni Duro si dedica allo studio delle alterazioni enzimatiche e genetiche nella malattia di Fabry. Nell'arco di questi dieci anni, sono stati studiati più di 9700 pazienti con sospetto clinico di mF. Nel 2% dei pazienti analizzati sono state riscontrate mutazioni esoniche in GLA, confermando la diagnosi avanzata dal medico. Il restante 98% dei pazienti studiati non ha ancora ricevuto alcuna diagnosi, nonostante la sintomatologia fortemente riconducibile alla malattia. Oggi siamo consapevoli che la malattia di Fabry potrebbe essere una patologia più complessa di quanto sia ritenuto e forse i test diagnostici oggi in uso potrebbero non essere sempre sufficienti per confermare la diagnosi clinica di Fabry.

L'obiettivo del mio studio è stato quello di identificare nuovi biomarker diagnostici e prognostici per la malattia di Fabry. In particolare nello 0,4% dei pazienti da noi studiati, è stata identificata la mutazione S126G il cui ruolo patogenetico non è ad oggi chiaro. Per questi soggetti, in cui le analisi genetiche ed enzimatiche non sono sufficienti per fornire una risposta diagnostica, è necessario trovare nuovi strumenti che consentano un loro inquadramento clinico univoco.

Ho condotto esperimenti pilota di miRNA profiling, con l'obiettivo di identificare un profilo di espressione di microRNA circolanti specifico per i pazienti affetti da malattia di Fabry. Tale pannello, identificato con finalità diagnostiche, è stato poi utilizzato per analizzare i pazienti non ancora inquadrati clinicamente, cioè quei pazienti con una sintomatologia fortemente riconducibile alla Fabry e con la mutazione dubbia S126G o recanti esclusivamente alterazioni introniche nel gene GLA. In più, sotto la supervisione del Prof. Arndt Rolfs, presso l'*Albrecht-Kossel Institute* situato a Rostock (Germania), dove ho svolto un periodo del mio dottorato, ho effettuato dei saggi di attività enzimatica *in vitro* secondo il metodo recentemente pubblicato dal gruppo con cui ho collaborato⁽¹⁷⁾. Con tale saggio è possibile predire il fenotipo di una specifica mutazione, rendendo questa metodica un importante strumento prognostico.

5. MicroRNA

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccole molecole di RNA (19-22 nucleotidi) non codificanti, che regolano post-trascrizionalmente l'espressione genica. I miRNA vengono inizialmente trascritti come precursori di RNA a doppio filamento lunghi 90-100 nucleotidi. Le sequenze di DNA da cui si originano possono trovarsi negli introni di altri geni o pseudogeni, oppure in un proprio contesto privo di altri geni. Il primo precursore del miRNA maturo è il trascritto miRNA primario o pri-miRNA, a cui viene aggiunta la coda poli-A al 3' ed il Cap al 5'. Questo pri-miRNA forma una struttura stem-and-loop, che viene riconosciuta e processata da parte di un complesso, chiamato Rnasi III, costituito da Drosha e da DGCR8 (o Pasha in Drosophila), formando così il secondo precursore del miRNA maturo, il pre-miRNA, lungo circa 70 nucleotidi. Questo pre-miRNA viene riconosciuto da una esportina 5 che consentirà, attraverso un processo RAN-GTP dipendente, il trasporto del pre-miRNA nel citosol in cui verrà ulteriormente processato da una endonucleasi RNasi III, chiamata Dicer, per formare il doppio filamento maturo di 19-22 nucleotidi. Il duplex di RNA viene legato da un complesso proteico contenente una proteina Argonauta, AGO2, che, grazie ai suoi coattivatori TRBP e PACT, potrà denaturare il duplex di RNA ed allontanare il filamento senso del miRNA. A questo punto, il complesso, noto come miRNP o miRISC, in cui è presente il miRNA "maturo" (cioè il filamento anti-senso), potrà andare a legare i suoi target, regolandone l'espressione genica⁽⁴³⁾. I target dei miRNA sono messaggeri (mRNA), che una volta legati dai miRNA, non saranno più disponibili per la traduzione. Il complesso miRNA-RISC è guidato su specifiche sequenze target nei mRNA. Il riconoscimento iniziale dei mRNA, da parte del complesso miRNA-RISC, è guidato principalmente da appaiamenti di base di Watson e Crick fra una piccola regione particolare, chiamata "*seed region*", localizzata nell'estemità 5' del miRNA maturo, con specifiche sequenze target dei mRNA, principalmente localizzate nella regione 3'UTR⁽⁴⁴⁾. Ci sono altre caratteristiche al di fuori di questa *seed region*: infatti la sequenza di complementarità ai nucleotidi 13-16 del miRNA, può aumentare l'affinità o compensare un incompleto appaiamento della *seed region* con la sua sequenza target. Inoltre, appaiamenti deboli G:U non sono favorevoli per la regolazione da parte dei miRNA⁽⁴⁵⁾. Numerosi sono i miRNA trovati in specie di piante e animali, con ruoli regolativi che riguardano tutti gli aspetti della biologia. Nelle piante, però, i miRNA sono spesso totalmente complementari ai loro mRNA target e promuovono il taglio e la degradazione dell'mRNA. I miRNA animali, invece, esibiscono tipicamente solo una parziale complementarità di sequenza con i loro mRNA target: in questo modo uno specifico

microRNA può avere molti mRNA target e diversi studi suggeriscono che essi promuovono la repressione della traduzione piuttosto che il clivaggio del mRNA.

La regolazione microRNA-mediata, è una componente chiave in un ampio spazio di processi biologici come, il mantenimento delle cellule staminali, sviluppo della coordinazione, metabolismo, interazione virus-ospite, apoptosi, proliferazione di muscoli cardiaci e scheletrici, biosintesi degli ormoni, secrezione, espressione genica neurale. Una loro mancata regolazione porta ad una alterazione dell'espressione genica e, ad oggi, la deregolazione di molti miRNA è stata associata a diverse patologie, fra cui il cancro⁽⁴⁶⁾.

I microRNA nel plasma

Oggi è noto che diversi miRNA vengono rilasciati nel plasma, fungendo da molecole segnale. I miRNA possono trovarsi all'interno di macrocomplessi chiamati esosomi, o complessati a proteine, oppure liberi nel plasma⁽⁴⁷⁾. Questi miRNA circolanti sono stabili nel plasma e la tipologia e la quantità di miRNA circolanti viene comunemente indicata con il termine "profilo di espressione". È stato visto che il profilo di espressione dei microRNA circolanti può variare a seconda lo stato patologico di un individuo. Ad oggi, diversi studi sono stati compiuti riguardo l'espressione dei microRNA circolanti in soggetti non sani: sono stati analizzati profili di espressione di microRNA in soggetti con cancro umano alla prostata⁽⁴⁸⁾; in un altro lavoro, sono stati studiati i profili di espressione di microRNA circolanti in soggetti affetti da virus dell'epatite C associato a carcinoma epatocellulare⁽⁴⁹⁾; in un altro studio, sono stati analizzati i profili di espressione di microRNA circolanti in soggetti affetti da cirrosi biliare primaria⁽⁵⁰⁾. Da questi e diversi altri lavori riportati in letteratura, si evince come i profili di espressione di microRNA circolanti possono variare a seconda se un soggetto è affetto da una patologia o meno.

Attualmente si tende ad identificare i profili di espressione dei miRNA circolanti di specifiche singole patologie, per poter utilizzare questi miRNA come possibili biomarker diagnostici, in modo da avere un test sia diagnostico che prognostico per ogni determinata malattia.

6. MATERIALI E METODI

6.1 ANALISI ENZIMATICA (Dried Blood Spot Test)

L' α -galattosidasi A è un enzima che nell'organismo umano, tramite una reazione di idrolisi, distacca una molecola di galattosio da sfingolipidi complessi. Per misurarne l'attività è stato utilizzato come substrato il 4-Methylumbelliferil-Galactopiranoside che, una volta idrolizzato dall'enzima, libera un composto chiamato 4-methylumbelliferone (4-MU), la cui presenza è rilevabile attraverso una lettura spettrofluorimetrica (Figura 4).

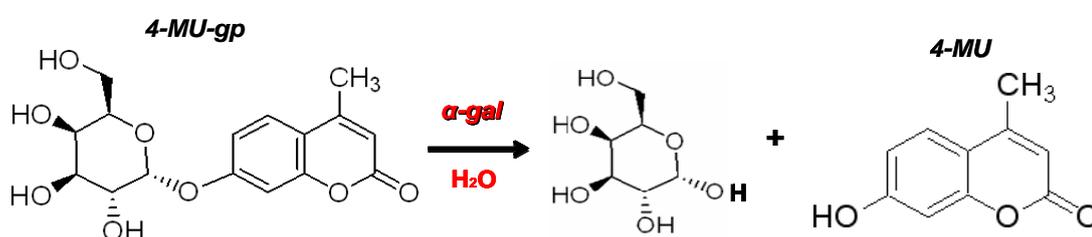


Figura 4: L' α -galattosidasi A catalizza la liberazione della molecola fluorescente 4-metil-umbelliferone.

Il saggio enzimatico con cui si misura l'attività enzimatica viene chiamato "Dried Blood Spot test" (DBS), ed è stato descritto da Chamoles e colleghi⁽⁵¹⁾, ulteriormente modificato da Poepl e colleghi⁽⁵²⁾. Il termine "Dried Blood spot test" deriva dall'impiego di dischetti di carta assorbente (6 mm di diametro); nel nostro caso viene utilizzata della carta Whatman 113, da 90 mm di spessore, sulla quale vengono caricati 5.5 μ l di sangue periferico, in grado di imbibire tutto il dischetto, senza però saturarlo. Tali dischetti offrono minore fondo per la lettura spettrofluorimetrica. Una volta fatto asciugare il sangue (per almeno 8 ore), si procede ad effettuare la reazione chimica: i dischetti imbibiti di sangue vengono posti all'interno dei pozzetti di piastre (96 well) specifiche per fluorimetria (totalmente nere, per evitare il propagarsi della luce di emissione). Per ogni dischetto si dispensano 20 μ l della soluzione contenente N-acetil D-galattosammina 0,25 M in tampone citrato 0,15 M pH 4.4. 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. L'inibizione dell'isoforma B dell'enzima α -galattosidasi (che

interferirebbe nella reazione) è di fondamentale importanza per un'obiettiva ed accurata analisi dell'attività enzimatica dell'isoforma A.

Inoltre, per ogni campione si fa un'ulteriore reazione in cui viene aggiunta una molecola chiamata "1-Deoxynojirimycin hydrochloride" (DGJ) 0,15 nmol/l, contenuto nei 20 µl in cui avevamo disciolto l'N-acetil D-galattosammina . Il DGJ è in grado di inibire, se presente in elevata concentrazione, l'attività dell'isoforma A dell'α-galattosidasi. In questa maniera, avremo una mix, in cui sono presenti gli inibitori di entrambe le isoforme, che utilizzeremo per rilevare il rumore di fondo della reazione. Tale rumore verrà utilizzato per il calcolo finale dell'attività enzimatica. Si aggiungono poi 50 µl della soluzione contenente il substrato 4-Methylumbelliferyl-α-D-galattopiranoside 5mM in tampone citrato 0,15 M pH 4.4, preventivamente filtrata (filtro per siringhe Whatman, dimensione del poro: 0,45 µm; diametro: 25mm); i campioni vengono incubati per circa 16 ore in un termostato oscillante a 37 °C. Una volta terminata l'incubazione, la reazione viene bloccata aggiungendo 250 µl del tampone basico Etilendiamine 0,1 M a pH 11.4. Si procede quindi alla lettura spettrofluorimetrica, che fornirà un valore d'emissione proporzionale alla quantità di prodotto liberato (4-MU) e dunque dell'attività enzimatica del campione. I valori di fluorescenza verranno paragonati con quelli della curva standard di calibrazione. Questa curva permette il confronto con il valore di emissione del campione, in modo da ottenere le nanomoli di prodotto liberato. È importante sottolineare che, per ogni piastra, viene costruita una curva standard con dei campioni contenenti una quantità nota di 4-MU (2 nanomoli, 500 picomoli, 125 picomoli e 0 moli) contenuti in un volume finale di 320 µl (formato da 70 µl di tampone citrato 0,15 M pH 4.4 e 250 µl del tampone basico Etilendiamine 0,1 M a pH 11.4). Inoltre, il saggio è sempre condotto in doppio, e, in ogni piastra, viene effettuata l'analisi su due soggetti controllo sani, per valutare la bontà della reazione realizzata. Il risultato ottenuto sarà inizialmente in picomoli/16 h/ 5,5µl. Dividendo per 16 (in modo da avere la fluorescenza nell'unità di tempo) e per 0,0055 (per avere l'attività in 1 ml di sangue), avrò l'attività in nmol/h/ml.

