



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO

CICLO XXII

**SCREENING MOLECOLARE DELLA
SINDROME PARAGANGLIOMA
E
STIMA DELLA PREVALENZA DELL'ALLELE
MUTATO *SDHD* p.Y114C**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof. Maria Luisa Mostacciuolo

Cosupervisore: Ch.mo Prof. Giuseppe Opocher

Dottorando: Viviana Pignataro

INDICE

RIASSUNTO	Pag. 5
ABSTRACT	Pag. 7
1 INTRODUZIONE	Pag. 9
1.1 I PARAGANGLIOMI	Pag. 9
1.1.1 Il feocromocitoma	Pag. 10
1.1.2 Sintomi	Pag. 10
1.1.3 Trattamento	Pag. 11
1.2 PARAGANGLIOMI (PGL) SIMPATICI	Pag. 11
1.2.1 Sintomi e trattamento	Pag. 11
1.3 PGL PARASIMPATICI: HNPs	Pag. 11
1.3.1 Sintomi	Pag. 11
1.3.2 Trattamento	Pag. 12
1.4 DIAGNOSI DEI PGLs	Pag. 12
1.4.1 Diagnosi biochimica	Pag. 12
1.4.2 Diagnosi morfologica	Pag. 12
1.5 LA SINDROME PARAGANGLIOMA	Pag. 13
1.5.1 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO UNO: PGL 1	Pag. 14
1.5.1.1 Modalità di trasmissione della sindrome PGL1	Pag. 15
1.5.1.2 Ipotesi del <i>parent-of-origin effect</i>	Pag. 15
1.5.1.3 Mutazioni a carico del gene <i>SDHD</i>	Pag. 19
1.5.1.4 Effetto fondatore	Pag. 19
1.5.1.5 Individuazione di un'area di endemia per il PGL1	Pag. 20
1.5.2 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO DUE: PGL2	Pag. 21
1.5.2.1 Modalità di trasmissione della sindrome PGL2	Pag. 21
1.5.2.2 Mutazioni a carico del gene <i>SDHAF2</i>	Pag. 22
1.5.3 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO TRE: PGL3	Pag. 22
1.5.3.1 Modalità di trasmissione della sindrome PGL3	Pag. 22
1.5.3.2 Mutazioni a carico del gene <i>SDHC</i>	Pag. 22
1.5.4 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO QUATTRO: PGL4	Pag. 23
1.5.4.1 Modalità di trasmissione della Sindrome PGL4	Pag. 23

1.5.4.2	Mutazioni a carico del gene <i>SDHB</i>	Pag. 23
1.6	PREVALENZA DELLE MUTAZIONI <i>SDHx</i> NEI PGLs	Pag. 23
1.7	IL COMPLESSO MITOCONDRIALE II	Pag. 24
1.7.1	Struttura del complesso mitocondriale II	Pag. 24
1.7.1.1	La testa idrofilica	Pag. 25
1.7.1.2	L'ancora di membrana idrofobica	Pag. 26
1.7.1.3	Interazioni fra le 4 subunità proteiche	Pag. 26
1.8	TUMORIGENESI DEL PGL	Pag. 27
1.8.1	Ipotesi dell'apoptosi	Pag. 27
1.8.2	Ipotesi della pseudo-ipossia	Pag. 28
1.8.3	Ipotesi dello stress ossidativo	Pag. 30
2	SCOPO DELLA RICERCA	Pag. 33
3	MATERIALI E METODI	Pag. 35
3.1	CASISTICA	Pag. 35
3.2	ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO da sangue intero	Pag. 35
3.3	ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO da tampone buccale	Pag. 37
3.4	DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI DNA	Pag. 37
3.5	AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR	Pag. 37
3.6	ELETTROFORESI ORIZZONTALE SU GEL D'AGAROSIO AL 2% p/v	Pag. 39
3.7	PURIFICAZIONE ENZIMATICA DEI PRODOTTI DI PCR	Pag. 41
3.8	SEQUENZIAMENTO DEI FRAMMENTI DI DNA	Pag. 41
3.9	MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE ASSAY (MLPA)	Pag. 43
3.10	ANALISI IN SILICO DEI SITI DI SPLICING	Pag. 45
3.10.1	BDGP	Pag. 45
3.10.2	SplicePort	Pag. 45
3.10.3	Splice-Site Score	Pag. 46
3.11	SORTING INTOLERANT FROM TOLERANT (SIFT)	Pag. 46
3.12	HOMOLOGY MODELING	Pag. 48
3.12.1	Dalla struttura primaria alla predizione della struttura secondaria	Pag. 48
3.12.2	Dalla struttura primaria alla predizione del disordine	Pag. 49
3.12.3	Dalla struttura primaria alla predizione di accessibilità al solvente	Pag. 49

3.12.4	Dalla struttura primaria all'Homology modeling	Pag. 49
3.13	PROGRAMMI DI VISUALIZZAZIONE DI STRUTTURA TERZIARIA	Pag. 51
3.14	DISCRIMINAZIONE ALLELICA	Pag. 51
3.15	DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC)	Pag. 53
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 57
4.1	ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE <i>SDHB</i>	Pag. 58
4.1.1	La variante <i>SDHB</i> c.455C>A p.S152Y	Pag. 59
4.1.1.1	Studio della variante <i>SDHB</i> c.455C>A mediante analisi in silico	Pag. 60
4.1.1.2	Predizione della struttura secondaria	Pag. 60
4.1.1.3	Dalla struttura primaria all'Homology modeling	Pag. 63
4.1.2	La mutazione <i>SDHB</i> c.523G>T p.E175X	Pag. 66
4.1.3	La mutazione <i>SDHB</i> c.702C>T p.Q235X	Pag. 67
4.1.4	La mutazione <i>SDHB</i> c.716delC p.S239FfsX8	Pag. 68
4.1.5	La mutazione <i>SDHB</i> c.725G>A p. R242H	Pag. 68
4.2	ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE <i>SDHC</i>	Pag. 69
4.2.1	La variante c.148 C>T etero; p.R50>C	Pag. 69
4.3	ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE <i>SDHD</i>	Pag. 71
4.3.1	La mutazione <i>SDHD</i> IVS1 +1G>A	Pag. 73
4.3.1.1	Analisi in silico	Pag. 73
4.3.1.2	BDGP	Pag. 74
4.3.1.3	SplicePort	Pag. 74
4.3.1.4	Splice-Site Score	Pag. 76
4.3.2	La mutazione <i>SDHD</i> IVS2 +1G>C	Pag. 76
4.3.3	La mutazione <i>SDHD</i> IVS2 -1G>T	Pag. 79
4.3.4	La mutazione <i>SDHD</i> c.242C>T; p.P81L	Pag. 80
4.4	ANALISI DI DELEZIONE/DUPLICAZIONE	Pag. 81
4.5	STIMA DELLA PREVALENZA DELLA MUTAZIONE <i>SDHD</i> p.Y114C IN TRENTO	Pag. 81
5	CONCLUSIONI	Pag. 85
6	BIBLIOGRAFIA	Pag. 89
	APPENDICE A	Pag. 99

RIASSUNTO

La Sindrome Paraganglioma è una sindrome tumorale ereditaria a carico dei paragangli simpatici e parasimpatici. Nello specifico i tumori associati al sistema simpatico possono originare nella midollare del surrene, ed in tal caso vengono chiamati feocromocitomi, oppure nei gangli simpatici dell'addome e del torace; diversamente i tumori associati al sistema parasimpatico originano nella testa e nel collo e vengono chiamati paragangliomi testa-collo (*Head and Neck Paraganglioma*, HNP).

La Sindrome Paraganglioma si distingue in Sindrome PGL1 (Sindrome Paraganglioma di tipo 1), PGL2, PGL3, PGL4 a seconda che sia causata rispettivamente da mutazioni a carico dei geni *SDHD*, *SDHAF2*, *SDHC* e *SDHB*. La modalità di trasmissione delle Sindromi è autosomica dominante con penetranza incompleta ed espressività variabile, fanno eccezione le sindromi PGL1 e PGL2 in cui si ha manifestazione del fenotipo tumorale solo se la mutazione viene ereditata per via paterna.

Nel presente lavoro 94 pazienti affetti o con sospetta Sindrome Paraganglioma sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni germinali puntiformi, micro-delezioni/inserzioni nei geni di suscettibilità, mediante la tecnica del sequenziamento diretto. Lo screening molecolare ha portato all'identificazione di 10 mutazioni germinali così distribuite: 5 nel gene *SDHB* (p.S152Y, p.E175X, p.Q235X, p.S239FfsX8, p.R242H) 1 nel gene *SDHC* (p.R50C) e 4 nel gene *SDHD* (IVS1+1G>A, IVS2+1G>C, IVS2-1G>T, p.P81L). La percentuale di mutazioni trovata in ciascun gene è in accordo con quanto riportato nel LOVD (*Leiden Open Variation Database*). Per le varianti a significato ignoto è stata effettuata un'analisi in silico sia funzionale che strutturale. Trattandosi tuttavia di predizioni basate su algoritmi probabilistici, l'eventuale ruolo patogenetico di tali varianti è stato valutato analizzandole in un campione sano proveniente dalla stessa popolazione generale.

I pazienti privi di mutazioni puntiformi, micro-delezioni/inserzioni sono stati analizzati per l'eventuale presenza di eventi molecolari più estesi (delezioni/duplicazioni) mediante la tecnica Multiplex Ligation Probe Assay (MLPA). L'analisi effettuata tuttavia non ha mostrato evidenze di possibili delezioni o duplicazioni di interi esoni o dell'intero gene *SDHB*, *SDHC* o *SDHD*.

Lo screening molecolare a carico dei geni di suscettibilità della Sindrome

Paraganglioma ha permesso di identificare nuove mutazioni nonché la presenza di portatori asintomatici, ai quali è stata fornita una diagnosi precoce ed un *follow-up* continuo.

Nel presente lavoro è stata inoltre stimata la prevalenza della mutazione *SDHD* p.C114Y, in un campione generale della popolazione (4.025 individui) presente nelle valli trentine (Val dei Mocheni - Val di Cembra - Altopiano di Pinè), nelle quali era stata precedentemente individuata un'alta incidenza di HNP causata dalla presenza di un "effetto fondatore".

Gli individui sono stati analizzati per la presenza/assenza della mutazione fondatrice *SDHD* p.Y114C, mediante discriminazione allelica e DHPLC. I portatori della mutazione sono stati poi riconfermati mediante sequenziamento diretto. L'analisi effettuata ha permesso di identificare 59 portatori della mutazione: 13 (22%) con storia familiare positiva e 46 (78%) con storia familiare negativa. La stima della prevalenza della mutazione p.C114Y è risultata pari a 1.5%, con una prevalenza maggiore in Val dei Mocheni e progressivamente più bassa nell'Altopiano di Pinè e nella Val di Cembra. Poiché la densità demografica delle valli analizzate è pari a 70.000 abitanti, si può stimare la presenza di circa 1000 carriers della mutazione.

Lo studio effettuato dimostra l'importanza dell'analisi genetica in pazienti affetti o a rischio di sviluppare la Sindrome Paraganglioma.

ABSTRACT

Paragangliomas (PGLs) are rare tumors that derive from sympathetic chromaffin tissue in adrenal (Pheocromocytoma, Pheo) and extra-adrenal abdominal or thoracic locations, or from parasympatetic tissue of the head and neck (HNP). PGL syndrome is caused by germline mutations in the *SDHB* (1p36), *SDHC* (1q21), *SDHD* (11q23) and *SDAF2* (11q13) genes, and it is characterized by variable expression and incomplete penetrance. This syndrome follows an autosomal dominant transmission but, when caused by mutations in the *SDHD* and *SDAF2* genes it behaves as a parent-of-origin disease: inheritance of paraganglioma occurs only when paternally transmitted.

I performed a molecular screening of the *SDHB/C/D* genes in 94 patients with manifestation or suspected of PGL syndrome and I have found 10 mutations (10,6%): 5 mutations in the *SDHB* gene (p.S152Y, p.E175X, p.Q235X, p.S239FfsX8, p.R242H), 1 mutation in the *SDHC* gene (p.R50C) and 4 mutations in the *SDHD* gene (IVS1+1G>A, IVS2+1G>C, IVS2-1G>T, p.P81L). The mutation frequency found in each gene was in agreement with that reported in LOVD (Leiden Open Variation Database).

MLPA analysis, performed on samples resulted negative after molecular screening, did not revealed any rearrangements in the *SDHB/C/D* genes.

Subsequently, I have estimated the prevalence of the founder mutation p.C114Y, just identified in some patients with HNP and coming from Trentino region. 4.025 subjects of the general population living in three Trentino valleys (Val dei Mocheni - Altopiano di Pinè - Val di Cembra) were analyzed. DNA was collected and extracted from buccal swab; all samples were analyzed with Allelic Discrimination and DHPLC and positive samples were then confirmed with direct sequencing. The mutation p.Y114C has been identified in 59 subjects: 46 with a negative family history and 13 with familiarity. The overall prevalence of the mutation was 1.5% with highest prevalence in Mocheni valley and progressively lower prevalence in the Pinè tableland and in Cembra valley. This may suggest the origin of the founder mutation in the Mocheni valley and the following spread to the other two valleys. The living population of this area is more than 70.000 people and we can estimate the presence of 1.000 carriers. This estimation is very

important for the clinical management in positive carriers because they can manifest HNP.

The present study confirms the importance of genetic analysis of patients affected or at risk to develop PGL syndrome.

1 INTRODUZIONE

1.1 I PARAGANGLIOMI

I paragangliomi (PGLs) sono tumori rari, generalmente benigni e altamente vascolarizzati, dei paragangli di pertinenza del sistema nervoso simpatico e parasimpatico (figura 1). I PGLs, come i normali paragangli, sono costituiti da due tipi di cellule: le cellule di tipo I che rappresentano la popolazione neoplastica e possiedono granuli neurosecretori e le cellule di tipo II che sono prive di granuli e quindi non secernono catecolamine¹.

I PGLs associati al sistema simpatico possono originare:

- nella midollare del surrene: in tal caso vengono chiamati feocromocitomi;
- nei gangli simpatici dell'addome e del torace.

I PGLs associati al sistema parasimpatico originano nella testa e nel collo (*Head and Neck Paraganlioma*, HNP). A seconda della sede di insorgenza gli HNP sono suddivisi in PGLs carotidei, PGLs giugulo-timpanici e PGLs vagali.

Nel presente lavoro di dottorato si farà riferimento alla terminologia approvata dall'Organizzazione Mondiale della Salute (*World Health Organization*, WHO) che classifica i tumori cromaffini che originano nella midollare del surrene come feocromocitomi, mentre i restanti tumori (di origine cromaffine e non) come paragangliomi extra-surrenali².

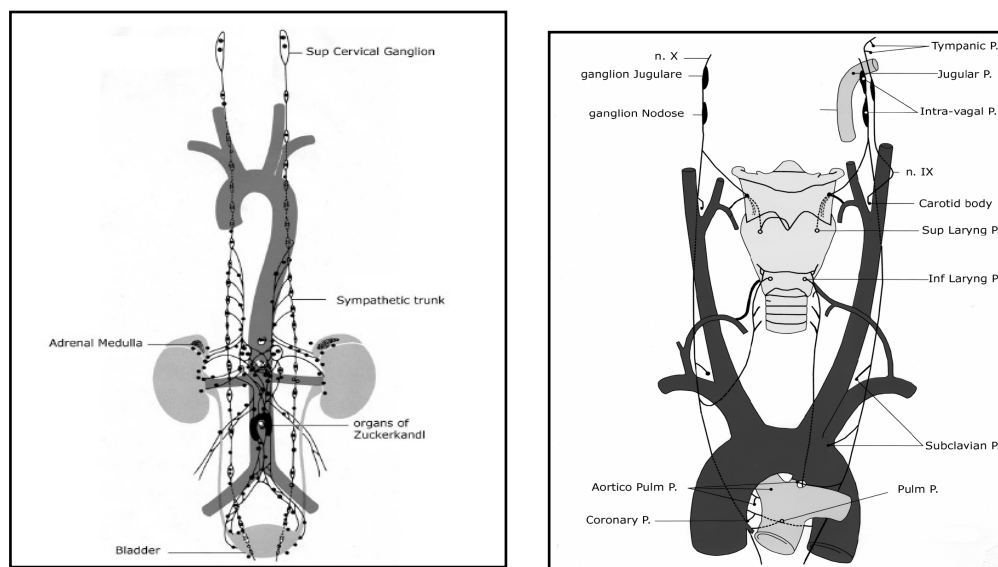


Figura 1: paragangli simpatici (a sinistra) e paragangli parasimpatici (a destra).

1.1.1 Il feocromocitoma

Il feocromocitoma è un tumore secernente catecolamine e, se non identificato e trattato chirurgicamente, può portare a morte. Dal 1920 ad oggi la mortalità è diminuita dal 46% al 1-2%, tale decremento è dovuto in gran parte al trattamento pre-operatorio con farmaci che bloccano le azioni delle catecolamine ed ai progressi nelle tecniche anestetiche utilizzate³. L'incidenza del feocromocitoma è di circa 2-8/1.000.000 per anno, con un picco fra i 50-60 anni, senza differenza di sesso. Il feocromocitoma è responsabile dello 0,2-0,4% dei casi di ipertensione arteriosa⁴. La percentuale di malignità è variabile (2,4-6.7%) e non ci sono prove istologiche che consentono di definirla, l'unico criterio accettato è la presenza di metastasi. Le metastasi a distanza sono solitamente di origine ematologica e sono presenti per la maggior parte nelle ossa, nel fegato e nel polmone⁵. Poiché le metastasi rappresentano l'unico criterio di malignità è importante distinguere fra metastasi e multifocalità, presente soprattutto nelle sindromi ereditarie⁶⁻⁸. I feocromocitomi si possono presentare come tumori sporadici oppure ereditari (più del 25%)^{6,9} ed in tal caso possono essere manifestazione di Sindromi ereditarie quali:

- Sindrome di Von Hippel-Lindau (VHL), causata da mutazioni nel gene oncosoppressore *VHL*¹⁰;
- Neoplasia Endocrina Multipla di tipo 2 (MEN2), causata da mutazioni nel proto-oncogene *RET*¹¹;
- Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), causata da mutazioni nel gene oncosoppressore *NF1*¹²;
- Sindrome Paraganglioma (PGL), causata da mutazioni nei geni *SDHB*¹³, *SDHC*¹⁴, *SDHD*¹⁵ e *SDHAF2*¹⁶.

1.1.2 Sintomi

I sintomi clinici classici possono essere continui o parossistici e comprendono tachicardia, ipertensione, palpitazioni e pallore, perdita di peso, iperglicemia, solo nel 15-24% dei casi è presente la classica triade di sintomi: palpitazioni, mal di testa e sudorazione^{17,18}. I sintomi del feocromocitoma metastatico sono correlati anche con l'infiltrazione del tumore sia in strutture adiacenti che in organi distanti.

1.1.3 Trattamento

Il trattamento d'elezione è la rimozione chirurgica, previo trattamento pre-operatorio con α -bloccanti. Per i casi maligni sono disponibili approcci chemoterapici e radionucleari che non si rivelano curativi, ma riducono i sintomi causati dall'eccesso di catecolamine e l'infiltrazione/compressione del tumore. Non esiste uno specifico trattamento per la prevenzione dell'insorgenza di masse tumorali nei casi ereditari: una diagnosi precoce ed un *follow-up* regolare restano gli unici mezzi disponibili¹⁹.

1.2 PARAGANGLIOMI (PGL) SIMPATICI

Si possono presentare come tumori benigni o maligni ma il rischio di malignità è più elevato rispetto al feocromocitoma, anche in relazione alla presenza di mutazioni in alcuni geni di suscettibilità piuttosto che in altri^{9,20}. Si possono presentare come tumori sporadici o ereditari ed essere quindi manifestazione della Sindrome Paraganglioma.

1.2.1 Sintomi e trattamento

I sintomi sono i medesimi del feocromocitoma; anche nei PGL simpatici il trattamento di scelta consiste nella rimozione chirurgica.

1.3 PGL PARASIMPATICI: HNPs

Si tratta di tumori generalmente non secernenti (95%) e benigni (più del 90%), possono insorgere a qualsiasi età, nel 20% dei pazienti si presentano come lesioni multiple (50% nelle sindromi ereditarie)²¹⁻²⁴.

La sede anatomica più comunemente colpita è il corpo carotideo, un piccolo paraganglio localizzato nella biforcazione dell'arteria carotidea, in grado di monitorare i livelli di ossigeno nel sangue e di stimolare il sistema cardiopolmonare in condizioni di ipossia²⁵.