6.2 ANALISI BIOMOLECOLARE

L'analisi biomolecolare prevede l'estrazione del DNA genomico da sangue periferico, la successiva amplificazione dei sette esoni che compongono il gene GLA e le loro regioni introniche fiancheggianti, il sequenziamento dei singoli amplificati e l'analisi della sequenza.

Estrazione del DNA

Il DNA dei pazienti è stato estratto da sangue intero attraverso un kit di estrazione da colonna (GenElute Blood Genomic DNA Kit, Miniprep, Sigma-Aldrich, USA) che sfrutta il principio della cromatografia a scambio ionico. La prima tappa di questo kit di estrazione consiste nella preparazione dei campioni, ovvero 200 µl di ciascun campione di sangue intero è stato posto in un eppendorf in cui sono stati anche aggiunti 20 µl di soluzione contenente proteinasi K. Nella tappa successiva, sono stati aggiunti 200 µl di lysis solution, per far sì che avvenisse la lisi delle cellule, quindi il campione è stato incubato a 55°C per 10 minuti. Successivamente, ho attuato la preparazione delle colonnine, ovvero l'aggiunta di 500µl della soluzione di preparazione ad ogni colonnina pre-assemblata; quest'ultima, è stata centrifugata a 12000 g per 1 minuto. Al lisato ottenuto dalla lisi cellulare, sono stati addizionati 200 µl di EtOH 95%, vortexando per 5-10 minuti in modo da ottenere una soluzione omogenea. In seguito, l'intero contenuto del tubo è stato trasferito nella colonna trattata in precedenza, che quindi è stata centrifugata a 6600 g per 1 minuto e scartato il collection tube contenente il liquido residuo e la colonnina è stata posta in un altro tubo di raccolta. A questo punto, sono stati effettuati due lavaggi: nel primo lavaggio, sono stati aggiunti 500 µl di pre-wash alla colonna; nel secondo lavaggio, sono stati addizionati 500 µl di wash solution. Una volta aggiunti 250 µl di elution buffer, i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente e poi centrifugati per ottenere il DNA eluito di ogni campione. L'effettiva riuscita dell'estrazione è stata verificata su gel d'agarosio.

PCR del gene GLA dal DNA estratto

Una volta estratto il DNA dal sangue periferico dei pazienti, ho effettuato delle PCR utilizzando una Taq polimerasi dotata di elevata processività e fedeltà di incorporazione. Le PCR sono state effettuate in modo da amplificare sia i sette esoni del gene GLA, sia le porzioni introniche fiancheggianti. Inoltre, ho anche amplificato una porzione centrale

dell'introne 4 poiché in tale regione sono state trovate mutazioni associate ad una variante cardiaca del gene GLA.

I primer utilizzati per le reazioni di PCR, da me accuratamente disegnati, sono stati i seguenti (Figura 5):

<u>ESONE 1 - 254 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 1 Forward	AGG GCG GGT CAA TAT CAA GAA AG	posto 132 basi a monte
ex 1 Reverse	CGT TGA GAC TCT CCA GTT CC	posto 58 basi a valle
		Amplicone 487 bp
<u>ESONE 2 - 175 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 2 Forward	AGG TGC CTA ATA AAT GGG AGG TAC	posto 50 basi a monte
ex 2 Reverse	GTG CTT ACA GTC CTC TGA ATG AAC	posto 23 basi a valle
		Amplicone 296 bp
<u>ESONE 3 - 178 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 3 Forward	GGA TGA TTT TGG GGG TTT GTG G	posto 125 basi a monte
ex 3 Reverse	TCA GCT ACC ATG GCC TCA AAG TTC	posto 38 basi a valle
		Amplicone 386 bp
<u>ESONE 4 - 92 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 4 Forward	GGA TGA CAG ACT GAA CCC CAT CTC	posto 97 basi a monte
ex 4 Reverse	GGA GAC CTT GGT TTC CTT TGT TGT C	posto 51 basi a valle
		Amplicone 289 bp
<u>ESONE 5 - 162 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 5 Forward	GGT TTA GAC CTC CTT ATG GAG A	posto 120 basi a monte
ex 5 Reverse	CTT GAA TGT CAA AAT AGG AAA CAA	posto 42basi a valle
		Amplicone 370 bp
<u>ESONE 6 - 198 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 6 Forward	GGA GGA GGC TTT ATG TGA GAG T	posto 107basi a monte
ex 6 Reverse	AGG CCC AAG ACA AAG TTG GTA T	posto 41 basi a valle
		Amplicone 390 bp
<u>ESONE 7 - 291 bp</u>		
primer utilizzati per il sequenziamento		
ex 7 Forward	TAC AAG TGC TTG ATA GTT CTG	posto 77basi a monte
ex 7 Reverse	CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG C	posto 82 basi a valle
		Amplicone 493 bp

Figura 5: Primers utilizzati per l'amplificazione dei sette esoni del gene GLA.

Protocollo di PCR

Si procede con la preparazione della mix di reazione, che dovrà contenere tutti gli elementi necessari alla reazione d'amplificazione, ossia il buffer apposito per la Taq, i primers Forward e Reverse, i deossinucleotidi che devono essere incorporati dalla polimerasi e il DNA stampo. Inoltre, aggiungiamo anche un volume di 2 µl di cloruro di magnesio perché, pur essendo già presente nella Master Mix (ad una concentrazione finale pari a 1,5mM), ne aumenta

l'efficienza di reazione della PCR (precedentemente messa a punto). La concentrazione di magnesio finale è uguale a 3,5mM.

Considerando 25 µl come volume finale di una singola reazione, la mix è la seguente:

Mix 1x (V_f 25 µl)

Master Mix 2x *	12,5 µl
MgCl₂ [25mM]	2,5 µl
Primer F (0.25 µM)	2,5 µl
Primer R (0.25 µM)	2,5 µl
H₂O	2 µl
DNA stampo (0,04 µg/µl)	3 µl

* Taq (0.05U/ µl); MgCl₂ (1,5 mM); dNTP (0.4mM x1)

Le provette contenenti il DNA genomico e la soluzione di reazione sono poi inserite all'interno del termociclatore, settato con uno specifico programma che in questo caso prevede un primo step a 95°C per 5 minuti e 35 cicli di amplificazione, ognuno dei quali caratterizzato da una fase di: 30 secondi a 95°C per la denaturazione dello stampo, una fase di appaiamento dei primers della durata di 30 secondi alla temperatura di 58°C e un'ultima fase di 30 secondi a 72°C per l'estensione effettuata dalla Taq polimerasi, più un ciclo di 10 minuti a 72°C per il completamento della molecola. L'intero processo di amplificazione dura circa due ore, al termine delle quali è stata verificata l'avvenuta amplificazione tramite gel elettroforetico (Figura 6).

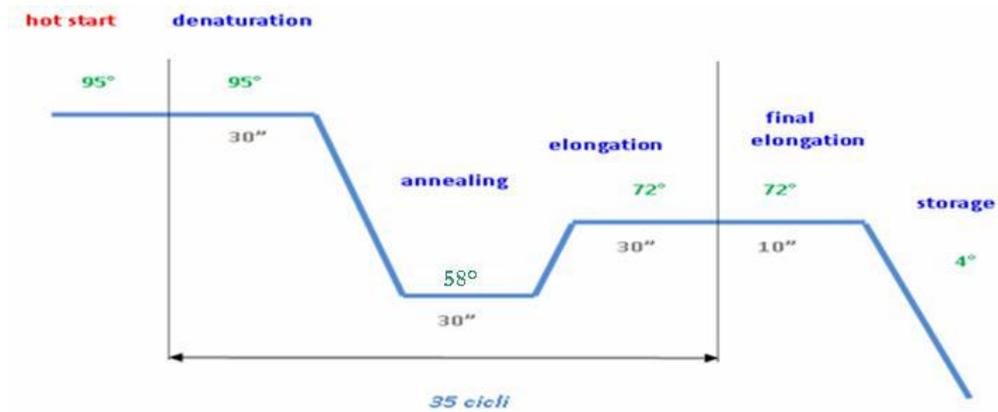


Figura 6: Rappresentazione grafica del programma adatto all'amplificazione della porzione in esame. Sono indicati gli steps di ogni ciclo con temperatura e durata.

Analisi delle Sequenze

Una volta effettuata la PCR per le porzioni di interesse del gene GLA e successivamente verificate sul gel, gli amplificati sono stati da me preparati per il sequenziamento. Questa metodica è stata realizzata *in service* da BMR Genomics (Padova, Italia). I risultati del sequenziamento vengono forniti tramite elettroferogramma, la cui analisi è stata da me effettuata tramite il software LI-COR AllignIR.

6.3 ANALISI DI *microRNA PROFILING*

Raccolta dei campioni di plasma

Per ottenere il plasma, il sangue di ciascun paziente, prelevato in provette contenenti EDTA, è stato conservato a 4°C e lasciato sedimentare per almeno 1 ora e massimo 3 ore immediatamente dopo il prelievo. Trascorso questo arco di tempo, è stata prelevata la fase superiore dal sangue sedimentato, e trasferita in eppendorf. Subito dopo, i campioni sono stati centrifugati a 1.900 g (rcf) per 10 minuti a 4°C. Per ciascun campione è stata trasferita la fase acquosa di colore gialla (il plasma) in nuovo eppendorf. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 16.000 g (rcf) per 10 minuti a 4°C. In seguito, il surnatante di ogni campione è stato trasferito in un nuovo tubo eppendorf. Il plasma così ottenuto, è stato conservato a -80°C.

Analisi delle miRNA circolanti

Gli esperimenti di *miRNA profiling* sono stati effettuati *in service* nei laboratori della Diatech Labline (Jesi, AN, Italia) dal personale specializzato. In particolare, loro hanno estratto i microRNA circolanti dai campioni di plasma da noi inviati, e successivamente hanno effettuato gli esperimenti *miRNA profiling* utilizzando la tecnologia nCounter ideata dall'azienda Nanostring (Seattle, WA, USA). Tale tecnologia si basa su sonde capaci di legare i microRNA del campione in analisi. Ogni sonda è stata disegnata in modo da appaiarsi specificatamente ad un microRNA. Le sonde sono marcate con sei diversi fluorofori, ed il tipo e la combinazione di tali fluorofori che verrà rilevata dallo strumento permetterà di identificare una sonda specifica e, quindi, a che tipo di miRNA si è ibridata. Il vantaggio di tale metodica consiste nella capacità dello strumento di contare le effettive molecole presenti nel campione in analisi senza che vi sia la necessità di una amplificazione, come invece è necessario nelle classiche metodiche basate sulla real-time PCR.

I risultati sono stati da noi studiati.

6.4 ATTIVITÀ ENZIMATICA *IN VITRO*

Questi esperimenti sono stati da me realizzati presso l'*Albert-Kossel Institute for the Neuroregeneration* situato a Rostock (Germania), i cui risultati sono stati recentemente pubblicati sulla rivista *Human mutation*⁽⁵³⁾. La metodica qui descritta consente di conoscere, per una data mutazione, l'attività enzimatica *in vitro* con cui è possibile predire la severità del fenotipo.

Il procedimento prevede dapprima una tappa di mutagenesi per ottenere il gene GLA con la mutazione in esame (e verifica dell'avvenuta reazione), una tappa di trasfezione del vettore contenente il gene GLA mutato in cellule umane, ed infine una tappa di estrazione delle proteine e successivo saggio enzimatico.

Mutagenesi sito-diretta del gene GLA clonato in un vettore di espressione eucariotico

Gli esperimenti di mutagenesi sito-diretta sono stati fatti utilizzando il "Q5 site-directed Mutagenesis kit" (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), secondo il protocollo del produttore.

In particolare, il kit prevede una tappa di PCR per avere la mutazione in un gene precedentemente clonato in un plasmide. Il plasmide in questione è il vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1/V5-His6 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in cui è stato clonato il cDNA di GLA *wild-type*. I primer utilizzati per la reazione sono stati accuratamente disegnati in modo da introdurre la mutazione e, per fare ciò, è stato utilizzato un software online ideato dalla stessa azienda che ha prodotto il kit di mutagenesi. Il software è il "NEBasechanger" (<http://nebasechanger.neb.com/>).

La reazione di mutagenesi, effettuata in un volume finale di 25 µl, è stata fatta nel seguente modo:

Mix 1x (V_f 25 µl)**Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master mix: 12,5 µl****10 µM di Primer Forward: 1,25 µl****10 µM di Primer Reverse: 1,25 µl****DNA stampo (1-25 ng/µl): 1 µl****H₂O: 9 µl**

A questo punto, la mix viene messa nel termociclatore in cui è stato impostato il seguente programma: una denaturazione iniziale a 98°C per 30 secondi; 25 cicli in cui ogni ciclo vi è un primo step da 98°C per 10 secondi, un fase di annealing da 55°C per 30 secondi, uno step di allungamento a 72°C per 4 minuti; infine, la temperatura viene portata a 72°C per 2 minuti. A questo punto, verrà fatta una reazione in cui avviene contestualmente la digestione con DPNI e ligasi, in modo da inserire i prodotti di PCR nei plasmidi contenuti nella mix. In particolare, i reagenti per tale reazione sono contenuti nel kit per la mutagenesi sito-diretta e la mix è stata realizzata secondo il protocollo del produttore:

Mix 1X (V_f = 10 µl)**Buffer di reazione KLD 2X: 5 µl****Mix di enzima KLD 10X: 1 µl****Prodotto di PCR: 1 µl****H₂O: 3 µl**

Incubare la mix per 15 minuti a temperatura ambiente, e procedere alla trasformazione di batteri competenti con i plasmidi contenuti nella reazione appena effettuata.

Trasformazione dei batteri competenti

Questa trasformazione è stata realizzata in modo che le colonie ottenute a fine protocollo siano ben separate da loro e che tutte provengano dalla proliferazione di un solo batterio (e che quindi tutti i batteri di una colonia abbiano lo stesso plasmide). Per questo protocollo sono stati utilizzati dei particolari batteri competenti ad alta efficienza (“NEB 5-alpha Competent *E.coli*”) che erano inclusi nel “Q5 site-directed Mutagenesis kit”. Il protocollo di trasformazione utilizzato è stato quello fornito dal produttore. In particolare, a 50 µl contenenti questo ceppo batterico è stato aggiunto 5 µl della mix di digestione/ligasi ottenuta nelle fasi precedenti. Dopo aver mescolato gentilmente, si pone tutta la soluzione in ghiaccio per 30 minuti. Una volta terminati, si procede ad una fase di heat-shock ponendo le cellule batteriche a 42°C per 30 secondi. Successivamente, riporre la soluzione in ghiaccio per 5 minuti, aggiungere 950 µl di “SOC outgrowth medium” (fornito dal kit) ed incubare a 37°C in agitazione (250 rpm) per 1 ora. Allo scadere di tale periodo, mescolare gentilmente l’epENDORF contenente la soluzione con i batteri e piastrarne 50-100 µl in una capsula di Petri contenente bottom agar in cui era stato aggiunta l’ampicillina (per selezionare i batteri trasformati). Infine, incubare queste piastre over-night a 37°C e controllare il giorno dopo l’avvenuta crescita dei batteri trasformati.

Minipreparazione dei plasmidi dai batteri competenti

Una volta ottenuti i batteri trasformati, bisogna sequenziare i plasmidi contenuti in tali ceppi per verificare se è presente cDNA di GLA con la mutazione desiderata. Quindi, per prima cosa, bisogna estrarre i plasmidi dai batteri precedentemente trasformati per poi sequenziarli. È importante sottolineare che i batteri da cui estraggo il plasmide provengono dalla stessa colonia e che quindi abbiano tutti quanti lo stesso plasmide.

L’estrazione è stata effettuata con il “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research corporation, Irvine, CA, USA) secondo il protocollo del produttore.

In particolare, una colonia di batteri contenenti il plasmide viene trasferita nel brodo di coltura (LB) in cui sono stati precedentemente aggiunti 3 µl di ampicillina. Il brodo contenente questi batteri viene incubato *over-night* a 37°C in uno shaker. Il giorno dopo, prendo 1,5 ml di questo brodo e, dopo averlo trasferito in un eppendorf, lo centrifugo per 30 secondi a velocità massima e successivamente scarto il surnatante. Ripeto quest'ultimo passaggio per poter avere quante più cellule da cui prelevare il plasmide e risospendo il pellet di batteri con 600 µl di H₂O sterile. A questo punto, aggiungo 100 µl di "7X Lysis Buffer", mescolo per inversione 4-6 volte ed aggiungo altri 350 µl di Neutralization Buffer. Dopo aver mescolato per inversione, centrifugo tutta la soluzione a 11.000-16.000 gravità per 2 – 4 minuti. Successivamente, trasferisco 900 µl di surnatante nelle colonnine del kit ("Zymo-Spin IIN Columns") e ricentrifugo per 15 secondi a velocità massima. Le fasi successive sono quelle in cui avviene il lavaggio delle colonnine: il primo step prevede l'aggiunta di 200 µl di "Endo-Wash Buffer" e una centrifugazione a massima velocità per 30 secondi; nel secondo step, la colonnina viene lavata con 400 µl di "Zippy™ Wash Buffer" e successiva centrifugazione per 1 minuto a massima velocità. Come ultima fase vi è lo step di eluizione che viene realizzato tramite l'aggiunta 30 µl di "Zippy™ Elution Buffer" e successiva centrifugazione a velocità massima per 30 secondi. In questa maniera, ottengo il plasmide in circa 25 µl di soluzione.

Analisi delle sequenze plasmidiche

Il plasmide ottenuto dovrebbe contenere il cDNA di GLA con la mutazione desiderata. Per verificare l'avvenuta procedura, è stato effettuato il sequenziamento del plasmide appena estratto. Il sequenziamento è stato realizzato *in service* da MWG (Berlino, Germania), ed i risultati da analizzati sono stati forniti tramite elettroferogramma. In questa maniera ho potuto evidenziare se nei plasmidi estratti è presente il cDNA di GLA mutato. A questo punto, ho effettuato un'altra trasformazione di batteri competenti con l'aliquota contenente il plasmide con la mutazione in esame.

Estrazione dei plasmidi con le mutazioni in esame

Questa estrazione è fatta per ottenere un quantitativo elevato di plasmide con la mutazione desiderata. Tale plasmide sarà poi utilizzato per la trasfezione delle cellule eucariote in coltura.

Per tale estrazione è stato utilizzato il “QIAFilter Plasmid Midi Kit” (Qiagen, Hilden, Germany) secondo il protocollo del produttore. In particolare, il primo step prevede il trasferimento di una colonia batterica (formato da cellule con lo stesso plasmide) in 3 ml di brodo di coltura (LB) contenente ampicillina, e la successiva incubazione per 8 ore a 37°C in un oscillatore. In seguito, trasferire tutti i 3 ml in 50 ml di LB contenenti ampicillina ed incubare nuovamente a 37°C in uno shaker per circa 12-16 ore. A questo punto, si centrifugano i 53 ml a 6.000 gravità per 15 minuti a 4°C e scartare il surnatante. Il pellet appena ottenuto si risospende in 4 ml di buffer P1 e, dopo aver mescolato vigorosamente, si aggiungono 4 ml di buffer P2 e si incuba l'intera soluzione per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, all'intera mix vengono aggiunti 4 ml di buffer P3 ed incubare l'intero lisato per 10 minuti a temperatura ambiente. A questo punto, il lisato viene trasferito nel “QIAFilter Cartridge” dove verrà filtrato. La soluzione così ottenuta viene trasferita nella colonnina “QIAGEN-tip 100” precedentemente equilibrata con 4 ml di Buffer QBT. A questo punto, si può procedere alla fase di lavaggio della colonnina: questa consiste nell'aggiunta di 20 ml di Buffer QC ed aspettare che fuoriesca dal “QIAGEN-tip 100” per gravità. Successivamente, si eluisce il DNA aggiungendo 5 ml di Buffer QF ed aspettare che avvenga l'eluizione per gravità. Dopodiché, si aggiunge all'eluato 3,5 ml di Isopropanolo e l'intera miscela viene centrifugata a 15.000 gravità per 30 minuti a 4°C. Dopo aver scartato il surnatante, al pellet vengono aggiunti 2 ml di etanolo al 70% e si sottopone la mix ad una centrifugazione a 4.800 gravità per 20 minuti. A questo punto, eliminare completamente l'etanolo (corrispondente al surnatante della mia miscela) ed aggiungere 100 µl di Buffer TE per risospendere il DNA. L'avvenuta riuscita dell'estrazione viene valutata tramite metodi spettrofotometrici (dove viene anche calcolata la concentrazione ed il grado di purezza del plasmide ottenuto).

Mantenimento delle colture cellulari

Le cellule utilizzate per la metodica dell'attività enzimatica *in vitro* sono le HEK293H. Queste sono state mantenute nel terreno di coltura DMEM (“Dulbecco's Modified Eagle Medium”; Invitrogen, Kalsruhe, Germania) in cui è stato aggiunto il 10% di FBS (siero di bovino fetale; PAA laboratories, Pasching, Austria) e ampicillina/streptomomicina all'1%. Tutte queste cellule sono state mantenute secondo i protocolli standard attualmente in uso (37°C, 5% di CO₂) utilizzando un incubatore a camicia d'acqua (Binder, Tuttlingen, Germany).

Trasfezione delle cellule HEK293H con il plasmide contenente il cDNA con la mutazione in esame ed espressione transiente dell' α -galattosidasi A mutata

Esattamente 24 ore prima della trasfezione, circa 150.000 cellule HEK293H sono state piastrate in ogni pozzetto di piastre da 24 pozzetti utilizzando 500 μ l di DMEM con il 10% di FBS senza però l'aggiunta di antibiotici. Per la trasfezione, è stato utilizzato il "Lipfectamin 2000 reagent" (Invitrogen, Carlsbad, CA) secondo il protocollo del produttore. In particolare, per ogni pozzetto, è stata preparata una soluzione contenente 0,8 μ g di DNA plasmidico diluiti in 50 μ l di DMEM ad alto contenuto di glucosio. Contemporaneamente, sono stati aggiunti 2,5 μ l del "Lipfectamin 2000 reagent" a 50 μ l di DMEM ad alto contenuto glucidico, e la mix è stata incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. Successivamente, le 2 soluzioni precedentemente preparate sono state mescolate in rapporto 1:1 e la miscela appena ottenuta è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente. In questo arco di tempo, è stato cambiato il terreno di coltura parzialmente esausto alle cellule piastrate il giorno prima con altri 500 μ l di DMEM con il 10% di FBS. Una volta passato questo periodo di incubazione, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l della miscela preparata precedentemente (contenente il DNA plasmidico ed il "Lipfectamin[®] 2000 reagent" disciolti in DMEM ad alto contenuto di glucosio), e le cellule sono state incubate nuovamente a 37°C. Dopo 6 ore, il terreno viene cambiato

7. RISULTATI

7.1 Identificazione di un profilo di espressione dei microRNA circolanti in soggetti con la S126G ed in pazienti Fabry.

S126G: la nostra esperienza

Dal 2005 presso l'Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del CNR di Palermo, un gruppo di ricerca si dedica allo studio delle alterazioni genetiche ed enzimatiche nella malattia di Fabry. Durante questo periodo, è stata condotta l'analisi genetica del gene GLA in oltre 9700 soggetti con manifestazioni cliniche riconducibili alla malattia di Fabry. Nella casistica studiata dal gruppo del Prof. Duro, sono stati individuati 10 probandi con la mutazione S126G nel gene GLA. Tutti i probandi erano caratterizzati da una sintomatologia prevalentemente neurologica, in quanto avevano manifestato ictus giovanile e/o danno cerebrovascolare al momento dello studio; inoltre, sorprendentemente, tutti questi soggetti, appartenenti a 10 famiglie non imparentate, sono originari di una porzione della Sicilia Sud Orientale. Allargando lo studio ai familiari sono stati individuati altri 40 soggetti con la mutazione S126G!