Si possono presentare come tumori sporadici oppure come tumori ereditari (30%) ed essere quindi manifestazione della Sindrome Paraganglioma. Circa il 20-30% di HNPs con storia familiare negativa hanno una mutazione germinale nei geni *SDHD* o *SDHB*, più raramente nel gene *SDHC*^{7,9,26-31}.

1.3.1 Sintomi

La sintomatologia e l'approccio diagnostico variano in relazione al punto d'insorgenza. L'accrescimento dei PGLs carotidei è spesso silente ed ha

sintomatologia apprezzabile solo quando raggiunge dimensioni tali da dislocare o comprimere strutture vascolari o nervose o costituire massa palpabile solitamente in sede retroangolomandibolare. Nel PGL giugulare, timpano-giugulare e timpanico la sintomatologia consta di ipoacusia trasmissiva accompagnata da acufeni pulsanti sincroni con il polso, oltre all'effetto massa intracranico.

1.3.2 Trattamento

La rimozione chirurgica è necessaria poiché la compressione esercitata dalla massa tumorale può determinare lesioni ai nervi cranici conducendo a disfagia e disfonia.

1.4 DIAGNOSI DEI PGLs

La diagnosi si basa sull'uso di test biochimici e morfologici. I test biochimici da soli si rivelano insufficienti, soprattutto nello screening dei pazienti a rischio^{32,33}.

1.4.1 Diagnosi biochimica

I test biochimici permettono di monitorare i livelli di catecolamine (epinefrine, norepinefrine e dopamina) e i loro metaboliti nel plasma o urine. A causa di una secrezione di catecolamine parossistica le misurazioni biochimiche potrebbero mostrare valori diversi, tuttavia nella maggior parte dei casi sintomatici l'eccesso di catecolamine è comunque presente anche nella fase asintomatica. Il parametro più comunemente utilizzato è rappresentato dalla misurazione delle epinefrine e norepinefrine plasmatiche ed urinarie o matanefrine e normetanefrine plasmatiche ed urinarie, il metodo più sensibile è rappresentato dalla misura delle metanefrine plasmatiche libere³⁴. I falsi positivi potrebbero essere il risultato di una situazione di stress o dell'uso concomitante di farmaci o di prodotti assunti con la dieta (caffèina, nicotina).

Il tipo di catecolamine secrete sono sindrome dipendenti, i feocromocitomi associati alla Sindrome VHL sono più noradrenergici rispetto a quelli associati alla Sindrome MEN2, che mostrano un pattern più frequentemente adrenergico.

1.4.2 Diagnosi morfologica

La tomografia computerizzata (*Computer Tomography*, CT) e la Risonanza Magnetica Nucleare (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) rappresentano i metodi di scelta per la rivelazione di tumori cromaffini. Consentono di visualizzare tumori di dimensioni da 0,5-1 cm, sebbene la CT sia più economica, la MRI viene preferita in termini di sensibilità e di bassa esposizione alle radiazioni ionizzanti,

in quanto appare rilevante nei casi ereditari che vanno incontro ad un *follow-up* continuo³⁵. Alle immagini anatomiche è opportuno però affiancare anche immagini funzionali (medicina nucleare) soprattutto per i tumori primari di piccole dimensioni o per i tumori metastatici per ottenere indicazioni sull'attività endocrina del tumore.

Attualmente esistono tre diversi approcci: la scintigrafia con ¹²³I-MIBG, la tomografia ad emissione di positroni (PET) con ¹⁸F-DOPA o con ¹⁸F-DOPAMINA e la scintigrafia con ¹¹¹In-octreotide (OCTREOSCAN)³⁵. In questi casi il tracciante radioattivo utilizzato ha un uptake quasi esclusivo per il tessuto paragangliare^{36,37}. La tecnica più frequentemente utilizzata è la scintigrafia con ¹²³I-MIBG che mostra una specificità del 95-100% ed una sensibilità del 77-90%. L'uptake dello ¹²³I da parte della tiroide può essere bloccato mediante somministrazione di perclorato. La specificità della PET con ¹⁸F-DOPA o ¹⁸F-DOPAMINA è maggiore rispetto alle altre due tecniche, tuttavia è disponibile solo in pochi centri specializzati^{38,39}.

1.5 LA SINDROME PARAGANGLIOMA

Ad oggi sono stati descritti quattro geni di suscettibilità per la Sindrome Paraganglioma, quali:

1. ***SDHD*** responsabile della Sindrome Paraganglioma di tipo uno: **PGL 1**¹⁵;
2. ***SDHAF2*** responsabile della Sindrome Paraganglioma di tipo due: **PGL 2**¹⁶.
3. ***SDHC*** responsabile della Sindrome Paraganglioma di tipo tre: **PGL 3**¹⁴;
4. ***SDHB*** responsabile della Sindrome Paraganglioma di tipo quattro: **PGL 4**¹³.

I geni *SDHB/C/D* codificano tre delle quattro subunità del complesso mitocondriale II, l'enzima coinvolto nel ciclo di Krebs e nella catena respiratoria mitocondriale⁴⁰, il gene *SDHAF2* codifica per una proteina necessaria per la flavinazione della subunità A codificata dal gene *SDHA*¹⁶.

Mutazioni a carico del gene *SDHA* non sono responsabili dei PGLs, ma di una malattia infantile neurodegenerativa: la Sindrome di Leigh⁴¹. Questa sindrome mostra una modalità di trasmissione autosomica recessiva con sintomi clinici dipendenti dall'area del sistema nervoso centrale colpita. Sorprende il fatto che

mutazioni in due subunità catalitiche che fisicamente interagiscono (subunità A e subunità B) determinino un fenotipo estremamente diverso; la spiegazione sembra risiedere nella concentrazione proteica, maggiore (circa doppia) per la proteina *sdha* rispetto alle proteine coinvolte nel PGL, ne deriva quindi che una mutazione in eterozigosi nel gene *SDHA*, che determinerebbe una riduzione pari al 50% del prodotto proteico (vedi modalità di trasmissione della sindrome), non andrebbe a compromettere l'attività della SDH⁴². Mediante esperimenti di FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) e di elettroforesi in *pulse-field* è stato dimostrato che nel genoma umano il gene *SDHA* è duplicato (5p15; 3q29). Studi di espressione su cellule ibride somatiche di uomo/criceto hanno dimostrato che solo il gene che mappa sul cromosoma 5 è espresso⁴³. Per entrambi i geni è stata determinata la struttura genomica e attraverso sequenziamento è stata identificata una delezione di 1-bp nel gene *SDHA* in 3q29, confermando il suo ruolo di pseudogene⁴⁴. Il gene *SDHA* 5p15, è costituito da 15 esoni e codifica per una flavoproteina di 70 kDa (subunità A) che mostra un'omologia del 95% con la proteina codificata dal gene ortologo bovino.

1.5.1 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO UNO: PGL 1

Il gene *SDHD* mappa sul cromosoma 11 (11q23), è costituito da 4 esoni e codifica per la subunità piccola (subunità D o CybS, 12 kDa) del citocromo b (figura 2).

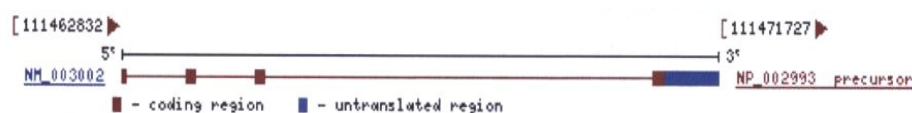


Figura 2: regione genomica, trascritti e prodotti del gene *SDHD*.

Il gene *SDHD* sembra agire come *tumor suppressor gene* nei paragangliomi sia sporadici che ereditari. Occorre ricordare che un individuo che eredita attraverso la linea germinale una mutazione in un *tumor suppressor gene* eredita la predisposizione al tumore, ma non il tumore stesso, e affinché esso insorga è necessario che si verifichi un secondo evento mutazionale (*second hit*), a carico dell'allele *wild type* come l'LOH (*Loss of Heterozygosity*).

L'LOH è il meccanismo sottostante lo sviluppo di alcuni tumori, sia ereditari che sporadici, in cui una singola mutazione in uno dei due cromosomi omologhi del *tumor suppressor gene* non è sufficiente per promuovere la crescita tumorale, mentre la delezione o destabilizzazione dell'allele sull'omologo porta ad una

crescita incontrollata.

1.5.1.1 Modalità di trasmissione della Sindrome PGL1

La Sindrome PGL1 mostra una modalità di trasmissione *parent-of-origin effect*: il fenotipo patologico si manifesta solo se la mutazione viene ereditata per via paterna.

1.5.1.2 Ipotesi del *parent-of-origin effect*

La modalità di trasmissione del gene *SDHD* suggerirebbe modificazioni epigenetiche sesso specifiche avvenute durante la gametogenesi e indicherebbe l'esistenza di *imprinting* genomico²⁴. Il gene *SDHD* tuttavia non è un gene imprintato, esso infatti mostra un'espressione biallelica nel cervello, nel rene e nel tessuto linfonodale¹⁵, non mappa in una regione soggetta a *imprinting*⁶¹ mentre è noto che i geni imprintati mostrano una chiara tendenza a clusterizzare ed infine, il promotore del gene *SDHD* non è metilato nel feocromocitoma o nel tessuto midollare normale⁴⁵.

È stato allora suggerito che l'*imprinting* del gene *SDHD* potesse essere ristretto alle cellule paragangliari, tuttavia la perdita somatica dell'allele *wild type* materno nei portatori della mutazione suggerisce che la progressione verso il fenotipo tumorale sia causata da tale perdita: questo meccanismo non sarebbe possibile se il gene *SDHD* fosse realmente imprintato^{25,46}.

Nel 2004 è stato ipotizzato che il processo di tumorigenesi nei PGLs causati da mutazioni a carico del gene *SDHD* sia da ricercarsi nella perdita somatica materna di altri *tumor suppressor genes* imprintati per via paterna⁴⁵. Sul braccio corto del cromosoma 11 (11p15.5) mappano geni soggetti ad *imprinting*, ovvero geni che mostrano un'espressione differenziale a seconda che siano stati ereditati per via materna o paterna.

Tali geni sono presenti in due cluster, chiamati anche domini⁴⁷ (figura 3):

- ❖ domino 1 in cui mappano i geni *H19* ed *IGF2*;
- ❖ dominio 2 in cui mappano i geni *TSSC3*, *SLC22A1L*, *CDKN1C*, *KCNQ1* e *KCNQ10T1*.

Nel dominio 1 e 2 sono presenti rispettivamente le regioni DMR1 (*Differentially Methylated Region 1*) metilata sul cromosoma paterno e DMR2 (*Differentially Methylated Region 2*, chiamata anche KvDMR1) metilata sul cromosoma materno⁴⁷ (figura 3).

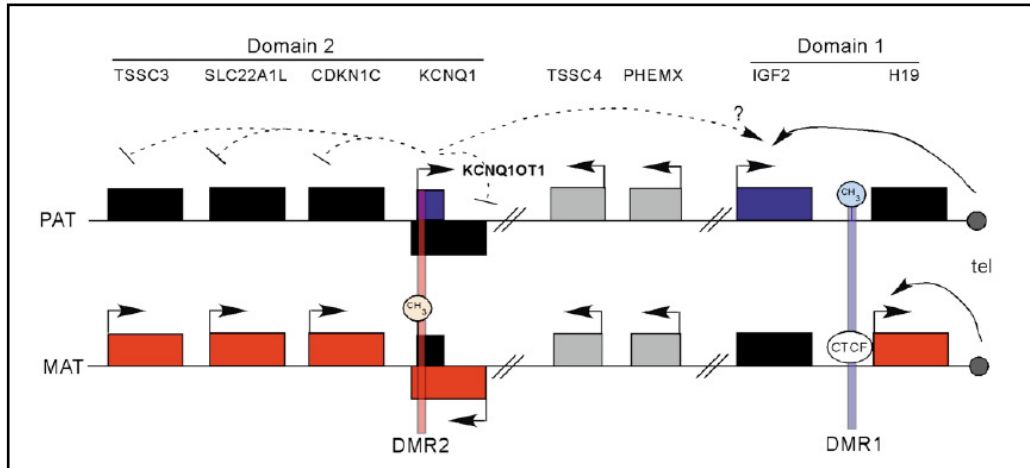


Figura 3: mappa della regione improntata 11p15. I geni espressi dall'allele materno vengono rappresentati in rosso, quelli espressi dall'allele paterno in blu, i geni non improntati in grigio. La direzione della trascrizione viene indicata dalle frecce. La localizzazione di DMR1 e DMR2 è indicata mediante i rettangoli rispettivamente blu e rossi. La metilazione è indicata attraverso il gruppo metile CH_3 ⁴⁷.

Di seguito viene fornita una breve descrizione relativa ai *tumor suppressor genes* improntati che potrebbero essere coinvolti nel meccanismo di tumorigenesi.

H19: mappa nella regione 11p15, ha una dimensione di 2.5 Kb, consta di 5 esoni e codifica per un RNA non tradotto (figura 4) che va incontro ad aggiunta di CAP al 5', splicing e poliadenilazione al 3'. È un gene improntato, espresso solo sul cromosoma materno⁴⁸.

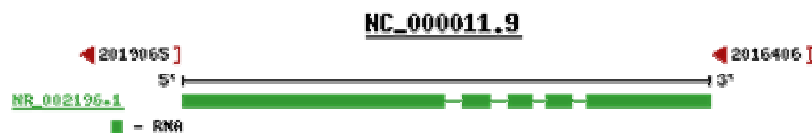


Figura 4: regione genomica, trascritti e prodotti del gene *H19*.

CDKN1C: codifica per un forte inibitore della proliferazione cellulare, in particolare del complesso G1 ciclina/Cdk. Mutazioni in questo gene, espresso solo sul cromosoma materno, sono responsabili di tumori sporadici e della Sindrome di Beckwith-Wiedemann⁴⁹. Sono presenti 2 diverse isoforme: a e b (figura 5).

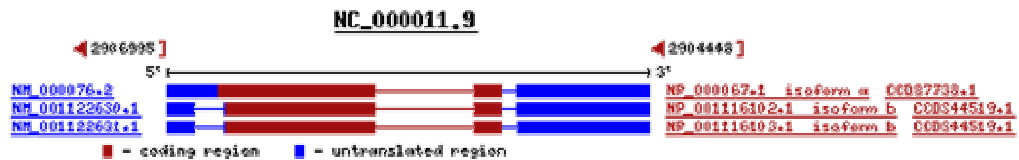


Figura 5: regione genomica, trascritti e prodotti del gene *CDKN1C*.

In un paziente con predisposizione al tumore, e quindi con una mutazione in eterozigosi, la perdita dell'allele *wild type* rappresenta la condizione per la progressione verso il fenotipo patologico. Nel caso del *tumor suppressor gene SDHD* il meccanismo sembra essere diverso a causa della presenza dei *tumor suppressor genes* presenti sul braccio corto del cromosoma 11 che andrebbero ad inibire la progressione tumorale⁴⁵.

La perdita simultanea dell'allele *wild type* e del *tumor suppressor gene* espresso per via materna renderebbe invece possibile la progressione tumorale (figura 6)⁴⁵.

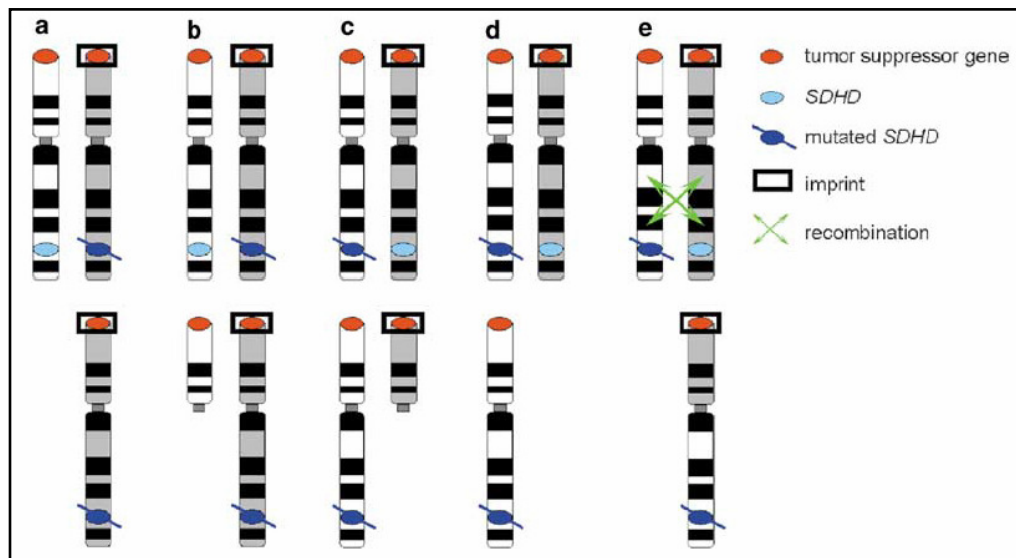


Figura 6: modello proposto da Hensen per la modalità di trasmissione dei PGLs causati da mutazioni nel gene *SDHD*. Cromosoma materno (bianco) e paterno (grigio).

a: gene *SDHD* mutato sul cromosoma paterno, in basso perdita dell'intero cromosoma 11 materno e progressione verso il fenotipo tumorale; b: figura in alto come in a, in basso: perdita del braccio lungo del cromosoma 11 materno. La progressione verso il tumore non è possibile a causa della presenza dei *tumor suppressor genes*; c: gene *SDHD* mutato sul cromosoma materno, in basso perdita del braccio lungo del cromosoma 11 paterno. La progressione verso il tumore non è possibile a causa della presenza dei *tumor suppressor genes*; d: figura in alto come in c, in basso perdita dell'intero cromosoma 11 paterno, non è possibile la progressione verso il tumore; e: figura in alto come in d, ma meccanismo di ricombinazione, quindi progressione verso il fenotipo tumorale⁴⁵.

Secondo il modello di Hensen, quindi, affinché la mutazione nel gene *SDHD* venga ereditata per via materna sarebbe necessaria la perdita simultanea dell'allele *wild type SDHD* paterno e della regione 11p15 non metilata (cioè attiva) materna⁴⁵.

Tutti i lavori presenti in letteratura fino al 2008 confermano che i PGLs causati da mutazioni nel gene *SDHD* si manifestano solo se ereditati per via paterna^{7,30,50-52}.

Tale modalità di trasmissione viene però confutata da Pigny et al.,⁵³ quando nel 2008 identificano in una famiglia con PGL ereditario la mutazione a carico del gene *SDHD* c.129 G>A p.W43X, si tratta di una mutazione patogena già descritta

in letteratura⁵⁴, che causa la comparsa di un codone di STOP con conseguente formazione di una proteina tronca. La mutazione individuata è stata ereditata per via materna. Mediante analisi LOH effettuata sul probando è stata dimostrata la perdita parziale del cromosoma 11 di origine materna. Il risultato ottenuto avvalorava l'ipotesi avanzata da Hensen, anche se non è stata definita con precisione l'ampiezza della regione deleta perchè i marcatori fiancheggianti tale regione non sono risultati informativi. Tuttavia secondo Neumann ed Erlic⁵⁵ una diagnosi non corretta (si tratterebbe di incidentaloma e non PGL) e la presenza di dati molecolari-genetici non completi (non è stata dimostrata la perdita dell'allele *wild type* paterno sul DNA tumorale) renderebbero dubbioso il caso descritto da Pigny.

1.5.1.3 Mutazioni a carico del gene *SDHD*

Mutazioni nel gene *SDHD* conferiscono un'alta suscettibilità allo sviluppo di HNP, soprattutto nel glomo carotideo o giugulo-timpanico e sono responsabili dell'insorgenza di tumori multipli. L'età di comparsa dei PGLs è più precoce quando causata da mutazioni in *SDHD* rispetto a mutazioni in *SDHB* e *SDHC*, con una penetranza dell'86% a 50 anni^{7,30}.

Secondo l'algoritmo di Neumann fra i pazienti con storia familiare positiva per HNP o HNP multipli il primo gene da analizzare è il gene *SDHD*, seguito da *SDHB* e per ultimo *SDHC* (*SDHD*>>*SDHB*>>*SDHC*)⁵⁶.

Non deve essere utilizzato l'algoritmo sopra riportato per i pazienti che appartengono ad aree geografiche ristrette per le quali è stato individuato un "effetto fondatore", in questo specifico caso i pazienti devono essere analizzati per la mutazione fondatrice individuata in quella specifica area.

1.5.1.4 Effetto fondatore

Sino ad oggi sono stati descritti diversi effetti fondatore a seguito di mutazioni nel gene *SDHD*: in Olanda (D92Y, L95P e L139P), negli USA (P81L), in Italia-Toscana (Q109X) e in Spagna (c.337-340 delGATC e W43X)⁵⁷⁻⁵⁹.

Anche nel laboratorio presso il quale ho svolto la presente ricerca è stata individuata, in una specifica area del Trentino, una ricorrente mutazione (p.Y114C) nel gene *SDHD*, facendo presupporre un effetto fondatore (vedi di seguito 1.5.1.5).

L'effetto fondatore è una forma di deriva genetica che si verifica quando un piccolo gruppo si stacca da una popolazione più grande per fondare una nuova colonia. Tale deriva è dovuta a una singola generazione di campionamento casuale, seguita da varie generazioni in cui la popolazione si mantiene di piccole

dimensioni. Si viene così a verificare uno scostamento dall'accoppiamento casuale, occorre però distinguere due diversi tipi di scostamento:

- 1) gli individui possono accoppiarsi in modo non casuale in quanto condividono un certo grado di consanguineità. Se l'accoppiamento fra individui imparentati avviene con frequenza maggiore di quella dovuta unicamente al caso, allora si dice che la popolazione è soggetta a *inbreeding* o *incrocio*. Se l'accoppiamento fra consanguinei è meno frequente di quanto lo sarebbe per caso, si parla di *esoincrocio stretto* (*enforced outbreeding*) o di *inbreeding negativo*.

- 2) può però accadere che gli individui scelgano il proprio partner non in base al grado di parentela, bensì al grado di somiglianza a "un qualche locus". La tendenza di accoppiamento tra simili prende il nome di *accoppiamento assortativo positivo*; la tendenza invece a scegliere partner molto diversi è chiamata *accoppiamento assortativo negativo*.

Sia l'*inbreeding* che l'accoppiamento assortativo positivo hanno lo stesso tipo di conseguenza sulla struttura di una popolazione: una riduzione della variabilità genetica⁶⁰.

1.5.1.5 Individuazione di un'area di endemia per il PGL

In una piccola area geografica del Trentino l'incidenza degli HNP, secondo racconti aneddotici, appariva elevata. Con lo scopo di determinare se alla base di tale fenomeno ci fosse una causa genetica, i pazienti affetti da HNP, provenienti dall'ospedale Santa Chiara di Trento, sono stati analizzati per la ricerca di eventuali mutazioni puntiformi e/o micro-delezioni/duplicazioni, nei geni di suscettibilità della Sindrome Paraganglioma (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*), mediante la tecnica del sequenziamento diretto. Non è stato analizzato il gene *SDHAF2* perché non era ancora noto il suo coinvolgimento in tale Sindrome. I pazienti, appartenenti a diciannove famiglie, apparentemente non imparentate fra di loro, provenivano da una ristretta area geografica della Valsugana - Val dei Mocheni - Val di Cembra. L'analisi effettuata ha permesso di identificare la mutazione *SDHD* c.341G>C p.Y114C in tutti gli individui affetti da HNP. Si tratta di una mutazione missenso, a carico dell'esone 4 del gene *SDHD*, precedentemente descritta in letteratura come mutazione patogena⁶¹. Con lo scopo di determinare se la mutazione individuata provenisse da un ancestore comune è stato ricostruito l'aplotipo dei portatori della mutazione, mediante l'utilizzo di marcatori microsatelliti polimorfici che mappano in una regione di circa 360 Kb, comprendente il locus *SDHD*. La ricostruzione dell'aplotipo ha permesso di

evidenziare che tutti i portatori della mutazione condividevano lo stesso aplotipo. È stato allora consultato il registro presente nell'“Archivio Diocesano” ricostruendo l'albero genealogico delle famiglie oggetto di studio fino al 1.700. Tuttavia non è stato individuato l'antecedente comune avanzando l'ipotesi che la mutazione fosse antecedente al XVII secolo.

L'analisi genetica è stata poi estesa ad altri probandi ed ai loro familiari con lo scopo di individuare altri portatori della mutazione. E' stata valutata la localizzazione del tumore e l'età di esordio: la sede anatomica maggiormente colpita risultava essere il glomo carotideo, un piccolo paraganglio localizzato nella biforcazione dell'arteria carotidea, con età di comparsa della malattia intorno alla terza-quarta decade di vita.

1.5.2 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO DUE: PGL2

Il gene *SDHAF2* mappa sul cromosoma 11 (11q12.2), è costituito da 4 esoni e codifica per una proteina di 167 aminoacidi (figura 7), altamente conservata negli eucarioti e in alcune specie di procarioti, fondamentale per l'attività della SDH.



Figura 7: regione genomica, trascritti e prodotti del gene *SDHAF2*.

Il suo coinvolgimento nella Sindrome Paraganglioma è stato identificato solo di recente, grazie all'utilizzo della proteomica mitocondriale di lievito¹⁶.

La proteina *sdhaf2* interagisce con la subunità catalitica del complesso SDH (subunità A). Non è ancora chiaro se la flavinazione (l'incorporazione del cofattore FAD) della subunità A sia un meccanismo autocatalitico o se richieda la presenza della proteina *sdhaf2*.

1.5.2.1 Modalità di trasmissione della Sindrome PGL2

La Sindrome PGL2 mostrerebbe, allo stesso modo del gene *SDHD*, una modalità di trasmissione *parent-of-origin effect* con penetranza incompleta ed espressività variabile.

1.5.2.2 Mutazioni a carico del gene *SDHAF2*

Nel gene *SDHAF2* è stata individuata la variante c.232G>A, p.G78R, non precedentemente descritta in letteratura, in tre pazienti di una famiglia olandese affetta da PGL ereditario, risultati negativi per lo screening a carico dei geni *SDHB/C/D*. Tale variante è stata testata su 400 individui sani, utilizzati come controllo, con lo scopo di escludere che si trattasse di un polimorfismo, e non è stata individuata in nessuno di questi. L'analisi genetica è stata poi estesa all'intera famiglia, permettendo così di evidenziare che la mutazione segrega con il fenotipo patologico. La mutazione individuata sembrerebbe destabilizzare *sdhaf2* e di conseguenza l'interazione *sdhaf2*-*sdha* ne risulterebbe indebolita¹⁶.

Partendo quindi da una proteina mitocondriale di lievito non precedentemente caratterizzata è stato dimostrato mediante analisi biochimiche e genetiche che la proteina riveste un ruolo cruciale nella biogenesi e nella funzione della catena respiratoria e che la sua inattivazione mutazionale conferisce nell'uomo suscettibilità al tumore.

1.5.3 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO TRE: PGL3

Il gene *SDHC* mappa sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q21.23), sono presenti 4 isoforme, l'isoforma 1, quella di maggiore dimensioni, è costituita da 6 esoni e codifica per la subunità grande (subunità C o CybL, 15 kDa) del citocromo b (figura 8).

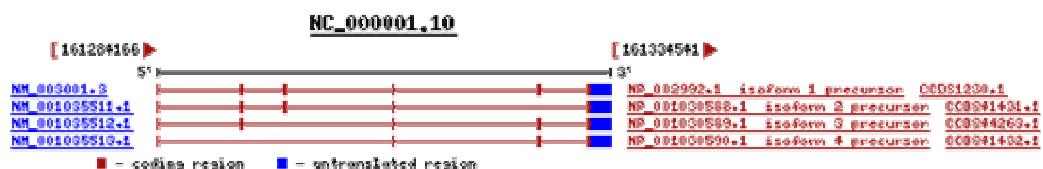


Figura 8: regione genomica, trascritti e prodotti del gene *SDHC*.

1.5.3.1 Modalità di trasmissione della Sindrome PGL3

La Sindrome PGL3 mostra una modalità di trasmissione autosomica dominante, con penetranza incompleta ed espressività variabile.

1.5.3.2 Mutazioni a carico del gene *SDHC*

Mutazioni a carico di tale gene sono state sino ad oggi individuate solo in due pazienti affetti da feocromocitoma⁸; il suo coinvolgimento, invece, in pazienti affetti da PGL o da diade PGL-GIST (*Gastrointestinal Stromal Tumors*, GIST) sembra essere maggiore^{62,63}.

1.5.4 SINDROME PARAGANGLIOMA DI TIPO QUATTRO: PGL4

Il gene *SDHB* mappa sul braccio corto del cromosoma 1 (1p36.13) consta di 8 esoni e codifica per una proteina ferro-zolfo (subunità B) di 27 kDa (figura 9).

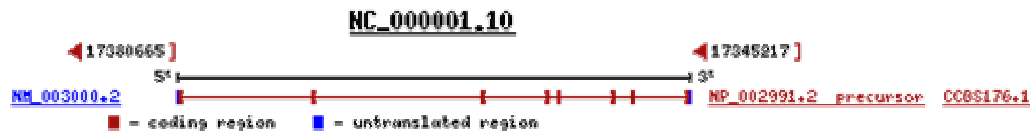


Figura 9: regione genomica, trascritti e prodotti del gene *SDHB*.

Anche il gene *SDHB* sembra agire come *tumor suppressor gene* nei paragangliomi sia sporadici che ereditari.

1.5.4.1 Modalità di trasmissione della Sindrome PGL4

La Sindrome PGL4 mostra una modalità di trasmissione autosomica dominante, con penetranza incompleta ed espressività variabile.

1.5.4.2 Mutazioni a carico del gene *SDHB*

Mutazioni nel gene *SDHB* sono maggiormente associate a feocromocitoma o paraganglioma simpatico con un'elevata percentuale di casi maligni (più del 34%)²⁰.

Secondo l'algoritmo proposto da Neumann questo gene deve essere analizzato per primo nei pazienti con almeno un fattore di rischio per HNP, con storia familiare negativa e con HNP solitari, in caso di esito negativo segue lo screening nel gene *SDHD* ed infine nel gene *SDHC* (*SDHB*>>*SDHD*>>*SDHC*)⁵⁶.

Mutazioni in *SDHB* sono state anche associate con il carcinoma renale a cellule chiare (*Renal Clear cell Carcinoma*, RCC), con il carcinoma papillare della tiroide⁷ (*Papillary Thyroid Carcinoma*, PTC) e con la Diade di Carney: PGL-GIST^{63,64}.

1.6 PREVALENZA DELLE MUTAZIONI *SDHx* NEI PGLs

Gli studi genetici sino ad oggi effettuati suggeriscono che l'8-12,5% dei feocromocitomi non sindromici e con storia familiare negativa sono causati da mutazioni germinali occulte nei geni *SDHB* o *SDHD*^{6,29,31,65,66}. Le mutazioni a carico del gene *SDHC* sembrano essere invece rare^{27,67}.

La frequenza di mutazioni germinali in HNPs non familiari e non sindromici è

maggiormente variabile, l'11-29% sono causati da mutazioni germinali a carico dei geni *SDHx*^{26,28,31,52,57,68}.

1.7 IL COMPLESSO MITOCONDRIALE II

Il complesso mitocondriale II, chiamato anche succinato:ubichinone ossidoriduttasi (SQR) o succinato deidrogenasi (SDH), è uno dei cinque complessi della catena respiratoria mitocondriale (complesso I-V). Tale complesso è responsabile, nel ciclo degli acidi tricarbossilici, dell'ossidazione del succinato a fumarato, e nella catena respiratoria mitocondriale della riduzione dell'ubichinone (UQ) a ubichinolo (QH₂).

Il complesso II, la cui struttura è stata determinata mediante cristallografia a raggi X ad una risoluzione di 2.4 Å dal cuore del maiale⁶⁹, è costituito da due proteine idrofiliche, la flavoproteina (Fp) e la proteina ferro-zolfo (Ip), e da due proteine transmembrana idrofobiche (CybL e CybS). La Fp e la Ip rappresentano il core catalitico solubile costituito dalla subunità A che lega covalentemente il cofattore FAD e dalla subunità B che contiene i clusters ferro-zolfo [2Fe-2S], [4Fe-4S], [3Fe-4S], CybL e CybS, invece, ancorano il complesso alla membrana mitocondriale interna. La SDH può essere classificata in cinque tipi (A-E) in accordo con il numero di subunità idrofobiche e con il numero di gruppi eme, quella mitocondriale appartiene al tipo C e contiene un gruppo eme e due proteine transmembrana: la subunità grande del citocromo C (CybL) e la subunità piccola (CybS)⁶⁹.

Il trasferimento di elettroni dal succinato a fumarato avviene attraverso i cinque gruppi prostetici: il FAD, i clusters Fe-S ed il gruppo eme⁶⁹.

1.7.1 Struttura del complesso mitocondriale II

La SDH mitocondriale contiene 4 proteine:

- 1) la flavoproteina (Fp, 68 kDa, 622 aminoacidi)- *SDHA*
- 2) la proteina ferro-zolfo (Ip, 29 kDa, 252 aminoacidi)- *SDHB*
- 3) una proteina ancora di membrana (CybL, 15 kDa, 140 aminoacidi)- *SDHC*
- 4) un'altra proteina ancora di membrana (CybS, 11kDa, 103 aminoacidi)- *SDHD*.

1.7.1.1 La testa idrofila

La testa idrofila del complesso II è costituita da Fp e da Ip.

Fp è costituita da 4 domini (figura 10):

- 1) un grande dominio che lega il FAD (residui A10-A273 e A361-A445),
- 2) un dominio cap (A274-A360) con una struttura $\beta\alpha\beta\alpha$,
- 3) un dominio elicale (A466-A543),
- 4) un dominio C-terminale (A554-A622) costituito da un loop (A561-A579) e da due foglietti β .

Il dominio che lega il FAD può essere a sua volta suddiviso in tre parti:

1. un sottodominio ammino terminale (A10-A61 e A154-A273),
2. un sottodominio mobile (A62-A153) con due eliche e sette piccoli foglietti β ,
3. un sottodominio (A361-A445) incastrato fra i due sopracitati.

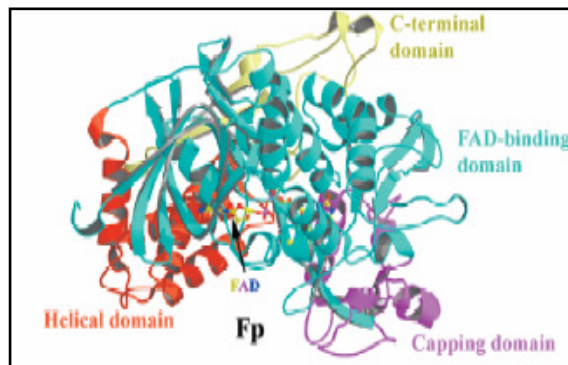


Figura 10: rappresentazione cartoon della flavoproteina (Fp)⁶⁹.

La proteina ferro-zolfo contiene:

- un dominio ammino terminale (B9-B114) costituito da cinque foglietti β ed un piccolo loop per il legame del cluster [2Fe-2S],
- un dominio carbossi terminale (B115-B247) con sei eliche connesse da loops, responsabile del legame del cluster [3Fe-4S] e [4Fe-4S] (figura 11).

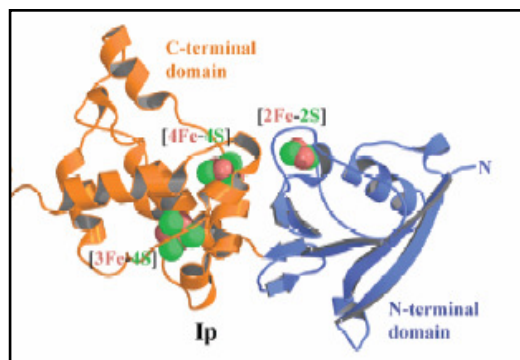


Figura 11: rappresentazione cartoon della proteina ferro-zolfo (Ip). I gruppi prostetici sono rappresentati mediante sfere⁶⁹.

1.7.1.2 L'ancora di membrana idrofobica

Osservato dall'alto l'intero dominio idrofobico contiene due peptidi, assemblati come un fiore: il gruppo eme rappresenta il pistillo e le eliche transmembrana rappresentano le foglie.

La subunità grande del citocromo C (CybL) ha cinque eliche: elica 1L (C7-C21), elica 2L (C36-C66), elica 3L (C70-C80), elica 4L (C84-C114) e elica 5L (C119-C142), la subunità piccola (CybS), invece, possiede quattro eliche: elica 1S (D36-D62), elica 2S (D66-D92), elica 3S (D95-D123) e elica 4S (D126-D136) (figura 12). Entrambe la subunità hanno la porzione ammino terminale che sporge verso la matrice e la porzione carbossi terminale nello spazio intermembrana. La porzione N-terminale di CybL forma un'elica idrofila che interagisce con Ip. Le eliche transmembrana 2L e 4L del CybL e le eliche 1S e 2S di CybS sono tenute insieme e circondate dalle eliche 5L e 3S. 4 residui aromatici Tyr-C100, Phe-C96, Phe-C92, Tyr-C88 tutti presenti nell'elica 4L sono fondamentali per la stabilità della struttura dell'elica.

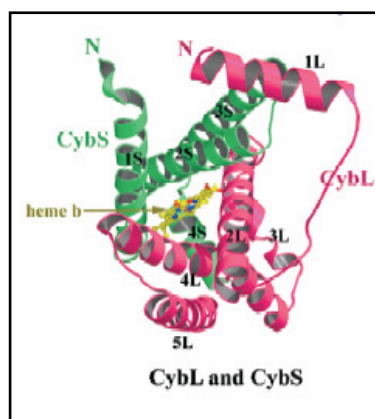


Figura 12: rappresentazione cartoon del CybL e CybS⁶⁹.

1.7.1.3 Interazioni fra le 4 subunità proteiche

Le interazioni fra le quattro subunità della SDH mitocondriale risultano essere cruciali per la sua formazione, funzione e stabilità. Non c'è un'interazione diretta fra Fp e l'ancora idrofobica di membrana, diversamente da Ip che per il 40% della sua area interagisce sia con l'ancora di membrana che con Fp, indicando che la stabilità strutturale del complesso viene conferito dalla proteina Ip. Fra le superfici di contatto delle quattro subunità sono presenti interazioni idrofobiche⁶⁹.

1.8 TUMORIGENESI DEL PGL

La patogenesi dei PGLs non è stata ancora chiarita, di seguito vengono riportate le diverse ipotesi sino ad oggi avanzate.

1.8.1 Ipotesi dell'apoptosi

L'apoptosi, ovvero la morte cellulare programmata, è un processo fondamentale di regolazione biologica, che interviene per eliminare le cellule invecchiate e quelle sviluppate in modo anomalo, eliminando così la propagazione dell'errore.

L'evasione dall'apoptosi rappresenta uno dei meccanismi sottostante lo sviluppo della maggior parte dei tumori⁷⁰.

I mitocondri contribuiscono all'apoptosi mediante il rilascio di proteine tossiche alcune delle quali agiscono in maniera caspasi-dipendenti (citocromo c, Smac/DIABLO), altre in maniera caspasi-indipendenti (AIF e Endo G)⁷¹. Sotto l'induzione del processo apoptotico la membrana mitocondriale esterna diventa completamente permeabile alle proteine mitocondriali tossiche, che vengono rilasciate per dirigere la distruzione cellulare⁷². Durante l'apoptosi il potenziale transmembrana si dissipa e di conseguenza il gradiente protonico non viene mantenuto, viene così abolita la produzione di energia mitocondriale⁷³. Come potenziale meccanismo di tumorigenesi nei PGLs è stato proposto che mutazioni in SDH causino l'inibizione dell'apoptosi, presumibilmente inibendo la partecipazione dei mitocondri al processo apoptotico¹³.

È stato poi proposto che l'inattivazione della SDH determini un accumulo di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e di succinato, è probabile che tale aumento rappresenti un segnale di ipossia per le cellule paragangliari con conseguente iperplasia ed eventuale trasformazione neoplastica (figura 13).

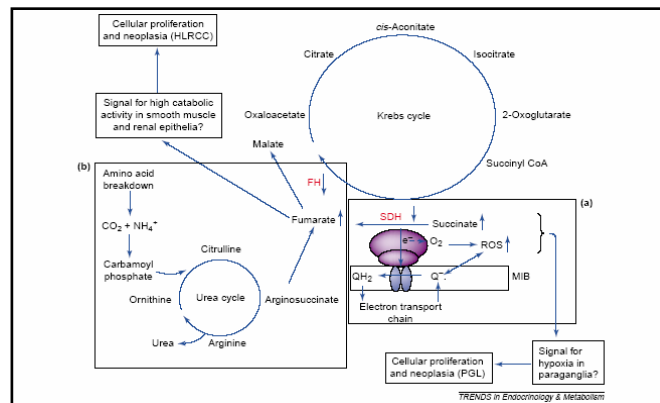


Figura 13: potenziale meccanismo di tumorigenesi nei PGLs.