La sintomatologia osservata nei probandi con S126G è descritta qui di seguito:

Probando N. 1

È una femmina con una sintomatologia fortemente riconducibile alla malattia di Fabry in quanto manifestava intolleranza caldo-freddo, febbre ricorrente, dolori addominali e disturbi gastrointestinali, faticabilità, perdita di udito, dispnea, tinnito auricolare e mal di testa ricorrenti. Si è inoltre riscontrato un ispessimento intimo-mediale della carotide, ictus giovanile, lesioni cerebrali alla MRI, proteinuria, ipertrofia ventricolare sinistra e ipertensione. Solo la figlia presenta proteinuria, mentre né la sorella gemella né la madre mostravano sintomi pur recando la mutazione.

Probando N. 2

È una donna di 46 anni con la mutazione S126G in omozigosi. Manifestava acroparestesie, perdita di udito, tinnito auricolare, ipertensione e mal di testa ricorrenti. Inoltre, presentava angiocheratomi, un aumentato spessore intimo-mediale della carotide e valori di creatinina nelle urine aumentati. Entrambi i figli (un maschio ed una femmina) hanno la mutazione, ed il

figlio maschio presentava angiocheratomi mentre la figlia femmina manifestava acroparestesie.

Per quanto riguarda i fratelli del probando, entrambi avevano la mutazione e presentavano acroparestesie, ipossia e ritardo mentale. La sorella del probando, recante anch'essa la S126G in omozigosi, manifestava angiocheratomi. Le figlie dei fratelli e della sorella del probando non presentavano alcun sintomo pur avendo la mutazione. L'analisi genetica effettuata sulla madre del probando ha mostrato la S126G in eterozigosi. Tuttavia, il soggetto era completamente asintomatico. Il padre del probando, anch'esso recante la mutazione S126G, possiede un quadro clinico con ischemie cerebrali recidivanti.

Probando N. 3

È un uomo a cui è stato riscontrato ictus giovanile e mal di testa ricorrenti, con bassa attività enzimatica. Anche la sorella, recante la mutazione, manifestava dolori addominali, intolleranza caldo-freddo, disturbi gastrointestinali e mal di testa ricorrenti. Si sospetta una familiarità per la malattia di Fabry in nonna e zia del probando, ed in entrambi i figli della zia è stata riscontrata la mutazione S126G nonostante fossero asintomatici.

Probando N. 4

È una donna di 35 anni con una sintomatologia fortemente riconducibile alla Fabry: intolleranza caldo-freddo, febbre ricorrente, dolori addominali, manifestazioni gastrointestinali, mal di testa ricorrenti, ipertrofia ventricolare lieve, tinnito auricolare, ipertensione, emorragia cerebrale giovanile, ictus, ispessimento intimo-mediale della carotide ed anomalie di morfologia e dell'architettura capillare. Dei 4 figli, 2 hanno la mutazione: uno di questi, di sesso maschile, presentava acroparestesie, tinnito auricolare, un aumento dello spessore intimo-mediale della carotide e disturbi gastrointestinale; l'altra figlia manifestava soltanto acroparestesie.

Probando N.5

È una donna con manifestazioni neurologiche alla quale è stata riscontrata la mutazione S126G. La mutazione è stata ritrovata anche nel fratello del probando, di cui però non ci è pervenuta la scheda clinica.

Probando N. 6

È una ragazza di 13 anni con la S126G in eterozigosi ed attività enzimatica residua; dal punto di vista sintomatologico, il probando accusava una sintomatologia neurologica, acroparestesie e cefalea. Anche il padre recava la S126G, ma di lui non è stata pervenuta la scheda clinica.

Probando N. 7

È una donna con una sintomatologia prevalentemente neurologica che recava la S126G in eterozigosi, alla quale è stata precedentemente diagnosticata la febbre mediterranea familiare (FMF), tuttavia non confermata geneticamente⁽⁵⁴⁾.

Per quanto riguarda la sorella del probando, è stata riscontrata la S126G in eterozigosi. Nella madre è stata riscontrata la S126G in eterozigosi, con attività dell' α -galattosidasi A nella norma e priva dei sintomi significativi riconducibili alla Fabry.

Probando N. 8

È una giovane donna di 30 anni, affetta dalla tiroidite di Hashimoto e dalla Sindrome di Sjogren; accusa dolori addominali e faticabilità. La stessa mutazione S126G è stata riscontrata nella sorella gemella, nella madre e nello zio, ma non ci è pervenuta la scheda clinica di tali familiari.

Probando N. 9

È una donna di 48 anni che presentava acroparestesie, faticabilità ed astenia. Inoltre, la paziente ha avuto un episodio di ischemia cerebrale. L'analisi genetica ha identificato la mutazione S126G nel gene GLA in questo soggetto.

Nella madre del probando è stata trovata tale mutazione. Tuttavia, la sua sintomatologia non ci è nota poiché non ci è pervenuta alcuna scheda clinica.

Probando N. 10

È un maschio di 38 anni giunto alla nostra attenzione in quanto manifestava intolleranza al caldo ed al freddo, cardiomiopatie, ictus, ipertensione e mal di testa ricorrenti. È stata effettuata l'analisi genetica che ha rivelato la mutazione S126G nel gene GLA di questo paziente, ed il saggio enzimatico ha mostrato un'attività dell' α -galattosidasi A nella norma.

Analisi dell'espressione di 800 microRNA circolanti nei pazienti Fabry e nei soggetti con S126G

Uno degli obiettivi del mio studio è stato identificare nuovi biomarker diagnostici per la malattia di Fabry. In particolare nello 0,4% dei pazienti da noi studiati, è stata identificata la mutazione S126G il cui ruolo patogenetico non è ad oggi chiaro. Per questi soggetti, in cui le analisi genetiche ed enzimatiche non sono sufficienti per fornire una risposta diagnostica, è necessario trovare nuovi strumenti che consentano un loro inquadramento clinico univoco.

Per tale ragione, abbiamo realizzato un esperimento di “microRNA profiling” confrontando il profilo di espressione di 800 microRNA nel plasma di: soggetti con la mutazione S126G nel gene GLA; pazienti con forma classica della malattia di Fabry; individui con segni e sintomi riconducibili alla Fabry ma con soltanto alterazioni introniche (fra cui l'aplotipo 1); controlli sani.

In particolare, i soggetti analizzati sono descritti nella tabella qui di seguito:

N. paziente	Codice	Tipo di soggetto	Sesso	Età	Gene GLA	Genotipo - Fenotipo	Sintomatologia
1	21(k-)	Controllo sano	F	31	wild-type	wild-type	Nessun sintomo
2	22(k-)	Controllo sano	F	28	wild-type	wild-type	Nessun sintomo
3	24(k-)	Controllo sano	M	32	wild-type	wild-type	Nessun sintomo
4	34(k-)	Controllo sano	M	38	wild-type	wild-type	Nessun sintomo
5	46(k-)	Controllo sano	M	45	wild-type	wild-type	Nessun sintomo
6	47(k-)	Controllo sano	F	26	wild-type	wild-type	Nessun sintomo
7	5(WT)	Soggetto wild-type con segni e sintomi riconducibili alla mF	F	63	wild-type	wild-type	Angiocheratomi; ipo-anidrosi, intolleranza al caldo ed al freddo, insufficienza renale.
8	4(10CT)	Soggetto con mutazioni introniche	F	59	-10 C>T IVS2-77_81 del5 IVS4-16A>G IVS6-22C>T	Polimorfismo	Riduzione della funzione renale, ipertensione arteriosa, proteinuria, ipertrofia ventricolare sinistra
9	30(10CT)	Soggetto con mutazioni introniche	F	54	-10 C>T IVS2-77_81 del5 IVS4-16A>G IVS6-22C>T	Polimorfismo	Perdita di udito, lesioni cerebrali, tinnito auricolare, ipertensione, mal di testa ricorrenti
10	31(10CT)	Soggetto con mutazioni introniche	F	54	-10 C>T IVS2-77_81 del5 IVS4-16A>G IVS6-22C>T	Polimorfismo	Sclerosi multipla, lesioni vascolari
11	32(10CT)	Soggetto con mutazioni introniche	F	51	-10 C>T IVS2-77_81 del5 IVS4-16A>G IVS6-22C>T	Polimorfismo	Ipertrafia ventricolare sinistra, dialisi, ipertensione.
12	1(12GA)	Soggetto con mutazioni introniche	F	47	-12 G>A IVS4+68 A>G IVS6-22 C>T IVS4+866 867	Polimorfismo	Malattia cerebrovascolare ad esordio giovanile, episodi di emiparesi
13	8(S126G)	Soggetto con S126G	F	22	S126G	Non chiaro	Proteinuria
14	9(S126G)	Soggetto con S126G	F	35	S126G	Non chiaro	Emorragia cerebrale giovanile, ipertrofia ventricolare sinistra. lieve, dispnea
15	26(S126G)	Soggetto con S126G	F	41	S126G	Non chiaro	parestesie emilato sinistro
16	42 P178 S126G	Soggetto con S126G	F	5	S126G	Non chiaro	Asintomatica
17	43 P012 S126G	Soggetto con S126G	F	22	S126G	Non chiaro	Asintomatica
18	6 ex4	Paziente Fabry	M	58	IVS4 g.9127 C>T	Classico	insufficienza renale cronica, ipertrofia ventricolare sinistra
19	16 (I91T)	Paziente Fabry	F	59	I91T	Classico	acroparestesie, ipoanidrosi, angina
20	27(L243F)	Paziente Fabry	F	8	L243F	Classico	febbre ricorrente
21	28(L243F)	Paziente Fabry	F	37	L243F	Classico	acroparestesie, dolori addominali, aritmie cardiache
22	35(L243F)	Paziente Fabry	F	62	L243F	Classico	dispnea, perdita di udito
23	36 P262 IVS4+5G>T	Paziente Fabry	F	43	IVS4+5G>T	Classico	intolleranza al freddo e caldo

Tabella 3: i soggetti reclutati per lo studio di “miRNA profiling”: nelle righe 1-6 sono indicati i soggetti sani; nella riga 7 è riportato un paziente con una sintomatologia riconducibile alla Fabry e con un gene GLA wild-type; nelle righe 8-12 sono indicati gli individui con polimorfismi nel gene GLA e con qualche segno e sintomo riferibile alla Fabry; nelle righe 13-17 vengono descritti i soggetti con S126G; nelle righe 18-23 sono riportati i pazienti Fabry classici.

Di questi soggetti, ho isolato il plasma da campioni di sangue, per poi spedirlo in ghiaccio secco ai laboratori della Diatech Labline (Jesi, AN, USA). Il personale specializzato ha estratto i microRNA da questi campioni, e successivamente sono stati eseguiti esperimenti di miRNA profiling utilizzando la metodica nCounter.

I risultati sono stati consegnati dal personale dell'azienda Diatech labline in formato excel. Per ridurre le oscillazioni dei dati dovuti ad errori manuali ed variazioni intrinseche alla metodica stessa, i valori sono stati normalizzati utilizzando degli *spike-in*, cioè 5 miRNA esogeni a concentrazione nota che sono stati aggiunti al momento dell'estrazione dei miRNA dal plasma. In particolare, gli *spike-in* utilizzati sono microRNA derivati dalla pianta *Arabidopsis thaliana* (ath-miR-159a), dal riso *Oryza sativa* (osa-miR-414, osa-miR-442) e dal nematode *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-248, cel-miR-254).

I risultati sono stati analizzati usando il software “gene cluster 3.0” con cui si è condotta una analisi di *clustering unsupervised*, identificando 200 degli 800 microRNA studiati. Gli altri 600 miRNA sono stati esclusi dalla analisi in quanto assenti nel plasma. Approfondendo le analisi di questi 200 microRNA, ne ho individuato 11 differenzialmente espressi tra i controlli sani ed i pazienti affetti dalla forma classica della malattia di Fabry (Figura 7).

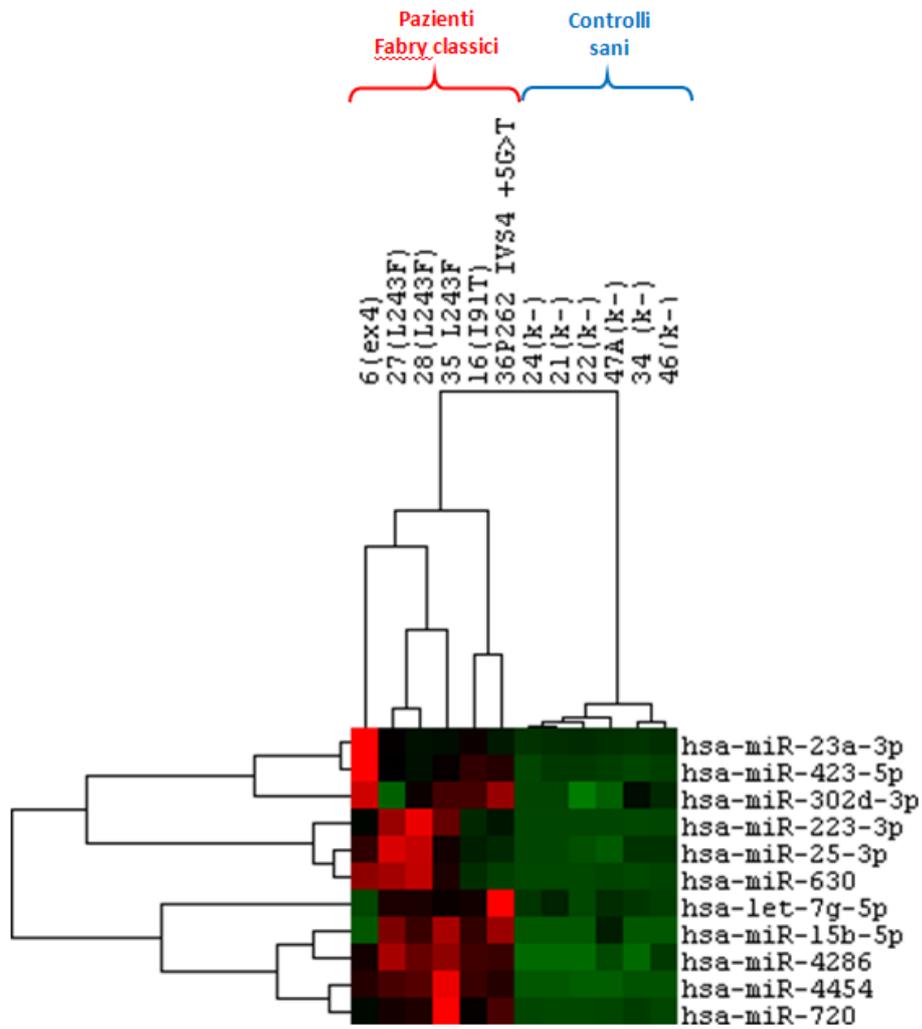


Figura 7: pannello di espressione dei microRNA circolanti effettuato su pazienti Fabry classici e su controlli sani.

Come viene mostrato nella figura, questi 11 microRNA riescono a discriminare perfettamente i pazienti affetti dalla forma classica della mF dai controlli sani.

A questo punto, ho investigato il comportamento di questi 11 miRNA nei soggetti con la mutazione S126G nel gene GLA ed in individui con una sintomatologia riconducibile alla mF ma con un gene GLA *wild-type* o con soltanto delle alterazioni nelle porzioni introniche. Il risultato è mostrato nella seguente figura (Figura 8):

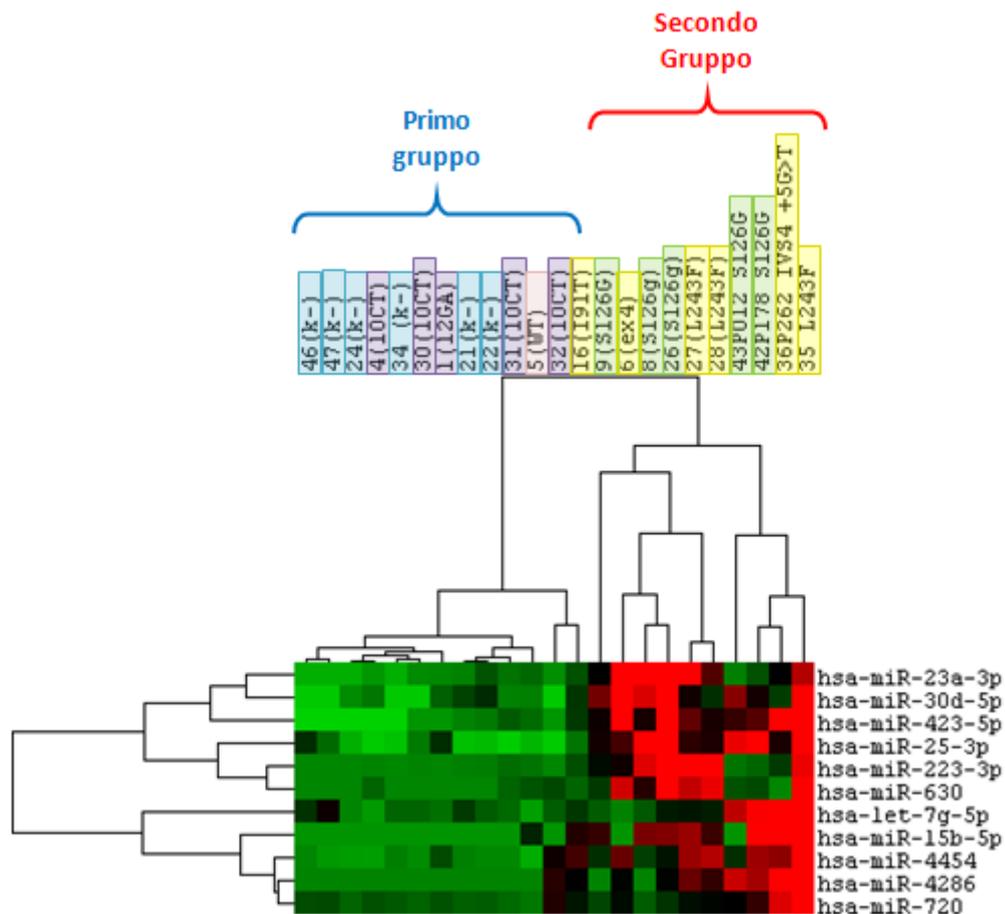


Figura 8: pannello di espressione dei microRNA circolanti effettuato su pazienti Fabry classici (indicati in giallo), su soggetti con S126G (indicati in verde), su soggetti con varianti polimorfiche del gene GLA (indicati in viola), su un paziente con segni e sintomi riconducibili alla Fabry ed un gene GLA wild-type (indicato in rosa), e sui controlli sani (indicati in azzurro).

Dall'analisi approfondita di ogni singolo soggetto/mutazione risulta che: i soggetti con una mutazione esonica in GLA vengono raggruppati con i pazienti Fabry classici, rafforzando l'ipotesi che tali mutazioni potrebbero essere coinvolte nella sintomatologia dei pazienti; i soggetti con alcuni segni e sintomi riconducibili alla Fabry e con un gene GLA *wild-type* o esclusivamente con alterazioni introniche si ritrovano nello stesso gruppo dei controlli sani. Questo ci porta a due considerazioni: la prima è che questo risultato sembra confermare la natura polimorfica, non causativa di malattia, di alcune alterazioni introniche; la seconda è che gli 11 microRNA identificati in questo studio, se confermati in un casistica più ampia, potrebbero essere considerati dei biomarker specifici per la malattia di Fabry. A rafforzare questa ipotesi vi è l'evidenza di due soggetti con S126G, mutazione controversa, raggruppati con i pazienti Fabry classici, indicando una natura patogenetica comune.

7.2 Attività enzimatica *in vitro* e risposta delle diverse mutazioni alla terapia chaperonica

Attività enzimatica *in vitro*

Il saggio dell'attività enzimatica *in vitro* è una metodica ideata dal gruppo del Prof. Rolfs come strumento prognostico per la malattia di Fabry. Infatti, ad oggi risulta difficile predire il decorso della malattia, soprattutto nelle donne. Il saggio enzimatico ha mostrato una buona correlazione con il fenotipo (classico, atipico o *mild*) causato da una specifica mutazione nel gene GLA⁽¹⁷⁾.

Durante il mio periodo di dottorato, ho trascorso 11 mesi nel laboratorio del Prof. Arndt Rolfs, presso l'*Albrecht-Kossel Institute for the Neurorregeneration* a Rostock (Germania), dove ho applicato tale metodica su un elevato numero di mutazioni. In particolare, ho saggiato l'attività enzimatica *in vitro* di 73 mutazioni, di cui 45 mai state descritte in letteratura. È importante sottolineare che tale attività enzimatica è stata normalizzata rispetto a quella dell'enzima *wild-type*. I risultati di tale attività sono riassunti nella seguente tabella (Tabella 4):

N	Mutazione	Attività enzimatica <i>in vitro</i> [% WT] media ± SEM (Numero di saggi)	lyso-Gb3 plasmatico [media (Numero di pazienti)]	
			male	female
1	<i>p.L3V</i>	81.5±9.2 (5)	0.5 (1)	0.5 (1)
2	<i>p.L3P</i>	117.7±13.7 (4)	0.5 (1)	0.5 (1)
3	<i>p.A20P</i>	2.5±0.4 (11)	8.5 (1)	0.7 (1)
4	<i>p.A20D</i>	2.8±0.1 (3)		3.7 (1)
5	<i>p.L21P</i>	0.6±0.1 (3)	70.9 (1)	
6	<i>p.D33G</i>	37.4±5.1 (3)	17.6 (1)	1.0 (2)
7	<i>p.G35E</i>	38.0±7.8 (4)	45.3 (1)	0.7 (1)
8	<i>p.L36W</i>	2.3±0.6 (5)	31.7 (1)	0.5 (1)
9	<i>p.P40S</i>	0 (4)	11.8 (2)	1.6 (2)
10	<i>p.M42T</i>	2.9±0.3 (4)		0.5 (1)
11	<i>p.L45P</i>	0 (4)	42.7 (2)	9.8 (1)
12	<i>p.E48D</i>	0 (4)	82.2 (2)	11.4 (1)
13	<i>p.C56Y</i>	0 (4)	28.4 (1)	2.5 (3)
14	<i>p.P60L</i>	15.6±0.2 (3)	1.4 (3)	2.2 (4)
15	<i>p.I64F</i>	0 (3)	41.4 (1)	1.2 (2)
16	<i>p.E71G</i>	87.0±4.8 (4)		0.5 (1)

17	p.G80D	29.3±5.7 (4)	1.6 (3)	1.4 (5)
18	p.Y86H	0 (3)	23.7 (1)	0.8 (4)
19	p.I91N	0 (3)	104.0 (1)	
20	p.I91T	0.7±0.3 (7)	12.9 (1)	0.6 (2)
21	p.C94Y	0 (6)	55.8 (7)	18.2 (20)
22	p.C94S	0 (6)	32.9 (2)	5.7 (1)
23	p.F113I	15.6±1.9 (7)	1.3 (1)	0.5 (3)
24	p.A121T	50.0±8.4 (7)		0.5 (2)
25	p.I154T	98.0±16.4 (8)		0.5 (1)
26	p.W162X	0 (5)		
27	p.V164L	43.1±1.0 (5)		
28	p.V164G	1.4±0.1 (6)		
29	p.L167Q	0 (6)		10.7 (1)
30	p.L180F	32.4±9.3 (8)	12.2 (2)	1.0 (4)
31	p.M187V	22.8±5.0 (7)		
32	p.M187I	3.1±0.6 (5)		
33	p.R196S	42.1±2.5 (4)		0.5 (1)
34	p.I198T	38.7±3.1 (3)	4.7 (1)	
35	p.C202Y	0 (5)	31.8 (1)	5.5 (1)
36	p.W204R	0 (3)	101 (1)	
37	p.K213R	68.1±8.5 (4)	30.4 (1)	0.9 (1)
38	p.P214L	19.4±1.4 (3)	4.6 (1)	1.0 (7)
39	p.I219M	15.2±2.2 (5)		
40	p.R220X	0 (5)	62.8 (3)	7.1 (2)
41	p.R227P	0 (7)		4.9 (1)
42	p.N228S	59.5±9.8 (5)	0.5 (1)	
43	p.I242V	70.6±15.7 (9)	2.0 (2)	
44	p.L243F	11.4±2.0 (10)		0.7 (2)
45	p.S247P	0 (6)	81.9 (1)	
46	p.N249K	23.7±1.7 (4)		
47	p.I253T	73.0±4.8 (3)	8.45 (2)	1.4 (3)
48	p.V254A	26.4±2.4 (3)		2.5 (1)
49	p.P259R	20.5±2.6 (12)	44.8 (1)	
50	p.W262R	0 (3)		12.3 (1)
51	p.V269G	0 (5)	15.1 (3)	27.8 (2)
52	p.S276G	0 (5)	11.8 (2)	0.9 (4)
53	p.I289V	79.9±6.4 (4)		0.5 (4)
54	p.A309V	48.0±0.5 (5)	0.5 (1)	
55	p.D313N	90.1±23.0 (4)		
56	p.D315N	65.3±7.4 (7)		
57	p.V316A	49.1±5.5 (3)		0.5 (1)
58	p.I317S	0 (4)		0.8 (4)
59	p.N320Y	0 (6)		7.0 (2)
60	p.P323R	62.7±4.4 (4)	0.8 (1)	1.1 (2)
61	p.Q327R	0 (5)		11.1 (1)
62	p.Q327L	0.6±0.1 (5)	24.0 (1)	5.5 (1)
63	p.G328R	0 (8)		6.8 (5)
64	p.Q330R	54.9±5.4 (5)	0.6 (1)	
65	p.R342P	0 (7)	38.6 (4)	2.8 (6)