Se questa ipotesi fosse corretta evitando l'esposizione ipossica si potrebbe ridurre il rischio di sviluppo del tumore. Occorre ricordare che nei PGLs i livelli di ROS possono aumentare a causa della mancata riduzione dell'ubisemichinone (Q[•]) in ubiquinolo (QH₂) e/o a causa della reazione chimica fra gli elettroni in fase di stallo e l'ossigeno molecolare.

L'ipotesi dell'apoptosi viene confermata anche da Lee et al.,⁷⁴ attraverso l'esistenza di un *link* diretto fra l'accumulo di succinato (causato dalla downregolazione della SDH), l'attività della prolil idrossilasi 3 (EglN3) e la successiva evasione dal normale processo di apoptosi neuronale. L'enzima prolil idrossilasi (PHD, chiamato anche EglN) catalizza l'idrossilazione di specifici residui di prolina, esistono 3 diverse EglN: EglN1, EglN2, EglN3. EglN3 induce l'apoptosi dei neuroni, tuttavia la sua inibizione SDH dipendente, ha come effetto la sopravvivenza delle cellule neuronali. Le cellule paragangliari originano dalle cellule del sistema nervoso simpatico e la maggior parte di queste cellule normalmente muoiono durante lo sviluppo grazie al processo di apoptosi.

1.8.2 Ipotesi della pseudo-ipossia

È stato dimostrato che mutazioni nella SDH stimolano nei tumori il *pathway* di risposta all'ipossia^{75,76}. In particolare nei PGLs causati da mutazioni nel gene SDHD sono stati osservati livelli elevati del fattore inducibile l'ipossia HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor, HIF)⁷⁷. La subunità HIF-1 α è una componente ossigeno inducibile del fattore di trascrizione HIF, un eterodimero costituito da HIF- α e HIF- β , che attiva l'espressione di geni coinvolti nell'angiogenesi, nell'eritropoiesi, nel metabolismo energetico e nell'apoptosi^{78,79}. In condizioni di normoxia (tensione di ossigeno normale) l'attività di HIF viene inibita da pVHL (la proteina codificata dal gene *VHL*) attraverso l'interazione fra pVHL ed il dominio di degradazione ossigeno dipendente di HIF-1 α (*Oxygen-Dependent Degradation (ODD) domain*)^{78,79}. Il legame di pVHL ad HIF-1 α è regolato dall'idrossilazione di due specifici residui di prolina (Pro-402 e Pro-564, i numeri si riferiscono ai residui di HIF-1 α umana) presenti nel dominio OOD^{80,81}. Tale modificazione post traduzionale è catalizzata dalla HIF- α PHD e porta alla formazione di due legami idrogeno con la pVHL e alla successiva degradazione di HIF-1 α attraverso il proteosoma^{82,83}.

In condizioni di ipossia o di mutazioni a carico di pVHL, HIF-1 α non viene riconosciuta da pVHL e trasloca nel nucleo dove dimerizza con la subunit  β attivando l'espressione dei geni *target* (figura 14).

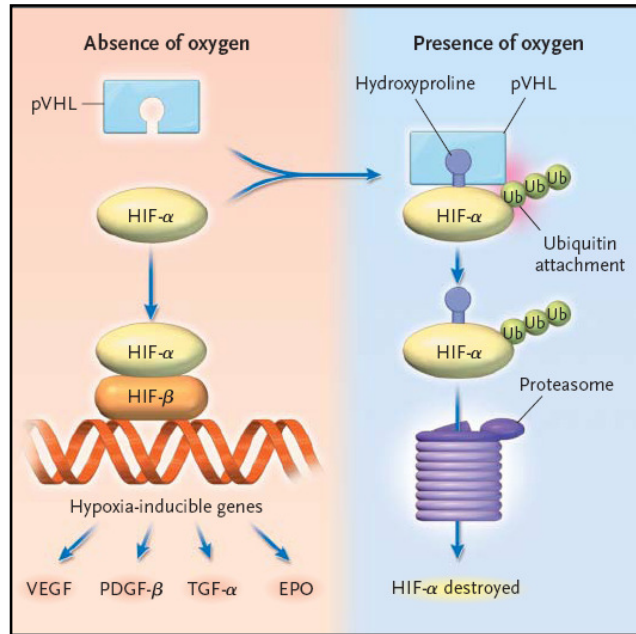


Figura 14: meccanismo di azione di HIF- α in assenza e in presenza di ossigeno⁸⁴.

L'accumulo di succinato come conseguenza della downregolazione della SDH mima di fatto una condizione di ipossia perch  il succinato trasloca dal mitocondrio nel citosol ed inibisce la PHD, HIF-1 α non idrossilata non viene quindi riconosciuta da pVHL e trasloca nel nucleo⁸⁵ (figura 15).

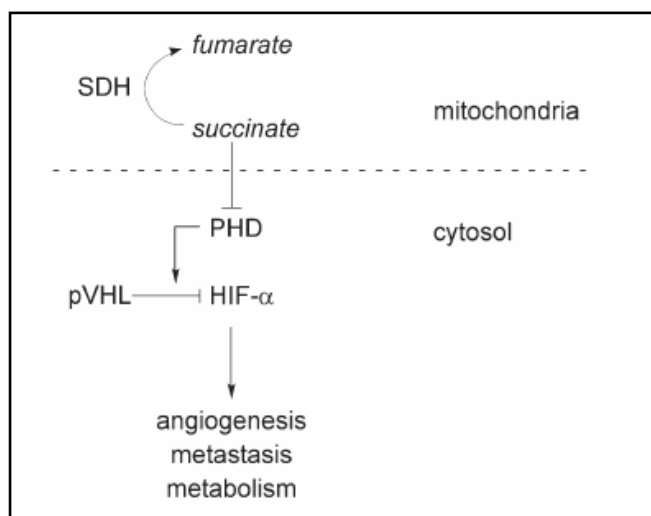


Figura 15: ruolo del succinato nel *pathway* mitocondrio-citosol⁸⁵.

Il succinato funziona quindi come messaggero intracellulare fra mitocondri e citosol ed ha un effetto diretto sull'enzima citosolico PHD e sull'espressione genica. Una significativa riduzione dell'espressione di SDH è stata osservata anche nel carcinoma gastrico e colonrettale⁸⁶, ciò dimostrerebbe il coinvolgimento del succinato nei processi di tumorigenesi, in particolare nella transizione alle forme tumorali più infiltranti. Mediante studi di espressione genica con microarray effettuati su feocromocitoma e PGLs è stato dimostrato che HIF-1 α inibisce la subunità B ed ha quindi una duplice funzione: da una parte attiva l'espressione dei geni *target*, dall'altra inibisce l'attività della SDH⁸⁷ (figura 16).

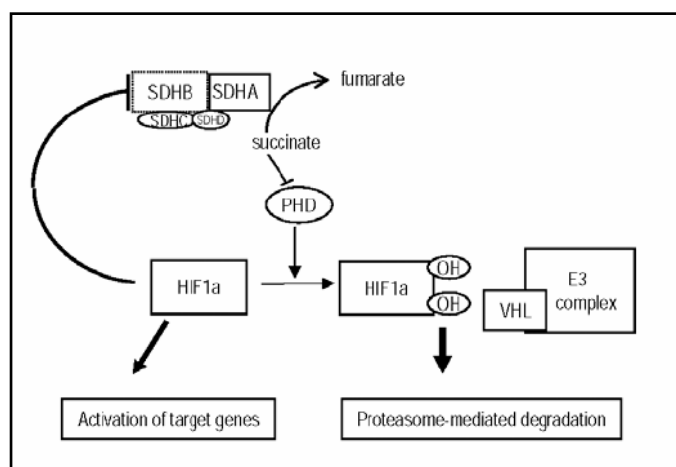


Figura 16: modello proposto di inter-regolazione fra HIF-1 α ed SDHB⁸⁷.

1.8.3 Ipotesi dello stress ossidativo

Lo stress ossidativo è quel processo in cui l'iperproduzione ed il successivo accumulo di radicali liberi nell'organismo, in assenza di un'adeguata capacità difensiva, comporta l'instaurarsi di danni ossidativi a carico di quasi tutti i costituenti dell'organismo, con conseguente insorgenza di patologie a carico dei diversi organi ed apparati⁸⁸. L'accumulo di ROS porta quindi ad un incremento dello stress ossidativo e ad ipermutazioni, specialmente nel DNA mitocondriale (mtDNA). Date le proprietà redox della SDH è stato suggerito un suo possibile coinvolgimento nella produzione di superossidi⁸⁹. L'ubichinone (UQ) nella sua forma ridotta (QH₂) si comporta come un antiossidante proteggendo i fosfolipidi di membrana dalla perossidazione lipidica e le proteine mitocondriali ed il DNA dai radicali liberi indotti dal danno ossidativo⁹⁰. Tuttavia UQ quando semi-ridotto nella forma semi-chinolo (Q⁻) agisce come pro-ossidante. Poiché la SDH è l'unica deidrogenasi capace di mantenere lo stato ridotto di UQ, mutazioni che risultano in una riduzione o perdita di funzione della SDH potrebbero portare ad un maggiore stress ossidativo e possibilmente alla tumorigenesi.

Esperimenti condotti su *C.elegans* hanno dimostrato che mutazioni *mev-1* nella subunità cytb L (l'ortologo della subunità umana C) causano l'alterazione del metabolismo energetico e la produzione di superossidi con conseguenze dirette sulla durata del ciclo vitale che diventa più breve⁹¹.

2 SCOPO DELLA RICERCA

La Sindrome Paraganglioma è una sindrome tumorale ereditaria delle cellule cromaffini del surrene (feocromocitoma) e/o delle cellule paragangliari. È causata da mutazioni a carico dei geni della succinato deidrogenasi (SDH), ad eccezione del gene *SDHA*, responsabile della Sindrome di Leigh. Solo recentemente è stato scoperto un quarto di suscettibilità della Sindrome Paraganglioma, si tratta del gene *SDHAF2*.

Sino ad oggi sono state riportate in letteratura mutazioni germinali puntiformi, micro-delezioni/duplicazioni e delezioni più ampie, a carico dei geni *SDHx*, ad eccezione del gene *SDHAF2* per il quale è stato finora individuata una sola mutazione non senso, responsabile della progressione neoplastica.

Visto il coinvolgimento dei geni *SDHx*, si è voluto analizzare i pazienti affetti da feocromocitoma e/o paraganglioma per la ricerca di eventuali nuove mutazioni in tali geni e per comprendere il meccanismo molecolare sottostante lo sviluppo di tumori cromaffini e non.

Laddove lo screening molecolare porterà all'identificazione di una mutazione germinale, l'analisi genetica verrà stata estesa ai familiari con lo scopo di individuare i portatori della data mutazione asintomatici, offrendo loro una diagnosi precoce ed un *follow-up* continuo. La presenza di varianti di sequenza non descritte in letteratura verrà analizzata mediante opportune analisi in silico e successivamente mediante l'utilizzo di un gruppo di controllo di individui sani con lo scopo di escludere o meno il loro ruolo di polimorfismi (SNPs).

Relativamente alla Sindrome PGL1 (causata da mutazioni nel gene *SDHD*), era stato scoperto un "effetto fondatore" in un'area geografica ristretta del Trentino (Valsugana - Val di Cembra - Altopiano di Pinè). Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di stimare la prevalenza dell'allele mutato in un campione della popolazione generale in cui era stato individuato l'effetto fondatore, con lo scopo di stimare il numero di individui genotipicamente a rischio di sviluppare la neoplasia e di trasmettere la mutazione alla prole.

3 MATERIALI E METODI

3.1 CASISTICA

Nel presente lavoro sono stati analizzati 94 pazienti (52 maschi e 42 femmine) affetti da feocromocitoma o paraganglioma (PGL). Alcuni pazienti con feocromocitoma provengono dall'Unità Operativa di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova e dalle Cliniche Chirurgiche I, II e III del Policlinico Universitario di Padova, altri, invece, sono stati reclutati presso centri quali Torino, Ancona, Firenze.

I pazienti con paraganglioma testa-collo (*Head and Neck Paraganglioma*, HNP) provengono dalle Unità Operative di Otorino-Laringoiatria e di Chirurgia Vascolare dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

Sono stati inoltre analizzati 355 individui provenienti dalla Val dei Mocheni, 1.275 dall'Altopiano di Pinè e 2.395 dalla Val di Cembra, relativamente alla mutazione fondatrice trentina *SDHD* c.341 A>G p.Y114C.

Tutti gli individui (pazienti affetti da Sindrome PGL e individui provenienti dalle valli trentine) hanno fornito il consenso informato per l'esecuzione delle analisi genetiche.

3.2 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO da sangue intero

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue periferico, contenuto in provette con soluzione liquida 8% di EDTA (acido etilendiamminicotetracetico, un chelante che lega gli ioni calcio inibendo in questo modo la cascata coagulativa). I campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA. Il processo di estrazione consta di due fasi:

- fase 1: isolamento manuale dei linfociti,
- fase 2: estrazione del DNA in maniera automatizzata mediante l'utilizzo dell'estrattore QIAcube (Qiagen).

Fase 1:

Procedimento:

- far scongelare a temperatura ambiente la provetta di sangue
- aggiungere circa 2 ml di sangue e 3 ml di RBC 1X (*Red Blood Cell Lysis Buffer*, una soluzione necessaria per la lisi dei globuli rossi) in un tubo Falcon da 15 ml.

La soluzione RBC 10X è stata preparata come di seguito riportato:

- 40,12 g di NH_4Cl
 - 3,1 g di NaHCO_3
 - 3,72 g di NA_2EDTA
 - aggiungere acqua bidistillata (ddH_2O) fino ad un volume finale di 500 ml.
- incubare per 10' a temperatura ambiente, agitando per inversione il tubo falcon
 - centrifugare a 4000 rcf per 10' a temperatura ambiente
 - rimuovere molto lentamente e con continuità il surnatante
 - aggiungere nel tubo falcon 3 ml di RBC 1X e risospendere il pellet
 - centrifugare il tubo falcon a 4000 rcf per 10'
 - aggiungere 500 μl di RBC 1X e risospendere il pellet
 - trasferire il pellet risospeso in una provetta eppendorf sterile da 2 ml
 - centrifugare a 14000 rpm per 1'
 - aspirare il surnatante
 - aggiungere 400 μl di PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e risospendere il pellet.

Fase 2:

L'estrazione procede in modo automatizzato mediante l'utilizzo dell'estrattore QIAcube (Qiagen). Lo strumento è costituito da una centrifuga, uno shaker, necessario per la fase di lisi e un braccio meccanico che permette la manipolazione dei campioni, è possibile processare contemporaneamente dodici campioni.

In una prima fase attraverso l'uso della proteinasi K vengono lisate tutte le proteine presenti nella sospensione di globuli bianchi. L'eluato che si ottiene, viene quindi trasferito in una colonnina contenente una membrana silicea con elevata affinità per il DNA. A questa fase seguono due lavaggi, necessari per rimuovere residui che possono inibire le successive applicazioni. Infine il DNA viene eluito con Buffer AE (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 9.0) e conservato a 4°C. Per questa fase sono stati utilizzati i reagenti del QIAmp DNA

Blood Mini Kit (QIAGEN).

3.3 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO da tampone buccale

L'estrazione del DNA genomico da tampone buccale è avvenuta in maniera automatizzata mediante l'utilizzo dell'estrattore QIAcube, seguendo le indicazioni fornite nel protocollo del QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Tale metodica è stata utilizzata per l'estrazione del DNA dei 4.025 individui provenienti dalle valli trentine.

La presenza di mutazioni nei 94 pazienti affetti da feocromocitoma o PGL è stata confermata a partire da una seconda estrazione di DNA dello stesso campione da tampone buccale.

3.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI DNA

La concentrazione del DNA estratto da sangue intero o da tampone buccale è stata determinata mediante lettura della densità ottica (D.O.), alla lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop (Nanodrop Technology). Questo spettrofotometro UV-Visibile è capace di lavorare con microvolumi di campione, ed eseguire le misurazioni sfruttando una tecnologia, basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquido esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. Una goccia di campione posta sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche e può essere analizzata in modo semplice e veloce.

Durante ogni misurazione, oltre al valore di concentrazione, si può ricavare anche il rapporto $D.O_{260nm}/D.O_{280nm}$, che rappresenta una misura della purezza del campione estratto, dal momento che le proteine assorbono a 280 nm. Valori compresi fra 1,8 e 2,0 sono rappresentativi di campioni di ottima qualità.

3.5 AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è un metodo attraverso cui una sequenza di DNA può essere amplificata esponenzialmente in vitro. Per poter allestire una reazione di amplificazione è necessario conoscere la sequenza fiancheggiante la sequenza bersaglio. Infatti, proprio grazie all'utilizzo di oligonucleotidi sintetici complementari a queste regioni (primer) viene innescata l'amplificazione stessa.

Un tipico ciclo di PCR comprende 3 fasi:

1. Denaturazione dello stampo di DNA che deve essere amplificato (94 – 99°C)
2. Appaiamento (*annealing*) di coppie di primer (55 – 65°C)
3. Estensione da parte di un enzima DNA polimerasi termoresistente, solitamente a 72°C.

La durata di ciascun ciclo dipende dalla lunghezza della sequenza bersaglio che deve essere amplificata. Per garantire l'amplificazione della sequenza bersaglio ed evitare quella di sequenze non specifiche, i primer devono essere costruiti in modo che siano complementari a sequenze il più possibile uniche, evitando quindi regioni altamente ripetute o a bassa complessità.

Per la progettazione dei primer è stato utilizzato il programma Primer Express (Applied Biosystems).

La miscela di amplificazione è stata preparata per i campioni in esame e per un controllo negativo, necessario per valutare l'eventuale presenza di contaminazione biologica, in un volume finale di reazione di 15 µl. I componenti essenziali della miscela di reazione della PCR sono una DNA polimerasi termostabile, primer oligonucleotidici, deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs), ioni magnesio, DNA bersaglio. Per ogni componente si deve determinare una concentrazione ottimale per favorire al meglio l'amplificazione. La concentrazione ottimale dei primer varia da 0,1 a 0,5 µM: concentrazioni più elevate possono promuovere l'accumulo di prodotti aspecifici, che determinano un notevole calo in resa dei prodotti desiderati. I dNTPs devono essere in concentrazioni uguali in modo tale da minimizza gli errori di incorporazione e vengono generalmente utilizzati a concentrazioni comprese fra 50 e 200 µM ciascuno. Essenziale, inoltre, per la PCR è lo ione magnesio (Mg^{2+}), utilizzato in concentrazione variabile tra 0,5 e 3,0 mM, il quale ha una duplice funzione: oltre a rappresentare un cofattore essenziale per la *Taq* DNA polimerasi per l'aggiunta dei nucleotidi durante la fase di sintesi, è in grado di influenzare l'appaiamento dei primer allo stampo. Maggiore è la concentrazione di $MgCl_2$, minore sarà la specificità dell'appaiamento.

Per quanto riguarda invece la DNA polimerasi termostabile, ne esistono di innumerevoli tipi, ciascuna con caratteristiche peculiari (processività, temperatura di funzionamento, ecc) che le rende utili per specifiche applicazioni. In questo caso è stato utilizzato l'enzima AmpliTaq Gold PCR e il buffer fornito dalla ditta Applied Biosystems.

Tutte le reazioni di amplificazione sono state realizzate mediante l'utilizzo del termociclatore Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems), capace di generare

un gradiente di temperatura. È così possibile valutare nella medesima reazione il comportamento della reazione di amplificazione alle varie temperature di *annealing*.

La composizione della miscela di reazione e le condizioni standard utilizzate per le amplificazioni svolte sono riportate nella tabella 1.

Reagenti	[] _f	Step	Temperatura	Durata	Cicli
DNA	50 ng	Attivazione dell'enzima	95°C	10'	1
Buffer 10X	1X	Denaturazione	95°C	45''	35
Ampli Taq Gold 5U/μl	0,5 U	Annealing	T _{ann}	45''	
dNTPs	0,8 mM	Estensione	72°C	45''	
Primer 10 μM each	0,8 μM	Estensione finale	72°C	7''	1
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	Blocco della reazione	4°C	∞	1
ddH ₂ O	Fino a V _f di 15 μl				

Tabella 1: composizione delle reazioni (a sinistra) e condizioni utilizzate per le amplificazioni dei geni *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* (a destra).

Le coppie di primers utilizzate per amplificare i geni *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* sono riportate in appendice A.

3.6 ELETTROFORESI ORIZZONTALE SU GEL D'AGAROSIO AL 2% p/v

L'elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio al 2% (p/v) in TAE è un metodo semplice e veloce che permette di separare, e quindi identificare, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. I frammenti migrano, nel campo elettrico dal polo negativo (catodo) al polo positivo (anodo) in funzione delle cariche elettriche conferitegli dai gruppi fosfato. La velocità di migrazione dipende dalle dimensioni dei frammenti, dalla percentuale dell'agarosio nel gel e dal voltaggio applicato. Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi, mentre, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta super avvolta (*super coiled DNA*).

Procedura:

- in base alle dimensioni della vaschetta usata, sciogliere un'opportuna quantità di agarosio in polvere in un adeguato volume di buffer TAE 1X, scaldando in un forno a microonde finché la soluzione diventa limpida. Il tampone TAE (tris-acetate EDTA) 1X viene diluito da una soluzione madre 50X così composta:
 - Tris-acetato 40 mM 242 g
 - Acido acetico glaciale 57,1 ml
 - EDTA 1 mM a pH 8.0 57,1 ml
 - Aggiungere ddH₂O fino ad un volume finale di 1 litro.
- Aggiungere sotto cappa chimica l'etidio bromuro 10 mg/ml in un concentrazione finale di 1 µg/ml. Versare la soluzione in un supporto piano, precedentemente preparato, in presenza di pettini per la formazione dei pozzetti.
- Attendere la solidificazione del gel.
- Nel frattempo preparare i campioni da caricare: in una provetta da 0,2 ml aggiungere a 3 µl di campione un opportuno volume di tampone di carica Orange G 5X.

Quest'ultimo è una soluzione filtrata e conservata a 4°C di:

- EDTA 10 mM
- Glicerolo 30% v/v, per appesantire il campione in modo da trattenerlo sul fondo del pozzetto ed evitare che diffonda
- Orange G 0,25% p/v, per evidenziare il fronte di migrazione
- ddH₂O, per portare a volume
- Aggiungere nella vaschetta elettroforetica il tampone di corsa TAE 1X ed il gel solidificato. Il tampone di corsa è identico al tampone per la preparazione del gel, per consentire il passaggio di corrente
- Caricare i campioni e 200 ng di marker di peso molecolare (*DNA Molecular Weight Marker VIII*, Roche).
- Applicare una differenza di potenziale di circa 6 V per cm di lunghezza del gel per un tempo sufficiente a far sì che il fronte di migrazione raggiunga circa i 2/3 della lunghezza del gel.
- Osservare il gel su un transilluminatore a luce UV per evidenziare le bande elettroforetiche. L'etidio bromuro è una molecola planare intercalante il DNA a doppio filamento (*dsDNA*) che emette fluorescenza a 590 nm (regione rosso-arancio dello spettro del visibile) quando irradiato da luce UV a 260-300 nm.

L'esposizione al transilluminatore non dovrà avvenire per un periodo di tempo

eccessivamente lungo perché l'etidio bromuro eccitato induce la rottura e/o la dimerizzazione della doppia elica.

3.7 PURIFICAZIONE ENZIMATICA DEI PRODOTTI DI PCR

La presenza di eventuali primer o dNTPs in eccesso presenti in soluzione insieme al prodotto di PCR potrebbero interferire con il sequenziamento, a tale scopo è necessario che i prodotti di PCR vengano purificati. La purificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo dell'enzima ExoSAP-IT[®] (USB Corporation).

L'ExoSAP-IT[®] si basa sull'azione di due enzimi idrolitici:

- un'esonucleasi (EXO1) che rimuove i primer in eccesso ed ogni eventuale DNA a singolo filamento (ssDNA) estraneo dal prodotto dalla PCR,
- una fosfatasi alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase) che elimina i dNTPs non incorporati dalla reazione di PCR idrolizzandoli a nucleosidi e fosfato organico.

10 µl del prodotto di amplificazione sono stati purificati mediante l'aggiunta di 2 µl dell'enzima ExoSAP-IT[®], sono seguite poi le 2 fasi di seguito riportate:

- 37°C – 15' (*fase di attivazione enzimatica*)
- 80°C – 15' (*fase di inattivazione enzimatica*)

I campioni così purificati sono stati conservati a 4°C fino al momento del sequenziamento.

3.8 SEQUENZIAMENTO DEI FRAMMENTI DI DNA

La reazione di sequenziamento avviene tramite la sintesi di DNA usando nucleotidi marcati ed uno dei due primer usati per la reazione di amplificazione. Oltre ai normali precursori nucleotidici (dNTPs), la sintesi del DNA avviene anche in presenza di nucleotidi modificati (ddNTPs) che inducono l'interruzione della sintesi di DNA. Ciascuno dei quattro ddNTPs è legato ad un fluoroforo che emette fluorescenza a diversa lunghezza d'onda.

Il processo di sequenziamento prevede un'iniziale fase di incorporazione dei nucleotidi marcati nella molecola da sequenziare seguita da una fase in cui i

frammenti vengono separati mediante un'elettroforesi capillare in cui la corsa dei frammenti, la rilevazione delle bande e l'identificazione delle basi avvengono in modo completamente automatico.

La reazione di amplificazione prevede l'utilizzo di una miscela preconstituita detta Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) contenente una DNA polimerasi, alla quale vengono aggiunti il primer ed il campione da sequenziare.

La miscela di reazione, del volume totale di 10µl, è così composta:

- 2 µl di Big Dye[®] Terminator Sequencing RR-100
- 2 µl Sequencing Buffer 5X
- 1 µl di primer (concentrazione finale 1,6 µM)
- 4 ng di campione ogni 100 bp di sequenza amplificata
- un adeguato volume di ddH₂O per raggiungere il volume finale di 10 µl.

La miscela viene poi sottoposta a 25 cicli di amplificazione secondo il seguente schema:

- *fase di denaturazione*: 96°C – 10''
- *ibridazione del primer*: 50°C – 5''
- *fase di estensione*: 60°C – 4'

L'amplificato così ottenuto deve essere nuovamente purificato prima di procedere con l'elettroforesi su capillare per eliminare i ddNTPs marcati presenti in eccesso in soluzione che altrimenti potrebbero causare un aumento del rumore di fondo.

A tale scopo è stato utilizzato il protocollo di purificazione AutoSeq[™] G-50 (Amersham Biosciences).

Procedura:

- Risospendere delicatamente la resina nella colonnina usando il vortex e successivamente rimuovere la chiusura posta sul fondo.
- Riporre la colonnina in una provetta da 1,5 ml che funge da supporto e centrifugare per 1' a 2000 rcf. La superficie della resina assume così una forma angolata.
- Riporre la colonnina in una nuova provetta da 1,5 ml.
- Applicare il DNA marcato al centro della superficie della resina.

- Centrifugare nuovamente per 1' a 2000 rcf. Il DNA purificato viene così eluito dalla colonna
- Aggiungere infine 5 µl di formammide.
- A questo punto il campione è pronto per poter essere caricato nel sequenziatore automatico (GA3130XL DNA sequencer, Applied Biosystems, Monza, Italia).

Durante l'elettroforesi, il campione viene colpito da un laser ed emette fluorescenza che viene rilevata da un sensore; il segnale elaborato da un opportuno software mostra infine in forma grafica a quattro colori la sequenza del DNA.

L'analisi dei file di sequenza è stata effettuata mediante i software Chromas (Technelysium Pty Ltd) e SeqScape (Applied Biosystem).

3.9 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE ASSAY (MLPA)

Lo screening genetico dei pazienti mediante la tecnica del sequenziamento diretto permette l'identificazione di microdelezioni e/o microduplicazioni, ma non permette l'identificazione di eventi più estesi. Per tale ragione è stato necessario proseguire l'analisi per valutare la presenza di eventuali delezioni e/o duplicazioni che interessassero interi esoni o l'intero gene, mediante la tecnica Multiplex Ligation Probe Assay (MLPA).

Si tratta di una tecnica semplice che permette di analizzare contemporaneamente più di 96 campioni con risultati disponibili dopo 24 ore, richiede l'utilizzo di un termociclatore e di un'elettroforesi su capillare. Caratteristica tipica di questa tecnica è l'amplificazione delle sonde (*probes*) che ibridano con la sequenza *target* e non l'amplificazione della sequenza *target* stessa. Può essere paragonata alla Multiplex-PCR, ad eccezione però dei primers, l'MLPA richiede la presenza di una singola coppia di primer.

Una tipica reazione MLPA può essere suddivisa in 4 steps (figura 17):

- 1) Denaturazione del DNA e ibridazione delle sonde MLPA.
- 2) Reazione di ligazione.
- 3) Reazione di amplificazione.
- 4) Separazione dei prodotti amplificati mediante elettroforesi.

Durante il primo step il DNA viene denaturato ed incubato *overnight* con la *mix* di *probes*. I probes MLPA consistono di 2 oligonucleotidi separati, ciascuno contenente una delle sequenze dei primers. I 2 oligonucleotidi ibridano con la

rispettiva sequenza *target* (figura 17 – step 1), solo quando entrambe le sonde sono ibrydate possono essere ligate durante la reazione di ligazione (figura 17 – step 2). Poiché solo le sonde ligate possono essere amplificate (figura 17 – step 3), il numero di prodotti di sonde ligate rappresenta una misura del numero di sequenze *target* presenti nel campione. Le sonde non ligate invece non possono essere amplificate e non generano un segnale, non è quindi necessaria la loro rimozione rendendo così la metodica di facile esecuzione.

I prodotti di amplificazione (range di lunghezza: 130-480 nucleotidi) vengono separati mediante elettroforesi su capillare (figura 17 – step 4) ed il risultato analizzato mediante opportuni software.

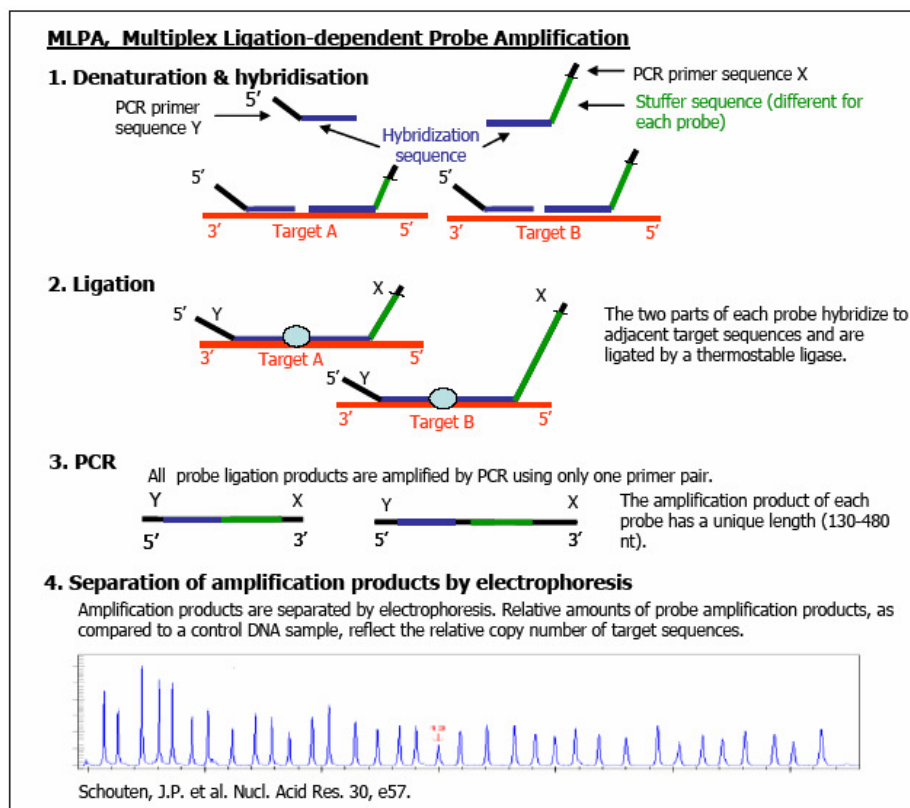


Figura 17: rappresentazione step by step della Multiplex Ligation-dependent Probe Assay (MLPA).

Per stabilire quali sono i campioni con un numero aberrante di copie è necessario confrontare il risultato di ciascun campione con quello di un campione di riferimento che si sa essere privo di delezioni/duplicazioni a carico dei geni che si vogliono analizzare. Delezioni in eterozigosi di una specifica sequenza dovrebbero dare una riduzione dell'area del picco del prodotto di amplificazione relativo a quella sonda del 35-50%. L'analisi dei file di sequenza è stata effettuata

mediante il software Peak Scanner (Applied Biosystem).

Nel presente lavoro è stato utilizzato il SALSA MLPA KIT P226-A2 SDHD che contiene le sonde per tutti gli esoni del gene *SDHB*, *SDHC* ed *SDHD* ad eccezione del gene *SDHA*. Il kit contiene 27 sonde che generano prodotti di amplificazione di dimensione fra 130 e 337 nucleotidi. In aggiunta contiene 9 frammenti di controllo: 4 Q-frammenti (DNA Quantity fragments) di dimensioni di 64-70-76-83 nucleotidi e 3 D-frammenti (DNA denaturation control fragments) di 88-92-96 nucleotidi, un frammento-X di 100 nucleotidi ed uno Y di 105.

Ciascuna reazione è stata allestita seguendo le indicazioni fornite nel protocollo.

3.10 ANALISI IN SILICO DEI SITI DI SPLICING

Lo screening genetico effettuato nei pazienti affetti da feocromocitoma e/o PGL ha portato all'identificazione di sostituzioni nucleotidiche nel sito donatore (*gt*) ed accettore di splicing (*ag*).

Poichè l'RNA non era disponibile tali sostituzioni sono state analizzate mediante l'utilizzo di tre programmi di predizioni dei siti di splicing, di seguito riportati:

- BDGP: http://www.friutfly.org/seq_tools/splice.html
- SplicePort: <http://www.spliceport.org>
- SpliceSiteScore: http://rulai.cshl.edu/new_alt_exon_db2/HTML/score.html

3.10.1 BDGP

Il programma può essere utilizzato per la predizione dei siti di splicing presenti in *Drosophila melanogaster* e nell'uomo. È possibile dalla sezione organism selezionare quello di interesse. Per il calcolo dello score del sito di splicing al 5'(sito donatore) utilizza i 15 nucleotidi fiancheggiati il sito individuato (-7 +8 nc) e 41 nucleotidi (-21 +20 nc) per quello al 3'.

Il programma però non distingue fra i siti criptici di splicing e quelli reali, se si vuole pertanto analizzare una mutazione per la sua capacità di attivare un sito criptico è necessario effettuare un test funzionale.

3.10.2 SplicePort

Nell'input è sufficiente inserire la sequenza di interesse (DNA o RNA) in formato FASTA, la lunghezza della sequenza (almeno 80 nucleotidi downstream e 80 nucleotidi upstream il sito di splicing di interesse) determina il tempo richiesto per





la predizione (~1s/kb) ed il risultato viene mostrato in formato tabellare (figura 18). Per ciascuna predizione si ottengono diverse informazioni quali: sito di splicing donatore/accettare, la localizzazione del sito all'interno della sequenza fornita, una breve sequenza fiancheggiante il sito individuato ed uno score. I valori di sensibilità sono di 88.5% e 88.8% rispettivamente per i siti donatori ed accettori corrispondenti ad uno score pari a 0, è possibile modificare tali valori modificando lo score threshold.

Description of Sequence: >reflNC_000010.9NC_000010:49279693-49313189 Homo sapiens chromosome 10, reference assembly, complete sequence, MAPK8 mitogen-activated protein kinase 8 [Homo sapiens]

Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.51% and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.54% for AG locations.

Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 86.99% and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.41% for GT locations.

Show: Acceptor Donor Location: Short Sequence: Score Threshold: 0 Browse Features:

Donor:	139	gtatggaagt	1.24401	
Acceptor:	208	aatttagatacc	0.0359553	
Acceptor:	3208	attacagcgag	0.973571	
Donor:	3338	aaaatgtaagt	0.64001	

(A)

Figura 18: esempio di tipico output ottenuto mediante SplicePort. I valori di sensibilità sono cerchiati in rosso. Dalla tabella è possibile selezionare un sito predetto (nell'esempio è stato selezionato il sito donatore presente in posizione 139) ed ottenere le caratteristiche di quel sito cliccando su Browse Features, come mostrato dal cerchio e dalla freccia.

3.10.3 Splice-Site Score

Lo score rappresenta il grado di match fra la sequenza di splicing fornita nell'input (query) e la sequenza consensus. Un match del 100% con il sito di splicing al 3' **tt ttccc tccag|G** dovrebbe avere uno score di 14.2, mentre quello al 5' **AAG|gtaagt** uno score pari a 12.6. La media dello score dei siti di splicing al 3' negli esoni costitutivi è di 7.9 e di 8.1 per quelli al 5' (i parametri originali sono stati forniti da Dr. Michael Zhang, CSHL; le analisi statistiche calcolate da Dr. Tetsushi Yada).

3.11 SORTING INTOLERANT FROM TOLERANT (SIFT)

Lo screening genetico effettuato nei pazienti affetti da feocromocitoma e/o PGL ha portato all'identificazione di varianti di sequenza, non descritte in letteratura, il cui effetto è stato analizzato in silico, mediante l'utilizzo del programma SIFT (<http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>). Si tratta di un programma che attraverso

algoritmi probabilistici predice gli effetti di una sostituzione amminoacidica. SIFT effettua un multi-allineamento fra la sequenza proteica di interesse (*query*) e quelle omologhe interrogando uno dei seguenti database: SWIS-PROT, SWISS_PROT/TrEMBL, NCBI.

L'input è costituito dalla *query* e dalla descrizione della variante individuata, nell'output si ricevono informazioni sulla sostituzione che può essere predetta come tollerata oppure avere effetti sulla funzione proteica, viene fornito anche un valore di score (figura 19). Lo score rappresenta la probabilità normalizzata che la sostituzione amminoacidica venga tollerata, SIFT predice sostituzioni con score inferiore a 0.05 come deleterie.

```
Substitution at pos 1426 from S to P is predicted to AFFECT PROTEIN FUNCTION with a score of 0.02.  
Median sequence conservation: 2.90  
Sequences represented at this position:26  
  
Substitution at pos 1432 from N to K is predicted to be TOLERATED with a score of 0.08.  
Median sequence conservation: 2.90  
Sequences represented at this position:26  
  
Substitution at pos 1445 from D to N is predicted to AFFECT PROTEIN FUNCTION with a score of 0.01.  
Median sequence conservation: 3.66  
Sequences represented at this position:21  
WARNING!! This substitution may have been predicted to affect function just because  
the sequences used were not diverse enough. There is LOW CONFIDENCE in this prediction.
```

Figura 19: un esempio di predizione di un cambiamento amminoacidico ottenuta mediante l'utilizzo del programma SIFT. Sostituzioni con score inferiore a 0.05 sono predette avere effetti sulla funzione proteica.

Per ovviare alla presenza di FP (Falsi Positivi: sostituzioni neutre vengono predette come deleterie), che dipendono dalle sequenze proteiche utilizzate nel multi-allineamento, SIFT calcola il valore di conservazione media, ovvero la diversità delle sequenze utilizzate nell'allineamento.

La conservazione viene calcolata per ciascuna posizione nell'allineamento ottenendo in tal modo la media di tali valori, in un range con valore massimo di 4.32: la posizione è completamente conservata ed è presente un solo residuo amminoacidico ed un valore minimo di 0: in quella specifica posizione sono presenti tutti i 20 amminoacidi. Di default il programma costruisce allineamenti con un valore di conservazione pari a 3.0, predizioni basate su allineamenti con valori di conservazione maggiori porterebbero ad un numero di FP più elevato (figura 20).

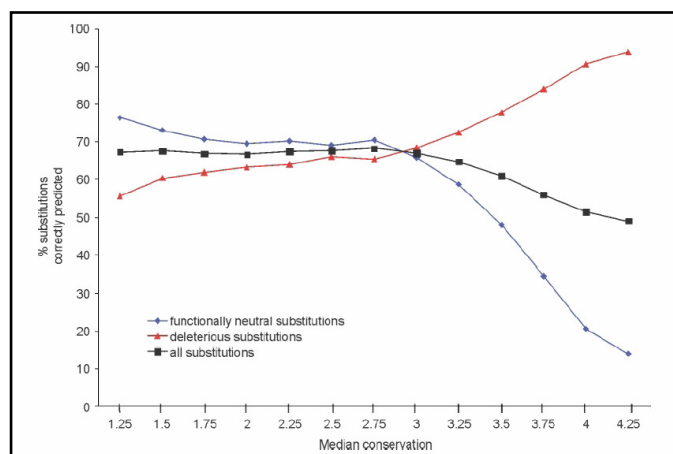


Figura 20: le predizioni dipendono dalla diversità delle sequenze utilizzate nell'allineamento. All'aumentare del valore di conservazione media aumentano le sostituzioni predette deleterie.