66	<i>p.A352G</i>	53.7±4.2 (4)	0.5 (1)	0.5 (1)
67	<i>p.R356P</i>	2.1±0.6 (6)		0.5 (2)
68	<i>p.E358K</i>	0 (3)	45.8 (8)	27.1 (10)
69	<i>p.G360S</i>	0 (3)		
70	<i>p.G375A</i>	44.1±10.1 (5)		2.5 (2)
71	<i>p.R392S</i>	44.3±1.6 (4)		4.3 (1)
72	<i>p.W399S</i>	53.0±4.3 (3)	1.2 (2)	
73	<i>p.R404del</i>	0 (3)		

Tabella 4: le attività enzimatiche in vitro delle mutazioni da me studiate (colonna 2 e 3). Le mutazioni in grassetto sono quelle trovate per la prima volta dal gruppo del Prof.Rolfs. Nelle colonne 4 e 5 sono indicati i valori di lyso-Gb3 identificati nei pazienti.

Le mutazioni sono state raggruppate in quattro diverse classi ed ognuna di queste sembra essere associato ad un particolare fenotipo della mF (Tabella 5): le mutazioni di classe I, che causano una riduzione dell'attività fino allo 0-1% rispetto a quella *wild-type*, sembrano essere responsabili della forma classica della malattia; le mutazioni di classe II, causative di un enzima con un'attività compresa fra 1-20% rispetto a quella *wild-type*, sono responsabili di una variante atipica della malattia; la classe III raggruppa tutti le mutazioni che riducono l'attività enzimatica fra il 20 ed il 60% rispetto a quella *wild-type*. Tali mutazioni sembrano essere responsabili di una forma "mild" della malattia; le mutazioni di classe IV, che causano la sintesi di un enzima mutato con una attività superiore al 60% rispetto a quella *wild-type*, non sono causative di malattia.

Class I (0 - 1%)	Class II (1 - 20%)	Class III (20 - 60%)	Class IV (60 - 100%)
L21P R220X	A20P	D33G N249K	L3V
P40S R227P	A20D	G35E V254A	L3P
L45P S247P	L36W	G80D P259R	E71G
E48D W262R	M42T	A121T A309V	I154T
C56Y V269G	P60L	V164L V316A	K213R
I64F S276G	F113I	L180F Q330R	I242V
Y86H I317S	V164G	M187V A352G	I253T
I91N N320Y	M187I	R196S G375A	I289V
I91T Q327R	P214L	I198T R392S	D313N
C94S Q327L	I219M	N228S W399S	D315N
C94Y G328R	L243F		P323R
W162X R342P	R356P		
L167Q E358K			
C202Y G360S			
W204R R404del			

Tabella 5: distribuzione delle mutazioni analizzate in base all'attività enzimatica *in vitro*

Per confermare la validità del metodo proposto dal gruppo del Prof. Rolfs, ho correlato l'attività enzimatica *in vitro* con i valori del lyso-Gb3 plasmatico. Una correlazione simile era già stata effettuata nello studio precedente⁽¹⁷⁾ con dei buoni risultati, in quanto vi erano dei livelli di lyso-Gb3 patologici in pazienti con mutazioni appartenenti alle classi I, II e III. Tuttavia, erano anche state descritte delle attività che non correlavano con i valori di lyso-Gb3 plasmatici. Anche nel mio studio ho potuto evidenziare una buona correlazione fra l'attività enzimatica *in vitro* e i livelli di Lyso-Gb3 plasmatici, pur evidenziando delle "eccezioni". Una di queste è la mutazione I253T, appartenente alla classe IV e quindi secondo questa metodica non responsabile di malattia, che era stata identificata in un paziente con livelli di lyso-Gb3 plasmatici nel range del patologico; oppure la mutazione P60L, che secondo il sistema dell'attività enzimatica *in vitro* appartiene alla classe II e quindi responsabile di varianti atipiche, è stata trovata in pazienti che mostrano valori di lyso-Gb3 plasmatico appena superiori al range dei controlli sani. Tali differenze fra l'attività enzimatica *in vitro* ed i livelli del lyso-Gb3 possono essere dovuti alla metodica da me utilizzata, in quanto bisognerebbe incrementare gli studi di correlazione su un più alto numero di pazienti per confermare la sua validità prognostica. Tuttavia, è necessario considerare che anche la valutazione del lyso-Gb3 presenta delle limitazioni, in quanto oggi è stato ampiamente dimostrato che il lyso-Gb3 non è

sempre in grado di diagnosticare i pazienti Fabry o di correlare i valori ottenuti con la sintomatologia dei pazienti⁽¹⁹⁾⁽⁵⁵⁾.

Per considerare il saggio enzimatico *in vitro* come un metodo prognostico affidabile, bisognerebbe correlare le attività enzimatiche ottenute con la sintomatologia dei pazienti. Tuttavia, non mi è stato possibile realizzare questa correlazione poiché non è pervenuta alcuna informazione clinica dei pazienti reclutati per lo studio.

Identificazione delle mutazioni che rispondono al trattamento con il DGJ in un sistema di colture cellulari

Durante il mio periodo all'estero, ho anche saggiato la risposta delle cellule al DGJ dopo che sono state trasfettate con un plasmide contenente il cDNA di GLA con una data mutazione. Il DGJ è una molecola che, se presente a basse concentrazioni, funge da chaperone per l' α -galattosidasi A e, per tale ragione, oggi è in trial clinico di fase III per essere utilizzato nella terapia chaperonica.

Lo studio da me condotto è stato realizzato aggiungendo nel terreno di coltura 20 μ M di DGJ dopo 6 ore dalla trasfezione e, dopo circa 60 ore, estrarre le proteine dalle cellule e saggiare l'attività enzimatica *in vitro*. In questa maniera ho potuto identificare i così chiamati “*responder*”, cioè quelle mutazioni che, secondo lo studio effettuato dal gruppo del Prof.Rolfs⁽¹⁷⁾, determinano la formazione di una α -galattosidasi A che in presenza del DGJ incrementa la sua attività di almeno il 5%.

I risultati dei miei studi sono riportati nella seguente tabella (Tabella 6):

N	Mutazione	Attività enzimatica <i>in vitro</i> [% WT] media \pm SEM (Numero di saggi)		responder
		-DGJ	+DGJ	
1	<i>p.L3V</i>	81.5 \pm 9.2 (5)	88.0 \pm 12.4 (5)	si
2	<i>p.L3P</i>	117.7 \pm 13.7 (4)	129.4 \pm 12.6 (4)	si
3	<i>p.A20P</i>	2.5 \pm 0.4 (11)	4.9 \pm 0.8 (12)	no
4	<i>p.A20D</i>	2.8 \pm 0.1 (3)	4.5 \pm 0.2 (3)	no
5	<i>p.L21P</i>	0.6 \pm 0.1 (3)	1.7 \pm 0.3 (3)	no
6	<i>p.D33G</i>	37.4 \pm 5.1 (3)	62.0 \pm 4.8 (3)	si
7	<i>p.G35E</i>	38.0 \pm 7.8 (4)	70.8 \pm 14.6 (4)	si
8	<i>p.L36W</i>	2.3 \pm 0.6 (5)	22.3 \pm 1.5 (5)	si

9	<i>p.P40S</i>	0 (4)	1.4±0.5 (3)	no
10	<i>p.M42T</i>	2.9±0.3 (4)	21.4±5.0 (4)	si
11	<i>p.L45P</i>	0 (4)	0 (4)	no
12	<i>p.E48D</i>	0 (4)	0 (4)	no
13	<i>p.C56Y</i>	0 (4)	3.3±1.1 (3)	no
14	<i>p.P60L</i>	15.6±0.2 (3)	33.1±1.0 (3)	si
15	<i>p.I64F</i>	0 (3)	0 (3)	no
16	<i>p.E71G</i>	87.0±4.8 (4)	104.6±7.4 (4)	si
17	<i>p.G80D</i>	29.3±5.7 (4)	30.4±5.4 (4)	no
18	<i>p.Y86H</i>	0 (3)	0.7±0.1 (3)	no
19	<i>p.I91N</i>	0 (3)	0 (3)	no
20	<i>p.I91T</i>	0.7±0.3 (7)	7.0±1.0 (7)	si
21	<i>p.C94Y</i>	0 (6)	0 (6)	no
22	<i>p.C94S</i>	0 (6)	0 (6)	no
23	<i>p.F113I</i>	15.6±1.9 (7)	34.0±5.5 (3)	si
24	<i>p.A121T</i>	50.0±8.4 (7)	55.5±6.2 (7)	si
25	<i>p.I154T</i>	98.0±16.4 (8)	108.0±18.6 (8)	si
26	<i>p.W162X</i>	0 (5)	0 (5)	no
27	<i>p.V164L</i>	43.1±1.0 (5)	47.8±1.1 (5)	no
28	<i>p.V164G</i>	1.4±0.1 (6)	2.8±0.5 (6)	no
29	<i>p.L167Q</i>	0 (6)	0.7±0.3 (6)	no
30	<i>p.L180F</i>	32.4±9.3 (8)	80.7±15.6 (8)	si
31	<i>p.M187V</i>	22.8±5.0 (7)	67.0±7.8 (7)	si
32	<i>p.M187I</i>	3.1±0.6 (5)	31.2±4.5 (5)	si
33	<i>p.R196S</i>	42.1±2.5 (4)	67.8±6.6 (4)	si
34	<i>p.I198T</i>	38.7±3.1 (3)	50.4±3.2 (3)	si
35	<i>p.C202Y</i>	0 (5)	1.4±0.5 (5)	no
36	<i>p.W204R</i>	0 (3)	0 (3)	no
37	<i>p.K213R</i>	68.1±8.5 (4)	65.3±11.4 (4)	no
38	<i>p.P214L</i>	19.4±1.4 (3)	64.1±9.8 (3)	si
39	<i>p.I219M</i>	15.2±2.2 (5)	56.5±9.4 (5)	si
40	<i>p.R220X</i>	0 (5)	0 (5)	no
41	<i>p.R227P</i>	0 (7)	0 (7)	no
42	<i>p.N228S</i>	59.5±9.8 (5)	70.6±13.1 (5)	si
43	<i>p.I242V</i>	70.6±15.7 (9)	89.4±21.2 (9)	si
44	<i>p.L243F</i>	11.4±2.0 (10)	70.8±10.5 (10)	si
45	<i>p.S247P</i>	0 (6)	5.8±1.5 (6)	si
46	<i>p.N249K</i>	23.7±1.7 (4)	54.6±3.4 (4)	si
47	<i>p.I253T</i>	73.0±4.8 (3)	115.8±6.9 (3)	si
48	<i>p.V254A</i>	26.4±2.4 (3)	39.3±3.2 (3)	si
49	<i>p.P259R</i>	20.5±2.6 (12)	40.0±4.5 (12)	si
50	<i>p.W262R</i>	0 (3)	0 (3)	no
51	<i>p.V269G</i>	0 (5)	0 (5)	no
52	<i>p.S276G</i>	0 (5)	5.6±1.4 (5)	si
53	<i>p.I289V</i>	79.9±6.4 (4)	95.0±4.3(3)	si
54	<i>p.A309V</i>	48.0±0.5 (5)	46.6±1.6 (5)	no
55	<i>p.D313N</i>	90.1±23.0 (4)	95.2±18.7 (3)	si
56	<i>p.D315N</i>	65.3±7.4 (7)	72.4±12.4 (7)	si
57	<i>p.V316A</i>	49.1±5.5 (3)	58.3±7.7 (3)	si