Se il programma fornisce una predizione basata su un valore di conservazione superiore a 3.0 è sufficiente che SIFT fra i 3 possibili database a disposizione ne interroghi un altro di dimensioni maggiori rispetto a quello utilizzato.

3.12 HOMOLOGY MODELING

La struttura tridimensionale di una proteina fornisce informazioni importanti per comprenderne la funzione, tuttavia il numero di sequenze proteiche note è maggiore rispetto al numero di strutture risolte sperimentalmente e depositate in PDB (*Protein Data Bank*). È possibile predire la struttura 3D di una proteina a partire dalla sua struttura primaria (la sequenza amminoacidica) mediante l'utilizzo di server di Homology modeling, tuttavia è necessario predirne prima la struttura secondaria. Attualmente, grazie all'utilizzo di sistemi bioinformatici, è possibile a partire dalla struttura primaria ottenere predizioni su: struttura secondaria, accessibilità al solvente, disordine, presenza di repeats e di regioni transmembrana.

3.12.1 Dalla struttura primaria alla predizione della struttura secondaria

In questo progetto sono stati utilizzati i programmi di predizione di struttura secondaria PSIPRED e SPRITZ con lo scopo di ottenere una predizione consensus.

PSIPRED calcola la propensione per struttura secondaria del residuo su una finestra di 15 amminoacidi.

Dal server SPRITZ è possibile ottenere la predizione di struttura secondaria e del disordine. L'output viene fornito tramite e-mail, sotto forma di testo organizzato secondo tre righe informative relative alla sequenza amminoacidica, alla struttura secondaria: alpha-helix (H), extended beta-strand (E) e coil (C) e alla predizione del disordine.

3.12.2 Dalla struttura primaria alla predizione del disordine

Lo stato disordinato è indicativo della presenza di regioni maggiormente plasmabili alle modificazioni indotte da variazioni ambientali o alle interazioni con ligandi. Per la predizione del disordine è stato utilizzato il protocollo di SPRITZ che fornisce un'indicazione sulle regioni intrinsecamente disordinate (D) rispetto a quelle ordinate (O) della proteina.

3.12.3 Dalla struttura primaria alla predizione di accessibilità al solvente

La superficie di accessibilità è determinata dalla superficie di vander-Waals più la metà dello spazio che occupa una molecola d'acqua. Per la predizione di accessibilità è stato utilizzato il server ConSeq che ad ogni residuo associa una gradazione di colore in base al grado di conservazione, e la propensione allo stato exposed (e) o buried (b) secondo la predizione fatta da una rete neurale appositamente addestrata.

3.12.4 Dalla struttura primaria all'Homology modeling

L'Homolgy modeling consente di predire-“modellare” la struttura 3D di una proteina (*target*) sulla base di un allineamento di sequenza con una proteina simile a struttura nota (*templato*).

L'Homolgy modeling consta di 4 steps:

- 1: identifica le proteine *templato* evolutivamente relazionate con la proteina *target*,
- 2: effettua un allineamento fra *templato* e *target*,
- 3: costruisce un modello 3D sulla base dell'allineamento,
- 4: valuta la qualità del modello risultante.

Il corretto allineamento fra *templato* e *target* rappresenta lo step cruciale nonché la fonte primaria di errori dell'intera procedura di modeling. La maggiore limitazione di questa tecnica è rappresentata dalla disponibilità di templati omologhi, solo le regioni proteiche del *target* corrispondenti al *templato*

identificato possono essere modellate accuratamente. Tuttavia nei casi in cui la struttura del *templato* non sia disponibile è possibile utilizzare metodi di predizione *de novo*, tale predizione però è limitata a proteine relativamente piccole. Il modeling di proteine oligomeriche (proteine costituite da 2 o più catene polipeptidiche) risulta essere semplice nei casi in cui il *target* sia simile al *templato* oligomerico. Tale situazione si dimostra però rara, la maggior parte delle strutture risolte sperimentalmente e depositate in PDB consistono infatti di proteine monomeriche piuttosto che oligomeriche.

Il server più utilizzato per l'Homolgy modeling è SWISS-MODEL, accessibile dal server del'ExpASY o dal programma DeepView (Swiss Pdb-Viewer).

Il modeling del *target* può essere generato utilizzando uno dei seguenti metodi:

- *Automated mode*: se *target* e sequenza *templato* mostrano una similarità di sequenza maggiore del 50%. In tal caso il modeling è automatizzato e l'input è rappresentato dalla sequenza amminoacidica in formata FASTA o dal codice di accesso UniProt della proteina *target*.
- *Alignment mode*: al diminuire della similarità di sequenza fra *target* e *templato* il numero di errori generati dall'allineamento in *Automated mode* aumenta, è possibile quindi fornire nell'input il miglior allineamento fra *target* e *templato*.
- *Project mode*: se *target* e sequenze *templato* mostrano una similarità di sequenza minore del 30%.

Dalla sessione '*Structure Assessment*' si ottengono informazioni circa la qualità del modello generato, una prima stima viene direttamente fornita nell'output ed è rappresentata dalla percentuale di identità di sequenza fra *target* e *templato*. È possibile anche ottenere una serie di informazioni sulla sequenza *target* dalla sessione '*Sequence Features Scan*' quali: la presenza di domini noti e siti funzionali (*InterPro domain scan*), la predizione di strutture secondarie (PsiPread), il grado di ordine-disordine (DISOPREAD) e la presenza di segmenti transmembrana (MEMSAT).

L'homology modeling rappresenta il metodo d'elezione per la costruzione in silico di modelli 3D per proteine *target* con *templato* noto.

3.13 PROGRAMMI DI VISUALIZZAZIONE DI STRUTTURA TERZIARIA

Rasmol, Jmol e Pymol sono i programmi *free* maggiormente utilizzati per la visualizzazione grafica delle strutture tridimensionali delle proteine. Essi permettono di spaziare nell'analisi della molecola tramite ingrandimenti, visualizzazione di contatti, raffigurazione della superficie sulla base dei raggi molecolari atomici. Le immagini proposte in questo lavoro provengono da Pymol, che garantisce una grafica ad alta qualità.

3.14 DISCRIMINAZIONE ALLELICA

La discriminazione allelica è una tecnica che consente di genotipizzare SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) mediante l'utilizzo di 2 primers per l'amplificazione della sequenza di interesse e 2 sonde TaqMan[®] allele specifiche (Applied Biosystems). Esistono 2 tipi di sonde TaqMan[®]:

- TaqMan[®] probes (con il TAMRA[™] come quencher)
- TaqMan[®] MGB probes.

Le sonde TaqMan[®] MGB consistono di oligonucleotidi *target*-specifici costituiti da:

- un *reporter dye* localizzato all'estremità 5' di ciascuna sonda:
 - VIC[®] al 5' della sonda specifica per l'allele 1
 - 6FAM[™] al 5' della sonda specifica per l'allele 2.
- Una molecola MGB (*Minor Groove Binder*) che incrementa la temperatura di melting (T_m) senza aumentare la lunghezza della sonda. La presenza di questa molecola permette di progettare sonde più corte, avere una sonda di dimensioni ridotte permette di creare una maggiore differenza di T_m fra sonde con *match* e *mismatch*.
- Un *quencher* non fluorescente (NFQ) al 3' di ciascuna sonda

La presenza del quencher blocca l'emissione di fluorescenza da parte del *reporter*. L'attività esonucleasica 5'-3' della AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Ultra Pure (UP) determina il clivaggio solo delle sonde ibridate con la sequenza bersaglio, ne consegue che il *reporter* si separa dal *quencher* con successiva emissione di fluorescenza. L'incremento della fluorescenza avviene solo se la sequenza *target* amplificata è complementare alla sonda, in tal modo il segnale di fluorescenza che

si ottiene indica quali alleli sono presenti nel campione analizzato (figura 21).

Il segnale emesso da ciascun *dye* viene normalizzato attraverso l'utilizzo di una referenza interna (ROX™ Passive Reference), la normalizzazione è necessaria per correggere le fluttuazioni di fluorescenza causate da variazioni nella concentrazione o nel volume.

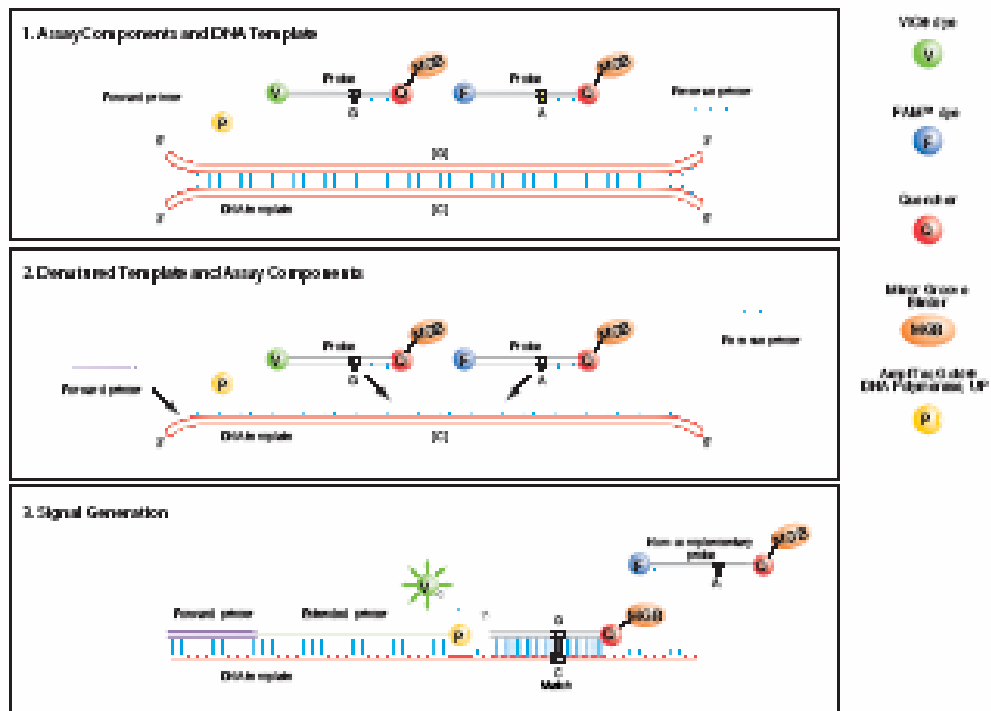


Figura 21: fluorescenza delle sonde TaqMan MGB in seguito ad annealing con il *template* e all'idrolisi mediante AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Ultra Pure (UP).

La reazione di amplificazione è stata allestita come di seguito riportato:

- 10 µl TaqMan Genotyping Master Mix
- 1 µl sonde TaqMan MGB 20x
- 10 ng di DNA genomico
- ddH₂O fino a volume finale di 20 µl

Per le condizioni di amplificazioni sono state seguite le indicazioni fornite nel protocollo.

È possibile analizzare contemporaneamente 96 o 382 campioni, la reazione di amplificazione e l'analisi dei dati richiede circa 2 ore. Il risultato di ciascun campione viene visualizzato in un plot, come quello di seguito riportato (figura 22), dal quale è possibile individuare i campioni omozigoti o eterozigoti per lo SNP di interesse.

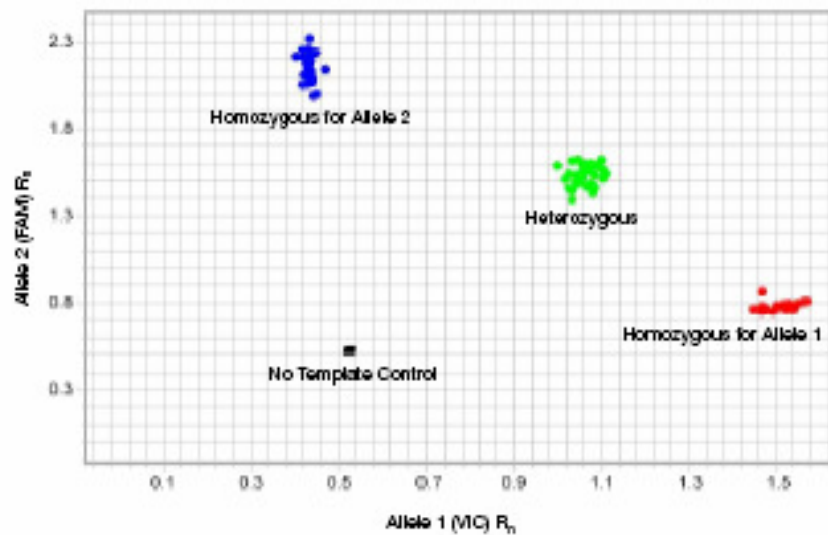


Figura 22: plot risultante dalla discriminazione allelica. Sono presenti i 3 possibili genotipi, rispettivamente dall'alto verso il basso: omozigote per l'allele 2, eterozigote ed omozigote per l'allele 1. Il "NO Template Control" rappresenta il controllo negativo della reazione.

Tale metodica è stata utilizzata per la genotipizzazione dei 4.025 campioni provenienti dalle tre valli trentine, relativamente alla mutazione *SDHD* c.341G>C. p.Y114C.

3.15 DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC)

La DHPLC è una tecnica molto rapida, semi-automatizzata ed applicabile a serie numerose di campioni che consente di rilevare mutazioni del DNA di vario tipo: SNPs, inserzioni, delezioni, tandem repeat, siano esse note o ancora sconosciute. Il principio su cui si basa è la differente velocità di eluizione degli *eteroduplex* rispetto agli *omoduplex*, in una colonna cromatografica. Tali duplex si formano quando frammenti amplificati di DNA vengono denaturati termicamente (95°C –

5') e lasciati rinaturare a temperatura ambiente. Una qualsiasi variazione (mutazione o polimorfismo) tra le due forme alleliche di un frammento porta alla formazione di due *eteroduplex*, dati dalla combinazione di due catene di DNA a singola catena, non perfettamente corrispondenti, e caratterizzati dalla presenza di una "bolla" a livello del *mismatch*, e dei due *omoduplex* presenti in origine.

L'*eteroduplex* si comporta cromatograficamente in modo differente dall'*omoduplex*: l'*eteroduplex* è solitamente più veloce (meno trattenuto) degli *omoduplex*, caratteristica che consente la rilevazione della presenza di una variazione nucleotidica in un campione. La presenza di una mutazione o di un polimorfismo si evidenzia quindi, mediante picchi ulteriori o con un profilo diverso rispetto al *wild type* (figura 23).

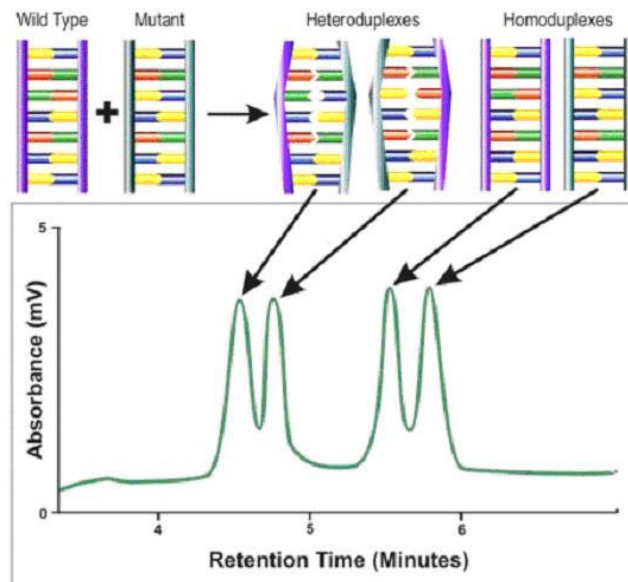


Figura 23: in alto: formazione delle due molecole *eteroduplex* e delle due *omoduplex* in seguito a denaturazione di un campione in cui è presente una variazione nucleotidica in eterozigosi. In basso: viene riportato il relativo cromatogramma, ottenuto in seguito all'analisi del campione in cui sono indicati i picchi dati dalle 4 diverse molecole che si sono originate

Per monitorare le separazioni cromatografiche ottenute in colonna si utilizza uno spettrofotometro corredato di microcella a flusso, dove l'eluato passa in continuo e ne viene effettuata la lettura nell'ultravioletto a 260 nm. Il risultato viene registrato dal computer e riportato sotto forma grafica di cromatogramma.

Generalmente si osserva un picco di eluizione precoce per le molecole *eteroduplex* cui segue un picco degli *omoduplex*. L'analisi viene effettuata in

condizioni denaturanti; infatti l'intero sistema cromatografico viene mantenuto costantemente termostato ad una precisa temperatura (detta temperatura di "quasi denaturazione"). Alla temperatura definita temperatura di "quasi denaturazione", l'*eteroduplex* mostra una parziale denaturazione in corrispondenza del sito in cui si è venuto a creare un *mismatch*, mentre l'*omoduplex* è ancora sotto forma di doppia elica. Questo comporta che il tempo di ritenzione nella colonna cromatografica dell'*eteroduplex* sia generalmente inferiore a quello dell'*omoduplex* a causa della minor interazione con la fase stazionaria. La temperatura di "quasi denaturazione" è propria di ogni sequenza ed è stata calcolata mediante l'utilizzo dell'NavigatorTM Software, che è in grado di predire parametri analitici con un elevato grado di accuratezza.

La variante *SDHB* c.455C>A (temperatura di "quasi denaturazione" pari a 66.3°C) è stata analizzata in un campione di individui sani, provenienti dalla stessa popolazione, mediante tale metodica con lo scopo di escludere o meno che si trattasse di polimorfismo. La reazione di amplificazione e le condizioni utilizzate sono di seguito riportate (tabella 2):

Reagenti	[] _r
DNA	50 ng
Buffer 10X	1X
Ampli Taq Gold 5U/μl	0,4 U
dNTPs 10 mM	2 mM
Primer F 10 μM	0,4 μM
Primer R 10 μM	0,4 μM
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM
ddH ₂ O	Fino a V _r di 12 μl

Step	Temperatura	Durata	Cicli
Attivazione dell'enzima	95°C	10'	1
Denaturazione	95°C	45"	35
Annealing	55°C	45"	
Estensione	72°C	45"	
Estensione finale	72°C	7"	1
Blocco della reazione	4°C	∞	1

Tabella 2: composizione della reazione (a sinistra) e condizioni utilizzate per l'amplificazione (a destra).

Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la seguente coppia di primer:

PRIMER F: TGATGATGGAATCTGATCCT

PRIMER R: CAGATTGAAACAATAAATAGGGA

La tecnica DHPLC è stata utilizzata anche per valutare la presenza/assenza della mutazione fondatrice *SDHD* c.341G>C p.Y114C (temperatura di "quasi

denaturazione” pari a 58.8°C) nei 4.025 soggetti provenienti da Val dei Mocheni – Altopiano di Pinè – Val di Cembra. Per l’amplificazione è stata utilizzata la composizione e le condizioni riportate in tabella 1 (pagina 33). La coppia di primer utilizzata è quella relativa all’esone 4 riportata in appendice A.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

La Sindrome Paraganglioma è causata da mutazioni nei geni *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* e *SDHAF2*. Nel presente lavoro sono stati analizzati 94 pazienti (52 maschi e 42 femmine) affetti da paraganglioma (PGL) o feocromocitoma. Per ciascun paziente è stato eseguito lo screening molecolare dei geni di suscettibilità *SDHB*, *SDHC* ed *SDHD* mediante sequenziamento diretto per la ricerca di mutazioni puntiformi e/o micro-delezioni/duplicazioni, mentre i riarrangiamenti molecolari più estesi (delezioni/duplicazioni) sono stati analizzati mediante Multiplex Ligation Probe Assay (MLPA). Non è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *SDHAF2* a causa della sua recente scoperta. Per i pazienti affetti da feocromocitoma sono stati analizzati anche i geni *VHL* e *RET*. L'analisi molecolare effettuata sia per i casi con storia familiare positiva che negativa ha permesso di identificare 10 mutazioni (10.6%) così distribuite: 5 mutazioni nel gene *SDHB* (50%); 1 mutazione nel gene *SDHC* (10%); 4 mutazioni nel gene *SDHD* (40%).

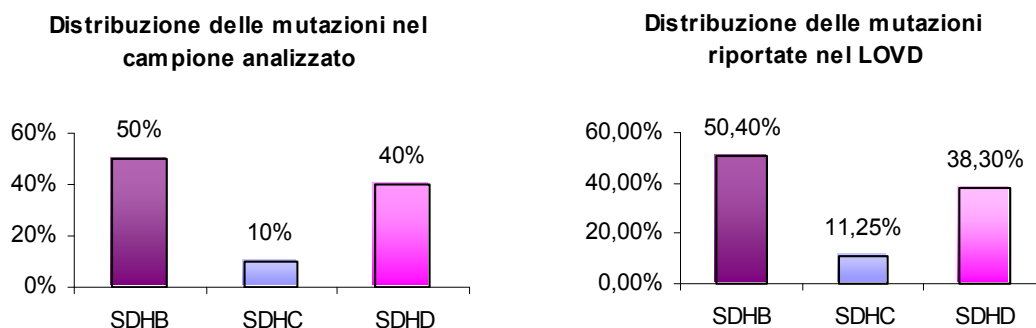


Figura 24: istogramma sulla distribuzione delle mutazioni a carico dei geni *SDHB*, *SDHC* e *SDHD* nel campione analizzato e nel LOVD⁹².

La percentuale di mutazioni identificata in ciascun gene è in accordo con i dati riportati nel LOVD (*Leiden Open Variation Database*)⁹², database in cui vengono raccolti polimorfismi e mutazioni a carico dei geni *SDHx* (Figura 24).

Per ciascun paziente sono stati valutati diversi parametri, quali: la localizzazione del tumore, l'attività endocrina del tumore (secernente o non catecolamine), l'età

di comparsa, la presenza di metastasi, la presenza di tumori multipli e la storia familiare. Un'analisi accurata di tali parametri permette di "identificare" il gene che per primo deve essere sottoposto a screening genetico.

4.1 ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE *SDHB*

Il gene *SDHB* è costituito da otto esoni, che coprono una porzione genomica di circa 35 Kb sul cromosoma 1p36.13.

Per l'amplificazione ed il sequenziamento dell'intero gene sono state progettate 8 coppie di primer, le cui sequenze sono riportate in appendice A.

I pazienti sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni puntiformi e/o micro-delezioni/duplicazioni nel gene *SDHB* mediante sequenziamento diretto e sono state identificate 5 mutazioni, così distribuite: 2 mutazioni nell'esone 5 e 3 mutazioni nell'esone 7 (figura 25). Nonostante il risultato ottenuto sia indicativo di hot spot mutazionali, le mutazioni riportate in letteratura sono presenti in ciascun esone del gene *SDHB*.

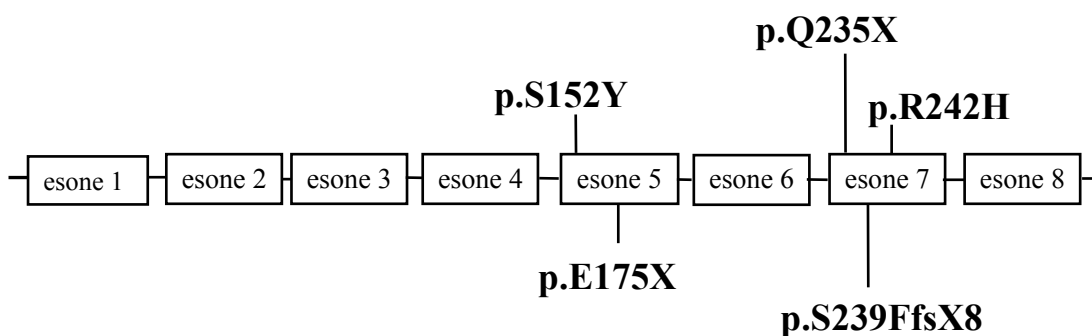


Figura 25: distribuzione delle mutazioni negli 8 esoni del gene *SDHB* analizzati mediante sequenziamento diretto.

Sono state identificate 2 mutazioni non-senso (p.S152Y, p.R242H), 2 mutazioni *STOP codon* (p.E175X, p.Q235X) ed una mutazione *frame-shift* (p.S239FfsX8). Ciascuna mutazione è stata riconfermata attraverso una seconda estrazione di DNA da tampone buccale.

Di seguito viene fornita una descrizione per ciascuna mutazione individuata.

4.1.1 La variante *SDHB* c.455C>A p.S152Y

La variante di sequenza c.455C>A è stata individuata in una donna affetta da PGL carotideo sporadico. Si tratta di una variante non descritta in letteratura: non è riportata in dbSNP (database in cui vengono annotati tutti gli SNPs), né in HGMD (*Human Genome Mutation Database*), né in LOVD.

Con lo scopo di individuare se il residuo amminoacidico coinvolto (S152) fosse presente in uno dei domini della proteina *sdhb* è stato utilizzato il server PROSITE del database ExpASy. Il residuo in questione è localizzato fra i 2 domini ferro-zolfo (2FE2S, 4FE4S) coinvolti nel trasferimento degli elettroni (figura 26).



Figura 26: rappresentazione grafica dei domini della proteina *sdhb* mediante l'utilizzo del programma PROSITE.

La variante di sequenza individuata coinvolge un residuo amminoacidico conservato dal lievito all'uomo, si tratta della serina in posizione 152 che, secondo il programma Conseq, ha un livello di conservazione pari a 7. Di seguito viene fornito l'output ottenuto (figura 27).



Figura 27: parte dell'output (dal residuo 101 al 199) della sequenza proteica *sdhb* ottenuto mediante l'utilizzo del programma Conseq. Il residuo amminoacidico di interesse è stato cerchiato in rosso.

4.1.1.1 Studio della variante *SDHB* c.455C>A mediante analisi in silico

Le varianti a significato ignoto possono essere valutate attraverso analisi in silico, che permettono di predire gli effetti di una determinata sostituzione sulla funzione proteica e sulla struttura tridimensionale della proteina.

Gli effetti della sostituzione amminoacidica p.S152Y sulla funzione proteica sono stati analizzati mediante l'utilizzo del programma SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*). Di seguito viene riportato l'output ottenuto (figura 28).

SIFT Prediction

Substitution at pos 152 from S to Y is predicted to **AFFECT PROTEIN FUNCTION** with a score of 0.01.

Median sequence conservation: 3.03

Sequences represented at this position: 349

Figura 28: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma di predizione SIFT per la sostituzione amminoacidica *sdhb* p.S152Y.

Il programma utilizzato predice sulla base di algoritmi probabilistici che il cambiamento amminoacidico alteri la funzione proteica con uno score pari a 0.01. Lo score rappresenta la probabilità normalizzata che la sostituzione amminoacidica venga tollerata e SIFT predice che le sostituzioni con score inferiore a 0.05 siano deleterie. Il valore di conservazione media è pari a 3.03, occorre ricordare che all'aumentare di tale valore (valore soglia pari a 3) aumenta il numero di Falsi Positivi (FP); per ovviare a tale problema è sufficiente che SIFT fra i tre possibili database a disposizione (SWISS-PROT, SWISS_PROT/TrEMBL, NCBI) ne interroghi uno di maggiori dimensioni. Dal numero di sequenze utilizzate nel multiallineamento (349) si evince che è stato utilizzato quello di maggiori dimensioni, ovvero NCBI.

4.1.1.2 Predizione della struttura secondaria

Attraverso l'utilizzo di programmi di predizione di struttura secondaria quali Psipred e Porter è stato evidenziato che il residuo amminoacidico di interesse è localizzato in un' α -elica.

La tendenza di un dato segmento di una catena polipeptidica a ripiegarsi in forma di α -elica dipende dal tipo di residui che lo compongono e dalla loro sequenza all'interno del segmento. Esistono 4 tipi di restrizioni che alterano la stabilità di un' α -elica:

- 1) La repulsione (o attrazione) elettrostatica tra residui amminoacidici con gruppi R carichi.

Le interazioni che hanno luogo tra le catene laterali degli amminoacidi possono stabilizzare o destabilizzare l' α -elica. Per esempio, se un segmento di una catena polipeptidica contiene molti residui di glutammato (Glu), a pH 7.0, non si potrà formare un' α -elica in quel tratto di struttura. I gruppi carbossilici carichi negativamente dei residui di glutammato (Glu) adiacenti si respingeranno l'un l'altro così fortemente da superare l'influenza stabilizzatrice dei legami idrogeno nell' α -elica. Per lo stesso motivo se vi sono molti residui di lisina (Lys) e/o di arginina (Arg) vicini tra loro, tutti con una carica positiva a pH 7, si respingeranno e impediranno la formazione dell' α -elica.

- 2) La dimensione dei gruppi R (detti anche catene laterali) adiacenti

Anche la forma e la dimensione della catena laterale possono avere effetti destabilizzanti sull' α -elica o addirittura impedirne la formazione. Per esempio, i residui di asparagina (Asn), serina (Ser), treonina (Thr), e lisina (Lys) tendono a impedire la formazione dell' α -elica se si vengono a trovare in stretta vicinanza nella catena.

- 3) L'interazione tra catene laterali spaziate da tre (o quattro) residui.

L'avvolgimento dell' α -elica consente la formazione di interazioni tra la catena laterale di un amminoacido e quella del residuo distante tre (qualche volta quattro) residui in entrambe le direzioni dell'elica. Spesso gli amminoacidi carichi negativamente si trovano distanziati di tre residui da quelli carichi negativamente, in modo da formare interazioni ioniche. Due amminoacidi aromatici possono essere anch'essi distanziati di tre amminoacidi, in modo da generare un'interazione idrofobica.

- 4) La presenza di residui di Pro e di Gly.

Nella prolina, l'atomo di azoto fa parte di un anello rigido e non è possibile alcuna rotazione attorno al legame N-C $_{\alpha}$. Quindi, ogni residuo di Pro introduce un ripiegamento destabilizzante in una struttura ad α -elica. La glicina è anch'essa di rado presente in un' α -elica, ma per motivi diversi: questo amminoacido ha una

flessibilità conformazionale superiore a tutti gli altri residui. I polimeri di glicina tendono ad assumere strutture avvolte casuali molto diverse dall' α -elica.

Sulla base di quanto finora descritto sono state analizzate le proprietà dell'amminoacido *wild type* (Ser) e di quello mutato (Tyr).

Gli amminoacidi vengono suddivisi in base alle proprietà dei loro gruppi R e in base alla loro tendenza a interagire con l'acqua a un pH biologico (pH intorno a 7.0). La polarità dei gruppi varia da completamente non polare o idrofobico (insolubile in acqua) ad altamente polare o idrofilico (solubile in acqua).

La serina (Ser) appartiene alla categoria Gruppi R polari, non carichi. Le catene laterali degli amminoacidi appartenenti a questo gruppo formano legami idrogeno con l'acqua. Appartengono a questo gruppo anche la treonina (Thr), la cisteina (Cys), l'asparagina (Asn) e la glutammina (Gln).

La tirosina (Tyr) appartiene, insieme alla fenilalanina ed al triptofano, alla categoria Gruppi R aromatici. Si tratta di amminoacidi relativamente non polari (idrofobici), con catene laterali aromatiche.

Di seguito vengono riportati gli output ottenuti mediante l'utilizzo dei programmi PsiPread e Porter (figura 29 e 30)

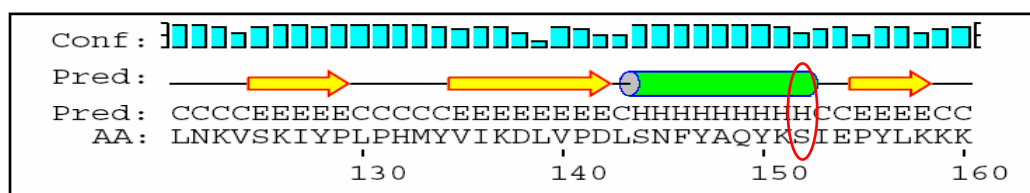


Figura 29: parte dell'output (dal residuo 121 al 160) della sequenza proteica sdhb ottenuto mediante l'utilizzo del programma PsiPread. Conf= confidenza di predizione H= helix, C= coil, E= strand. AA= sequenza *target*. Il residuo amminoacidico di interesse è stato cerchiato in rosso.

```
Subject: Porter, Spritz response to SDHB

Query_name: SDHB

LNKVSKIYPLPHMYVIKDLVPDLSNFYAQYKSI EPYLKKKDESQEGKQQYLQSIEREKL
CCEEEEEECCCCCCCCCEEECCCHHHHHHHHHC CCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCC
OOOOOOOOOOOOO OOOOOOOOOOOOOOOOOO OOOO DDDDDDDDDDDDDDDDDO OOOOOO
```

Figura 30: parte dell’output (dal residuo 121 al 180) della sequenza proteica sdhb ottenuto mediante l’utilizzo del programma Porter. C= coil, H= helix, E= extended beta-strand, O=order, D= disorder. Il residuo amminoacidico di interesse è stato cerchiato in rosso.

Il risultato ottenuto attraverso entrambi i programmi è concordante, inoltre Porter fornisce informazioni circa le regioni ordinate e disordinate della proteina. Le regioni disordinate sono quelle maggiormente plasmabili alle modificazioni indotte da variazioni ambientali o alle interazioni con ligandi, diversamente da quelle ordinate. Il residuo di interesse è localizzato in una regione ordinata.

L’amminoacido *w.t.* e quello mutato appartengono a gruppi R differenti, inoltre la catena laterale della Tyr ha una dimensione notevolmente maggiore rispetto a quella della Ser. È quindi possibile che la sostituzione amminoacidica individuata alteri la stabilità dell’ α -elica.

4.1.1.3 Dalla struttura primaria all’Homology modeling

Per la predizione della struttura tridimensionale della proteina sdhb umana è stato utilizzato il server SWISS-MODEL. Il modeling del *target* (la proteina umana) è stato generato utilizzando il metodo *Automated mode* ovvero un metodo automatizzato che è possibile applicare solo quando *target* e *templato* hanno una similarità di sequenza maggiore del 50%. L’input è rappresentato dalla sequenza amminoacidica in formata FASTA o dal codice di accesso UniProt della proteina *target*. Come *templato* è stata utilizzata la struttura tridimensionale della SDH del maiale risolta mediante cristallografia a raggi X e depositata nel database PDB (Protein Data Bank) con le coordinate 1zoyB⁵⁹. L’output ottenuto viene riportato nella pagina seguente (figura 31).

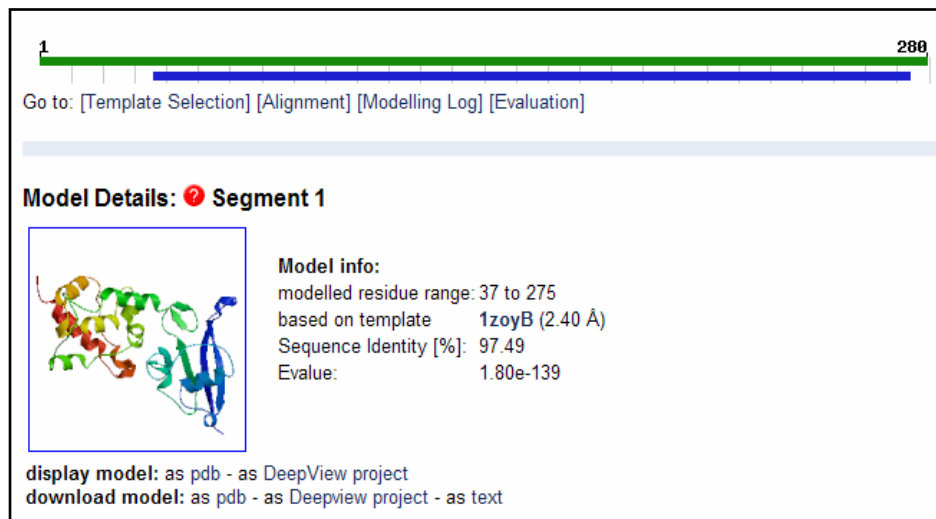


Figura 31: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma SWISS-MODEL per il modeling della proteina sdhb umana. Sezione Workunit: la linea orizzontale verde, in alto, rappresenta il *target* (la sequenza proteica umana) quella blu, in basso, il *template* (la sequenza proteica del maiale). Sezione Model details: rappresentazione cartoon della proteina umana modellata dal residuo 37 fino al residuo 275, vengono riportate le coordinate PDB del *template* utilizzato, l'identità di sequenza ed il valore Evaluate.

Per la visualizzazione grafica della struttura tridimensionale della proteina è stato utilizzato il programma PyMOL che fornisce una grafica di alta qualità (figura 32).

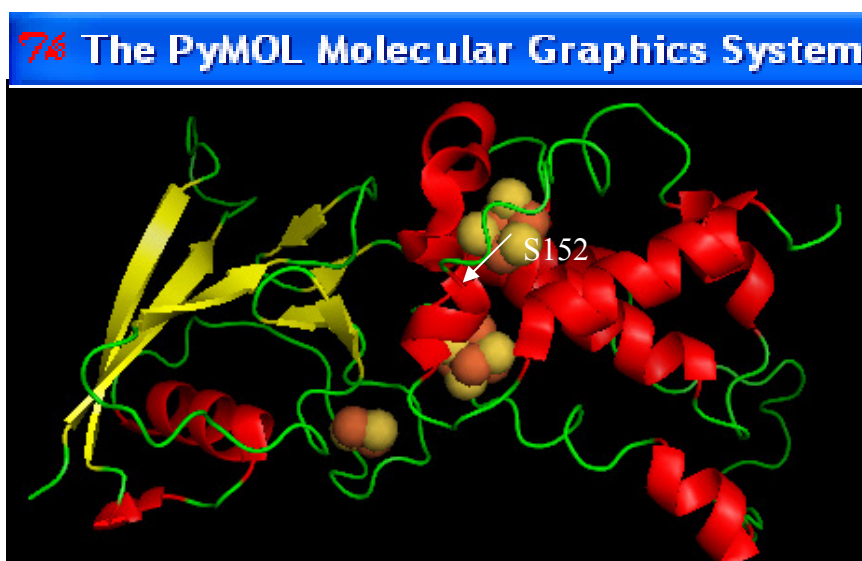


Figura 32: struttura 3D della proteina umana sdhb mediante rappresentazione cartoon. Le α -eliche vengono rappresentate in rosso, gli strands in giallo, i coils in verde ed i clusters Fe-S mediante sfere.

Qui di seguito vengono riportati i ligandi della proteina sdhb ed i residui amminoacidici coinvolti nell'interazione (figura 33).

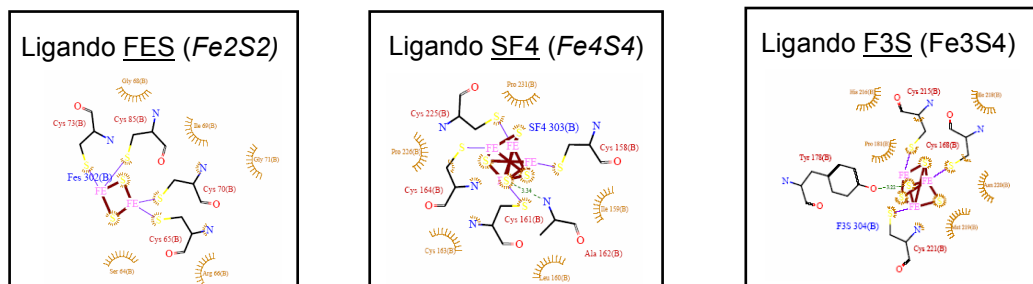


Figura 33: rappresentazione dei ligandi Fe-S (ferro-zolfo) ottenuta dal database PDBsum.

Dalla figura sopra riportata si evince che non ci sono interazioni fra il residuo amminoacidico di interesse ed i ligandi, tuttavia il residuo è presente sull' α -elica (H3) che interagisce con l' α -elica (H6) della proteina sdha (figura 34). Occorre ricordare che il sito catalitico è rappresentato proprio dalla subunità A codificata dal gene *SDHA*.

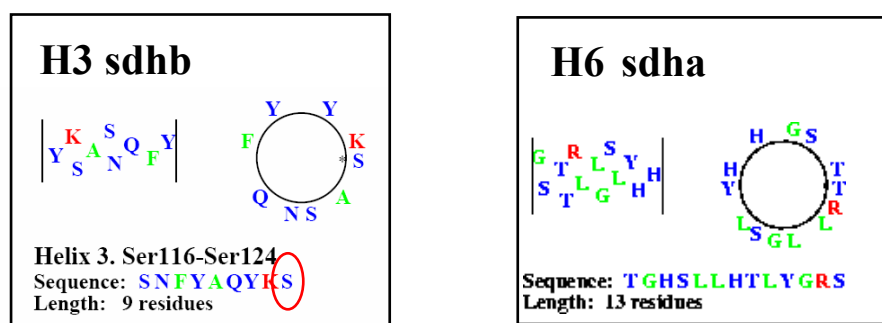


Figura 34: H3: α -elica 3 della proteina sdhb, viene riportata la sequenza (l'ultimo residuo amminoacidico, cerchiato in rosso, è quello di interesse) e la lunghezza, H6: α -elica 6 della proteina sdha.