58	<i>p.I317S</i>	0 (4)	2.7±0.7 (4)	no
59	<i>p.N320Y</i>	0 (6)	0 (6)	no
60	<i>p.P323R</i>	62.7±4.4 (4)	63.7±3.1 (4)	no
61	<i>p.Q327R</i>	0 (5)	3.9±0.1 (5)	no
62	<i>p.Q327L</i>	0.6±0.1 (5)	20.0±3.0 (5)	si
63	<i>p.G328R</i>	0 (8)	0 (4)	no
64	<i>p.Q330R</i>	54.9±5.4 (5)	62.8±11.9 (5)	si
65	<i>p.R342P</i>	0 (7)	0 (7)	no
66	<i>p.A352G</i>	53.7±4.2 (4)	56.4±2.9 (4)	no
67	<i>p.R356P</i>	2.1±0.6 (6)	6.7±2.3 (6)	no
68	<i>p.E358K</i>	0 (3)	0 (3)	no
69	<i>p.G360S</i>	0 (3)	0.4±0.2 (3)	no
70	<i>p.G375A</i>	44.1±10.1 (5)	48.8±12.6 (5)	no
71	<i>p.R392S</i>	44.3±1.6 (4)	46.2±1.7 (4)	no
72	<i>p.W399S</i>	53.0±4.3 (3)	51.5±5.1 (3)	no
73	<i>p.R404del</i>	0 (3)	0 (3)	no

Tabella 6: Risultati delle attività enzimatiche *in vitro* delle diverse mutazioni analizzate in presenza o assenza del DGJ. Le mutazioni in grassetto sono quelle trovate per la prima volta dal gruppo del Prof.Rolfs.

È interessante sottolineare come soltanto il 10% (3/30) delle mutazioni di classe I che ho analizzato sembrano rispondere al trattamento con il DGJ. Al contrario, le mutazioni appartenenti alle altre classi sembrano rispondere bene al trattamento con questo chaperone: infatti, i *responder* della classe II, III e IV rappresentano rispettivamente il 66,7% (8/12), 65% (13/20) e 81,8% (9/11) delle mutazioni di ogni singola classe considerata. Ciò significa che i probabilmente i pazienti di elezione per la terapia chaperonica potrebbero essere quelli affetti da una forma atipica o “*mild*” piuttosto che dalla forma classica della malattia di Fabry.

8. DISCUSSIONE

La malattia di Fabry, nella sua forma classica, si manifesta sin dall'infanzia con sintomatologia neurologica periferica, per coinvolgere progressivamente, con l'avanzare dell'età, il rene, il cuore, il sistema nervoso centrale. Questa progressione può assumere varie forme ed esprimersi attraverso diverse sfumature: l'età di insorgenza, i segni e sintomi e la loro gravità. In alcuni casi la malattia si manifesta solamente con una fastidiosa sintomatologia dolorosa e con un minimo coinvolgimento d'organo (le varianti atipiche). La dimostrazione della presenza di una mutazione causativa nelle regioni codificanti del gene GLA, assieme ad attività enzimatica assente e presenza di accumulo di glicosfingolipidi, forniscono una conferma della diagnosi clinica avanzata dal medico. Tuttavia molti pazienti con segni e sintomi fortemente riconducibili alla Fabry hanno, nel gene GLA, delle mutazioni dal significato dubbio (o non presentano mutazioni in GLA) e per questa ragione non hanno ricevuto ancora una conferma della diagnosi clinica.

Nel complesso, i pazienti che presentano manifestazioni cliniche riferibili alla malattia di Fabry possono essere raggruppati in tre categorie:

- a) soggetti con mutazioni causative nel gene che codifica l' α -galattosidasi A (gene GLA);
- b) soggetti con mutazioni esoniche dubbie, nel gene GLA;
- c) soggetti con sintomi riconducibili alla malattia di Fabry ma privi di mutazioni nelle regioni codificanti del gene GLA.

Nel primo gruppo, la dimostrazione della presenza di una mutazione causativa, assieme ad attività enzimatica assente e presenza di accumulo di glicosfingolipidi, forniscono una conferma della diagnosi clinica avanzata dal medico. Invece, nei soggetti che presentano i sintomi della Fabry ma sono privi di mutazioni in GLA, circa il 98% dei soggetti che giungono all'attenzione del gruppo del Prof.Duro, si rende necessario l'utilizzo di strumenti diagnostici innovativi, considerando comunque che è estremamente improbabile che si tratti in tutti i casi di Fabry. Realisticamente almeno la metà di tali diagnosi potrebbe essere evitata se fossero disponibili algoritmi diagnostici specifici utili a guidare i clinici verso la diagnosi di malattia di Fabry. Queste osservazioni hanno indotto il team di ricerca guidato dal prof.Duro ad attivare alcuni progetti di ricerca con l'obiettivo di identificare nuovi marcatori molecolari specifici, nella speranza di potere dare un importante strumento al clinico per una diagnosi differenziale. Quindi, l'obiettivo del mio dottorato è stato quello di identificare nuovi biomarker e sviluppare nuove metodologie con un più alto valore diagnostico e prognostico

rispetto a quelli ad oggi in uso. In particolare, ho focalizzato la mia attenzione allo studio dei microRNA circolanti, piccole molecole coinvolte nella regolazione dell'espressione genica, importanti e innovativi strumenti diagnostici di varie patologie. Tale studio ha portato all'identificazione di un profilo di espressione microRNA circolanti specifico per i pazienti Fabry. Questo profilo, che si compone di 11 microRNA upregolati nei pazienti Fabry rispetto ai controlli sani, potrebbe aprire nuove prospettive nella diagnosi della malattia di Fabry, soprattutto per quei casi "dubbi". Tuttavia, per confermare la sua validità metodologica, lo studio deve essere ampliato ad una casistica più elevata di pazienti Fabry, di controlli sani e di soggetti con una sintomatologia riconducibile alla Fabry ma con un gene *GLA wild-type*.

Ho indagato il comportamento di questi 11 microRNA nei soggetti con una sintomatologia riconducibile alla malattia di Fabry e recanti la mutazione S126G. Ad oggi, il significato di tale mutazione, pur essendo stata ritrovata in pazienti affetti da stroke cerebrali⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾, rimane dubbio. Per investigare il possibile coinvolgimento di questa mutazione nella sintomatologia dei pazienti, ho effettuato esperimenti di *miRNA profiling* in 5 soggetti con la mutazione S126G. I risultati, anche se preliminari, hanno mostrato che gli 11 microRNA identificati hanno un comportamento simile sia nei soggetti con la S126G che nei pazienti Fabry classici, consentendo di avanzare delle ipotesi sul significato patogenetico di questa mutazione: infatti, data la sintomatologia prettamente neurologica sia dei probandi da noi studiati che dei casi descritti in letteratura⁽⁵⁸⁾, la S126G potrebbe essere responsabile di una variante cerebrovascolare della mF; oppure un'altra interpretazione è che questa mutazione possa predisporre verso una certa sintomatologia, ma è necessaria la concomitante presenza di altri fattori per l'insorgenza delle manifestazioni cliniche.

Per confermare le ipotesi descritte, è necessario confrontare i profili di espressione dei microRNA circolanti in una casistica più elevata di soggetti con la mutazione S126G. Inoltre, al fine di trovare specifici miRNA con valore diagnostico in questi soggetti, lo studio verrà esteso anche ai soggetti con stroke privi di qualsiasi mutazione nel gene *GLA*.

Nel mio periodo di dottorato svolto presso *l'Albrecht-Kossel Institute for the Neurorigeneration*, ho applicato un innovativo metodo prognostico per la malattia di Fabry ideato dal team di ricerca del Prof. Rolfs⁽¹⁷⁾. In particolare, tale metodologia consiste nell'effettuare l'attività enzimatica *in vitro* di α -galattosidasi A mutate ed in base al risultato ottenuto è possibile predire il fenotipo causato dalla mutazione analizzata. Sotto la supervisione del Prof. Rolfs, ho applicato tale metodo per studiare biochimicamente 73 mutazioni, di cui 45 non erano mai state descritte in letteratura. In questa maniera, ho potuto

evidenziare quale di queste mutazioni fosse responsabile di un fenotipo severo, atipico o “mild”. È già stato dimostrato che tale metodo ha un più alto valore prognostico rispetto agli altri strumenti ad oggi in uso, come la determinazione dei valori del Lyso-Gb3 plasmatico⁽¹⁷⁾. Inoltre, ho anche valutato quale di queste 73 mutazioni fosse in grado di incrementare la sua attività in presenza del DGJ, la molecola utilizzata nella terapia chaperonica per la malattia di Fabry. Questo studio ha messo in evidenza che la maggior parte dei *responder* fossero mutazioni con una attività enzimatica residua (non zero), e cioè mutazioni responsabili delle forme atipiche o mild della malattia. Questi dati mostrano quindi come i pazienti d’elezione per la terapia chaperonica siano quelli affetti dalle forme meno severe della malattia di Fabry. Da questi risultati è stato scritto un lavoro recentemente pubblicato nella rivista *Human Mutation*⁽⁵³⁾.

9. CONCLUSIONI

I dati ottenuti dal gruppo di ricerca del Prof. Duro, sebbene riferiti ad un numero ridotto di pazienti, sembrano incoraggianti. Lo studio dei profili di espressione dei microRNA rappresenta uno strumento che si è rivelato molto utile sia nella diagnosi che nell'identificazione di differenti sottocategorie di diverse malattie⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾. L'utilizzo di strumenti diagnostici innovativi nella malattia di Fabry, come i profili di espressione dei microRNA, risulta necessario in tutti quei casi in cui l'analisi genetica non è sufficiente per fornire una risposta diagnostica univoca al clinico. In conclusione, l'utilizzo di un pannello di microRNA circolanti potrebbe rappresentare una nuova frontiera diagnostica in quei soggetti di difficile inquadramento clinico, che potrebbero non essere necessariamente pazienti Fabry.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1) Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. **Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency.** *N Engl J Med.* 1967 May 25;276(21):1163-7.
- 2) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. **Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease.** In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease. 8th ed.* New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3733–74.
- 3) Mehta A, Beck M, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Widmer U. **History of lysosomal storage diseases: an overview.** In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 1.
- 4) Kint JA. **Fabry's disease, α -galactosidase deficiency.** *Science* 1970; 167: 1268.
- 5) Bishop DF, Calhoun DH, Bernstein HS, Quinn M, Hantzopoulos P, Desnick RJ. **Molecular cloning and nucleotide sequencing of a cDNA encoding human α -galattosidase A.** *Am J Hum Genet* 1985; 37: A144.
- 6) Kornreich R, Desnick RJ, Bishop DF. **Nucleotide sequence of the human α -galactosidase A.** *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3301.
- 7) 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; 79(1) 31-40.
- 8) Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW. **Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A).** *Hum Mutat.* 2009 Oct; 30(10):1397-405.

- 9) Inoue T, Hattori K, Ihara K, Ishii A, Nakamura K, Hirose S. **Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study.** *J Hum Genet.* 2013 Aug;58(8):548-52.
- 10) Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Desnick RJ, Hwu WL. **Fabry disease: incidence of the common later-onset α -galactosidase A IVS4+919G→A mutation in Taiwanese newborns - superiority of DNA-based to enzyme-based newborn screening for common mutations.** *Mol Med.* 2012 Jul 18;18:780-4.
- 11) Wittmann J, Karg E, Turi S, Legnini E, Wittmann G, Giese AK, Lukas J, Gölnitz U, Klingenhäger M, Bodamer O, Mühl A, Rolfs A. **Newborn screening for lysosomal storage disorders in Hungary.** *JIMD Rep.* 2012;6:117-25.
- 12) Zizzo C, Colomba P, Albegiani G, Gallizzi R, Iemolo F, Nuzzo D, Vasto S, Caruso C, Duro G. **Misdiagnosis of familial Mediterranean fever in patients with Anderson-Fabry disease.** *Clin Genet.* 2013 Jun;83(6):576-81.
- 13) Böttcher T, Rolfs A, Tanislav C, Bitsch A, Köhler W, Gaedeke J, Giese AK, Kolodny EH, Duning T. **Fabry disease - underestimated in the differential diagnosis of multiple sclerosis?** *PLoS One.* 2013 Aug 28;8(8):e71894.
- 14) Colomba P, Cammarata G, Zizzo C, Scalia S, Francofonte D, Alessandro R, Marsana E, Consoli L, Guttadauria S, Iemolo F, Savica V, Duro G. **Anderson-Fabry: una malattia rara?**, *GTND* 2015; 27 (2):73-77.
- 15) Hoffmann B, Mayatepek E. **Fabry disease-often seen, rarely diagnosed.** *Dtsch Arztebl Int.* 2009 Jun;106(26):440-7.
- 16) Colomba P, Scalia S, Cammarata G, Zizzo C, Francofonte D, Savica V, Alessandro R, Iemolo F, Duro G. **Fabry disease, a complex pathology not easy to diagnose.** *Cardiogenetics*, 2015, DOI: 10.4081/cardiogenetics, 2015;5612

- 17) Lukas J, Giese AK, Markoff A, Grittner U, Kolodny E, Mascher H, Lackner KJ, Meyer W, Wree P, Saviouk V, Rolfs A. **Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease.** *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003632.
- 18) Valbuena C, Carvalho E, Bustorff M, Ganhão M, Relvas S, Nogueira R, Carneiro F, Oliveira JP. **Kidney biopsy findings in heterozygous Fabry disease females with early nephropathy.** *Virchows Arch.* 2008 Oct;453(4):329-38.
- 19) Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, Groener JE, Bemelman FJ, Strijland A, Mannens MM, Aerts JM, Hollak CE. **The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels.** *J Inherit Metab Dis.* 2007 Feb;30(1):68-78. Epub 2007 Jan 5.
- 20) Auray-Blais C, Ntwari A, Clarke JT, Warnock DG, Oliveira JP, Young SP, Millington DS, Bichet DG, Sirrs S, West ML, Casey R, Hwu WL, Keutzer JM, Zhang XK, Gagnon R. **How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease?** *Clin Chim Acta.* 2010; 411(23-24):1906-14
- 21) Germain DP. **Fabry disease.** *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:30.
- 22) Sessa A, Meroni M, Battini G, Amato M, Righetti M, Bertella M, Brambilla P, Bertagnolio B. **'Atypical' clinical variants of Anderson-Fabry disease.** *Nephron.* 2001 Dec;89(4):469-70
- 23) Bartolotta C, Filogamo M, Colomba P, Zizzo C, Albeggiani G, Scalia S, Francofonte D, Cammarata G, Savica V, Duro G. **History of Anderson-Fabry disease.** Abstract pubblicato su atti del convegno: “52nd Congress of the European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association” 28-31 Maggio 2015.
- 24) Pinto LL, Vieira TA, Giugliani R, Schwartz IV. **Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review.** *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:14.

- 25) Morey C, Avner P. **Genetics and epigenetics of the X chromosome.** *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Dec;1214:E18-33.
- 26) Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, Dubourg O, Hagege AA, Eladari D, Jabbour F, Beldjord C, De Mazancourt P, Germain DP. **X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease.** *Clin Genet.* 2015 May 14.
- 27) Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitsu T, Ikeda Y, Yasumi T, Yoshida K, Wada T, Miyake K, Kubota T, Okuno Y, Muramatsu H, Adachi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. **A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele.** *J Clin Immunol.* 2015 Apr;35(3):244-8.
- 28) Weidemann F, Wanner C, Breunig F. **Nomen est omen. Fabry disease.** *Eur J Echocardiogr.* 2008 Nov;9(6):831-2.
- 29) Zizzo C, Monte I, Pisani A, Fatuzzo P, Riccio E, Rodolico MS, Colomba P, Uva M, Cammarata G, Alessandro R, Iemolo F, Duro G. **Molecular and clinical studies in five index cases with novel mutations in the GLA gene.** *Gene.* 2015 Dec 12. pii: S0378-1119(15)01510-3.
- 30) Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, Desnick RJ. **Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alphagalactosidase gene.** *J Clin Invest.* 1989 Apr;83(4):1390-9.
- 31) Maki N, Komatsuda A, Wakui H, Oyama Y, Kodama T, Ohtani H, Kigawa A, Aiba N, Imai H, Motegi M, Yamaguchi A, Sawada K. **A nonsense mutation (R220X) in the alpha-galactosidase A gene causes typical Fabry disease in both genders.** *Clin Nephrol.* 2004 Mar;61(3):185-90.
- 32) Tsukimura T, Chiba Y, Ohno K, Saito S, Tajima Y, Sakuraba H. **Molecular mechanism for stabilization of a mutant α -galactosidase A involving M51I amino acid substitution by imino sugars.** *Mol Genet Metab.* 2011 May;103(1):26-32.

- 33) Garman SC, Garboczi DN. **The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase.** *J Mol Biol.* 2004 19;337(2) 319-35.
- 34) Zhang XY, Asiedu CK, Supakar PC, Khan R, Ehrlich KC, Ehrlich M. **Binding sites in mammalian genes and viral gene regulatory regions recognized by methylated DNA binding protein.** *Nucleic Acids Res.* 1990 Nov 11;18(21):6253-60.
- 35) Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. **Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease.** *Hum Mol Genet.* 1993 Jul;2(7):1051-1053.
- 36) Fitzmaurice TF, Desnick RJ, Bishop DF. **Human alpha-galactosidase A: high plasma activity expressed by the -30G-->A allele.** *J Inherit Metab Dis.* 1997 Sep;20(5):643-57.
- 37) Saifudeen Z, Desnick RJ, Ehrlich M. **A mutation in the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase A gene in high-activity variants inhibits specific protein binding.** *FEBS Lett.* 1995 Sep 4;371(2):181-4.
- 38) Oliveira JP, Ferreira S, Reguenga C, Carvalho F, Månsson JE. **The g.1170C>T polymorphism of the 5' untranslated region of the human alpha-galactosidase gene is associated with decreased enzyme expression--evidence from a family study.** *J Inherit Metab Dis.* 2008 Dec;31 Suppl 2:S405-13.
- 39) Martins AM, D'Almeida V, Kyosen SO, Takata ET, Delgado AG, Gonçalves AM, Benetti Filho CC, Martini Filho D, Biagini G, Pimentel H, Abensur H, Guimarães HC, Gomes JG, Sobral Neto J, D'Almeida LO, Carvalho LR, Harouche MB, Maldonado MC, Nascimento OJ, Montoril PS, Bastos RV. **Guidelines to diagnosis and monitoring of Fabry disease and review of treatment experiences.** *J Pediatr.* 2009 Oct;155(4 Suppl):S19-31.
- 40) Schiffmann R. **Fabry disease.** *Pharmacol Ther.* 2009 Apr;122(1):65-77.
- 41) Motabar O, Sidransky E, Goldin E, Zheng W. **Fabry disease - current treatment and new drug development.** *Curr Chem Genomics.* 2010 Jul 23;4:50-6.

- 42) El Dib RP, Nascimento P, Pastores GM. **Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease.** *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Feb 28;2.
- 43) Czech B, Hannon GJ. **Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes.** *Nat Rev Genet.* 2011 Jan; 12(1): 19–31.
- 44) Rottiers V, Näär AM. **MicroRNAs in Metabolism and Metabolic Disorders.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Apr; 13(4): 239–250.
- 45) Doench JG, Sharp PA. **Specificity of microRNA target selection in translational repression.** *Genes Dev.* 2004 Mar 1; 18(5): 504–511.
- 46) Wang J, Chen J, Sen S. **microRNA as Biomarkers and Diagnostics.** *J Cell Physiol.* 2015 May 29. doi: 10.1002/jcp.25056.
- 47) Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. **Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function.** *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015 Feb;13(1):17-24.
- 48) Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, Senzer N, Eklund AC, Han J, Nemunaitis J. **MicroRNA profile analysis of human prostate cancers.** *Cancer Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):206-16.
- 49) Hou W, Bonkovsky HL. **Non-coding RNAs in hepatitis C-induced hepatocellular carcinoma: Dysregulation and implications for early detection, diagnosis and therapy.** *World J Gastroenterol.* 2013 Nov 28; 19(44): 7836–7845.
- 50) Tan Y, Pan T, Ye Y, Ge G, Chen L, Wen D, Zou S. **Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of Primary Biliary Cirrhosis.** *PLoS One.* 2014; 9(10): e111424.
- 51) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. **Letter to editor.** *Clinica Chimica Acta,* 2001; 308:195-196.

- 52) Poeppel AG, Murray GJ, Medin JA. **Enhanced Filter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease.** *Analytical Biochemistry*, 2005; 337:161-163.
- 53) Lukas J, Scalia S, Eichler S, Pockrandt AM, Dehn N, Cozma C, Giese AK, Rolfs A. **Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease.** *Hum Mutat.* 2015 Sep 29. doi: 10.1002/humu.22910.
- 54) Coşkun S1, Kurtgöz S, Keskin E, Sönmez F, Bozkurt G. **Frequency of mutations in Mediterranean fever gene, with gender and genotype-phenotype correlations in a Turkish population.** *J Genet.* 2015 Dec;94(4):629-35.
- 55) Auray-Blais C, Blais CM, Ramaswami U, Boutin M, Germain DP, Dyack S, Bodamer O, Pintos-Morell G, Clarke JT, Bichet DG, Warnock DG, Echevarria L, West ML, Lavoie P. **Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry.** *Clin Chim Acta.* 2015 Jan 1;438:195-204.
- 56) Fazekas F, Enzinger C, Schmidt R, Dichgans M, Gaertner B, Jungehulsing GJ, Hennerici MG, Heuschmann P, Holzhausen M, Kaps M, Kessler C, Martus P, Putaala J, Ropele S, Tanislav C, Tatlisumak T, Norrving B, Rolfs A. **MRI in acute cerebral ischemia of the young: the Stroke in Young Fabry Patients (sifap1) Study.** *Neurology.* 2013 Nov 26;81(22):1914-21.
- 57) Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, Dichgans M, Martus P, Holzhausen M, Böttcher T, Heuschmann PU, Tatlisumak T, Tanislav C, Jungehulsing GJ, Giese AK, Putaala J, Huber R, Bodechtel U, Lichy C, Enzinger C, Schmidt R, Hennerici MG, Kaps M, Kessler C, Lackner K, Paschke E, Meyer W, Mascher H, Riess O, Kolodny E, Norrving B; Stroke in Young Fabry Patients (sifap) Investigators. **Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study.** *Stroke.* 2013 Feb;44(2):340-9.

- 58) De Brabander I, Yperzeele L, Ceuterick-De Groote C, Brouns R, Baker R, Belachew S, Delbecq J, De Keulenaer G, Dethy S, Eyskens F, Fumal A, Hemelsoet D, Hughes D, Jeanette S, Nuytten D, Redondo P, Sadzot B, Sindic C, Sheorajpanday R, Thijs V, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. **Phenotypical characterization of α -galactosidase A gene mutations identified in a large Fabry disease screening program in stroke in the young.** *Clin Neurol Neurosurg.* 2013 Jul;115(7):1088-93.
- 59) Van Harten AC, Mulders J, Scheltens P, van der Flier WM, Oudejans CB. **Differential Expression of microRNA in Cerebrospinal Fluid as a Potential Novel Biomarker for Alzheimer's Disease.** *J Alzheimers Dis.* 2015;47(1):243-52.
- 60) Perez-Hernandez J, Forner MJ, Pinto C, Chaves FJ, Cortes R, Redon J. **Increased Urinary Exosomal MicroRNAs in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.** *PLoS One.* 2015 Sep 21;10(9).
- 61) Lin J1, Cao Q, Zhang J, Li Y, Shen B, Zhao Z, Chinnaiyan AM, Bronner MP. **MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease.** *Mod Pathol.* 2013 Jan;26(1):148-54.