Poiché il residuo amminoacidico presente nella sequenza mutata (Tyr) ha un ingombro sterico di maggiori dimensioni rispetto alla Ser, si può supporre che l'interazione fra le due eliche venga alterata con conseguenze che si potrebbero riflettere sul trasferimento degli elettroni.

Pur avendo ottenuto informazioni circa gli effetti che la sostituzione amminoacidica produrrebbe sulla funzione proteica e sulla struttura tridimensionale, occorre ricordare che i programmi utilizzati forniscono solo una predizione. Pertanto si è anche voluto analizzare la variante in un campione di

individui sani, appartenenti alla stessa popolazione, mediante la tecnica DHPLC. La variante oggetto di studio non è stata individuata in nessuno dei 200 cromosomi analizzati, escludendo pertanto che si potesse trattare di polimorfismo.

4.1.2 La mutazione *SDHB* c.523G>T p.E175X

Si tratta di una mutazione non descritta in letteratura, che causa la comparsa di un codone di STOP prematuro, con conseguente formazione di una proteina tronca. Il probando è un ragazzo di 13 anni affetto da PGL extra-surrenalico sinistro con storia familiare positiva (la nonna materna era morta durante l'intervento per feocromocitoma). Considerato che mutazioni nel gene *SDHB* sono maggiormente associate a feocromocitoma o PGL extrasurrenalico il primo gene analizzato mediante sequenziamento diretto è stato proprio il gene *SDHB*. Ciò ha permesso di identificare repentinamente la mutazione causativa, escludendo pertanto dall'analisi molecolare gli altri due geni di suscettibilità (*SDHC*, *SDHD*). Di seguito viene riportato il cromatogramma ottenuto (figura 35).

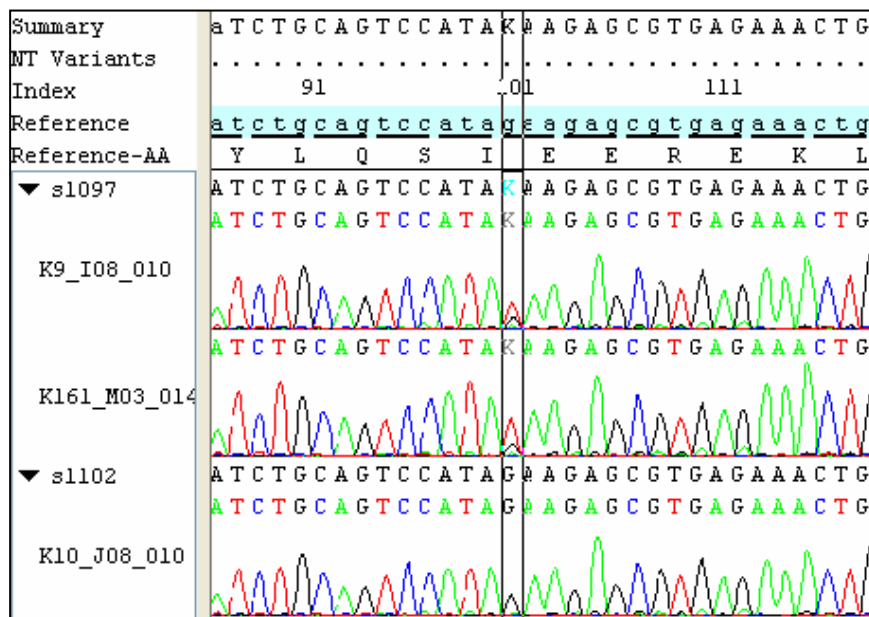


Figura 35: cromatogramma del paziente con la mutazione p.E175X (s1097, sono presenti 2 cromatogrammi perché la mutazione è stata riconfermata) e di un paziente *w.t.* (s1102).

L'analisi genetica è stata poi estesa ai familiari del probando ed ha portato all'individuazione di tre carriers asintomatici della mutazione (due sorelle e la madre). In appendice B viene riportato l'albero genealogico (PGL 01).

La mutazione individuata viene considerata patogena, senza la necessità di

effettuare analisi in silico, o screening della stessa in un campione di popolazione sana, poiché produce una proteina tronca.

4.1.3 La mutazione *SDHB* c.702C>T p.Q235X

Si tratta di un'altra mutazione non-senso, non descritta in letteratura, che causa l'introduzione di un codone di STOP prematuro, con conseguente formazione di una proteina tronca. La mutazione è stata identificata in una ragazza di 13 anni con feocromocitoma benigno sinistro e con storia familiare negativa.

Anche in questo caso, alla luce dello screening clinico, si è deciso di analizzare per primo il gene *SDHB*, identificandone la mutazione ed escludendo pertanto dall'analisi molecolare i due restanti geni (*SDHC*, *SDHD*).

Dai dati presenti in letteratura emerge che l'8-12.5% dei feocromocitomi sporadici sono in realtà solo apparentemente sporadici, attraverso lo screening dei geni di suscettibilità viene infatti individuata la mutazione nella linea germinale. Di seguito viene riportato il cromatogramma ottenuto (figura 36).

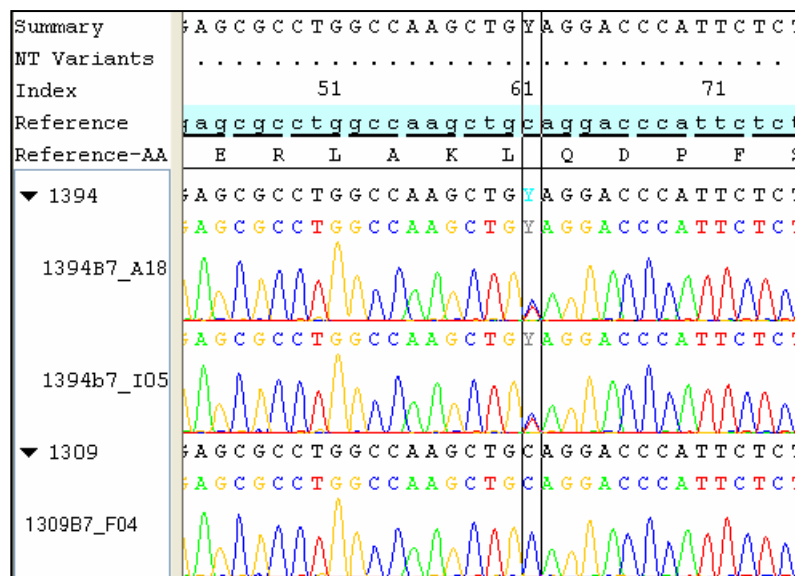


Figura 36: cromatogramma del paziente con la mutazione (1394, sono presenti 2 cromatogrammi perché la mutazione è stata riconfermata) e di un paziente *w.t.* (1309).

L'analisi genetica è stata poi estesa ai familiari del probando e ciò ha permesso di identificare che la mutazione era stata ereditata per via paterna (il padre del probando è carrier asintomatico della mutazione). In appendice B viene riportato l'albero genealogico (PGL 02).

Anche questa mutazione viene considerata una mutazione causativa senza necessità di ulteriori analisi poiché porta alla formazione di un codone di STOP

premature.

4.1.4 La mutazione *SDHB* c.716delC p.S239FfsX8

Il probando è un uomo affetto da PGL addominale secernente catecolamine. Considerata la localizzazione del tumore e tenuto conto che mutazioni a carico del gene *SDHB* sono maggiormente associate a PGL extra-surrenali, si è deciso di analizzare per primo tale gene. Ciò ha permesso di identificare la mutazione responsabile dell'insorgenza del PGL e di escludere dall'analisi gli altri due geni di suscettibilità (*SDHC*, *SDHD*). Si tratta di una mutazione non descritta in letteratura che può tuttavia essere considerata patogena poiché causa *frame-shift*, con conseguente formazione di una proteina di dimensioni ridotte rispetto alla proteina *wild type*.

4.1.5 La mutazione *SDHB* c.725G>A p. R242H

Si tratta di una mutazione causativa, già descritta in letteratura⁹³. Il probando è una ragazza affetta da PGL vescicale. L'analisi genetica è stata poi estesa ai figli (due maschi) ed entrambi sono risultati carriers della mutazione.

Dai dati presenti in letteratura emerge che la mutazione è stata identificata in 6 casi isolati e 2 famiglie indipendenti ed è associata a fenotipi patologici vari quali: PGL giugulare, PGL secernente, PGL metastatico e feocromocitoma. Nella Sindrome Paraganglioma non è possibile effettuare una correlazione genotipo-fenotipo, un determinato genotipo è responsabile di uno spettro fenotipico ampio.

4.2 ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE *SDHC*

Il gene *SDHC* è costituito da sei esoni, che coprono una porzione genomica di circa 50 Kb sul cromosoma 1q21.23.

Per l'amplificazione ed il sequenziamento dell'intero gene sono state progettate 6 coppie di primer, le cui sequenze sono riportate in appendice A.

I pazienti sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni puntiformi e/o micro-delezioni/duplicazioni, nel gene *SDHC*, mediante sequenziamento diretto ed è stata identificata 1 sola mutazione nell'esone 3 (figura 37).

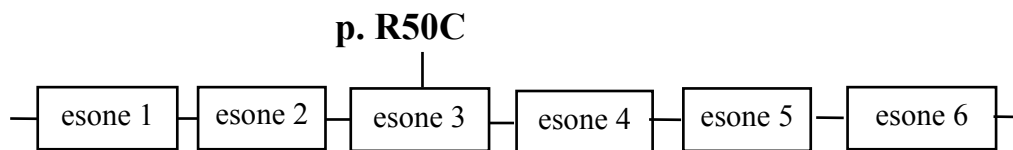


Figura 37: distribuzione delle mutazioni nei 6 esoni del gene *SDHC* analizzati mediante sequenziamento diretto.

4.2.1 La variante c.148 C>T etero; p.R50>C

La variante di sequenza *SDHC* c.148 C>T è stata identificata in una donna con PGL carotideo. Di seguito viene riportato il cromatogramma ottenuto (figura 38).



Figura 38: cromatogramma del paziente con la mutazione (1748) e di un paziente *w.t.* (1742).

Il residuo amminoacidico in posizione 50 (l'arginina, Arg, R) risulta essere conservato dal lievito all'uomo, con un grado di conservazione pari a 9 secondo il programma Conseq, di seguito viene riportato l'output (figura 39).

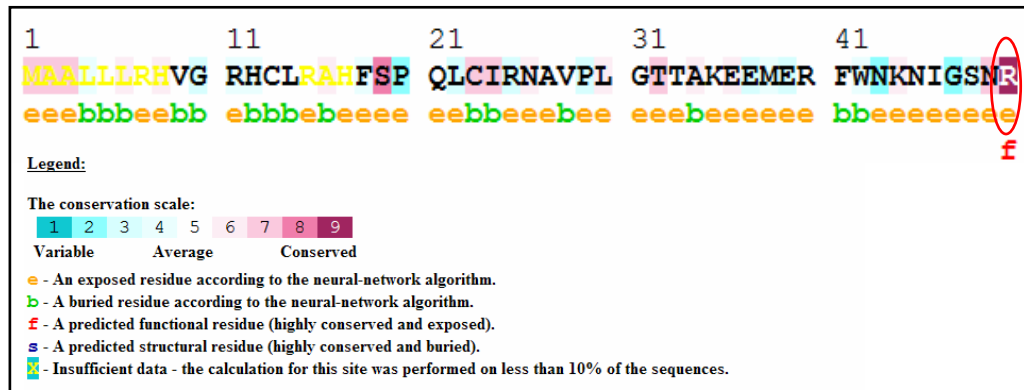


Figura 39: parte dell'output (dal residuo 1 al 50) della sequenza proteica sdhc, ottenuto mediante l'utilizzo del programma Conseq. Il residuo amminoacidico di interesse è stato cerchiato in rosso.

L'analisi in silico mediante l'utilizzo del programma SIFT predice che la sostituzione amminoacidica individuata alteri la funzione proteica, di seguito viene riportato l'output ottenuto (figura 40).

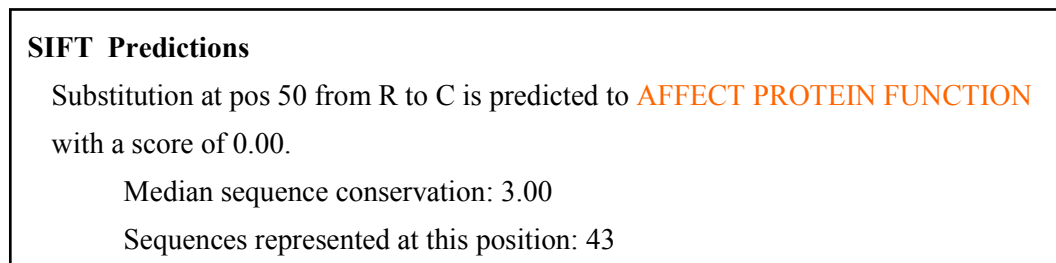


Figura 40: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma di predizione SIFT per la sostituzione amminoacidica sdhc p.R50C.

Non si è poi proceduto con l'Homology Modeling perché tale variante è stata riportata nel LOVD dal gruppo tedesco di Neumann come mutazione patogena⁹⁴.

4.3 ANALISI MUTAZIONALE DEL GENE *SDHD*

Il gene *SDHD* è costituito da quattro esoni, che coprono una porzione genomica di circa 9 Kb sul cromosoma 11q23.

Per l'amplificazione ed il sequenziamento dell'intero gene sono state progettate 6 coppie di primer, le cui sequenze sono riportate in appendice A.

I pazienti sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni puntiformi e/o micro-delezioni/duplicazioni, nel gene *SDHD*, mediante sequenziamento diretto e sono state identificate 4 mutazioni: 3 mutazioni nel sito di splicing (2 nel sito donatore ed 1 nel sito accettore) ed 1 mutazione non-senso (figura 41).

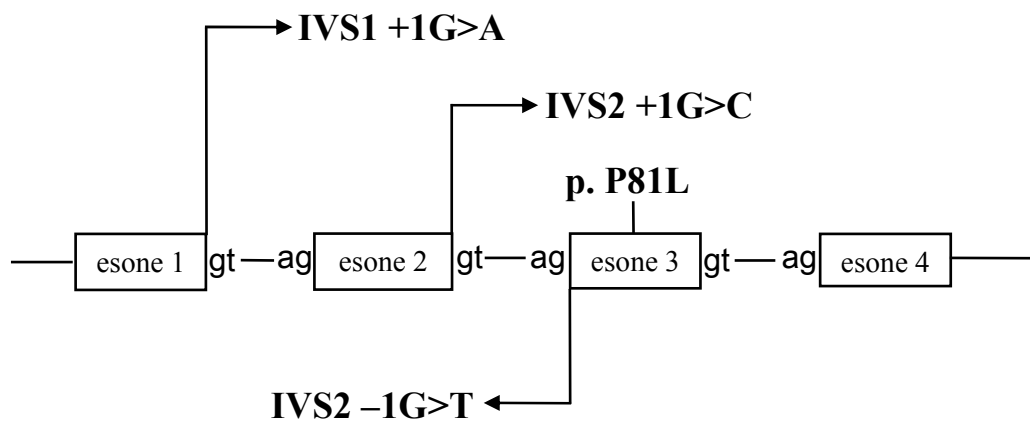


Figura 41: distribuzione delle mutazioni nei 4 esoni del gene *SDHD* analizzati mediante sequenziamento diretto.

La reazione di splicing avviene ad opera dello spliceosoma attraverso due reazioni consecutive di trans-esterificazione, i siti esatti per tali reazioni sono definiti dalla presenza di sequenze consenso. La prima sequenza consenso viene chiamata sito di splicing al 5' ed è relativamente corta. Nei mammiferi solo i primi due nucleotidi dell'introne di tale sequenza (*GU*) sono universalmente conservati, nonostante non siano gli unici nucleotidi importanti. La seconda sequenza consenso al sito di splicing 3' viene definita da tre elementi separati: il sito di ramificazione, il tratto di polipirimidine ed il dinucleotide *AG*.

Le mutazioni nei siti di splicing spesso si verificano nei dinucleotidi *GT* (*GU* nell'RNA) e *AG*, localizzati rispettivamente all'inizio di un introne (*sito donatore di splicing*) o alla sua fine (*sito accettore di splicing*). Le mutazioni nei siti di splicing possono portare all'omissione di un intero esone (*exon skipping*) o alla ritenzione di un intero introne (*intron retention*), oppure ancora all'attivazione di

un sito criptico di splicing.

Negli esoni e negli introni sono presenti sequenze aggiionali che possono agire favorendo o inibendo lo splicing e sono chiamate rispettivamente enancher di splicing esonici o intronici (*Exonic Splicing Enancher* ESE, o *Intronic Splicing Enancher* ISE) o silencers (ESS o ISS). Anche queste sequenze possono essere *target* di mutazioni patogene.

Le varianti di sequenza a carico di esoni o introni potrebbero alterare la corretta processività dell'mRNA attraverso la "distruzione" del sito di splicing, ESE, ESS, ISE o ISS, l'attivazione di un sito criptico di splicing, oppure ancora attraverso l'alterazione della struttura secondaria dell'mRNA.

Sebbene la maggior parte delle alterazioni patologiche siano state osservate in posizione +1/+2 o -1/-2 rispettivamente del sito donatore e accettore di splicing, anche sostituzioni in altre posizioni, che possono essere vicine o distanti dai dinucleotidi canonici (*AG*, *GT*), possono essere responsabili di un fenotipo patologico.

4.3.1 La mutazione *SDHD* IVS1 +1G>A

Si tratta di una mutazione nuova presente nel sito donatore di splicing (*GT*) dell'introne 1 del gene *SDHD*.

La mutazione in un sito donatore di splicing ha come risultato la ritenzione dell'introne. L'introduzione della sequenza intronica nella sequenza codificante di un mRNA maturo introduce amminoacidi aggiuntivi e può causare uno slittamento del modulo di lettura.

Il probando è un ragazzo affetto da PGL pericefalopancreatico; considerato che la Sindrome Paraganglioma, quando causata da mutazioni a carico del gene *SDHD* si manifesta solo se ereditata per via paterna (modalità di trasmissione: *parent-of-origin effect*), l'analisi genetica è stata estesa solo al padre del probando. In seguito all'analisi condotta il padre è risultato carrier della mutazione, lo screening clinico è tuttora in corso. Di seguito vengono riportati i cromatogrammi ottenuti (figura 42).



Figura 42: cromatogramma del probando (s3047, sono presenti 2 cromatogrammi perchè la mutazione è stata riconfermata), del padre (s3048) e di un paziente *w.t.* (s1505).

4.3.1.1 Analisi in silico

Poiché l'RNA del probando non era disponibile, è stata effettuata un'analisi in silico utilizzando tre dei programmi di predizioni dei siti di splicing disponibili in web.

4.3.1.2 BDGP

Il programma BDGP per il calcolo dello score del sito di splicing al 5' (sito donatore) utilizza 15 nucleotidi fiancheggianti il sito individuato (-7 +8 nc) e 41 nucleotidi (-21 +20 nc) per quello al 3'. Di seguito viene riportato l'output ottenuto (figura 43).

```
Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.25 (-7 +8 nc)
Donor site predictions for w.t.:
Start End Score Exon Intron
46 60 0.96 ggccgaggtgagggg

Donor site predictions for SDHD IVS1+1 G>A:
Start End Score Exon Intron
```

Figura 43: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma BDGP per la predizione dei siti di splicing nella sequenza *w.t.* ed in quella mutata (IVS1 +1G>A). Viene riportato lo score cutoff e la lunghezza della sequenza analizzata (-7 nc downstream e +8 nc upstream il dinucleotide *GT*). Viene fornito il valore di score per la predizione effettuata, il dinucleotide predetto (evidenziato in rosso) ed una breve sequenza fiancheggiante tale dinucleotide a monte e a valle. Nella predizione effettuata nella sequenza mutata non viene riconosciuto nessun sito di splicing.

Il programma utilizzato predice la presenza del sito donatore consensus di splicing (*GT*) nella sequenza *wild type* e la sua perdita nella sequenza in cui la guanina del dinucleotide *GT* viene sostituita con la adenina (sequenza mutata).

4.3.1.3 SplicePort

È stato poi utilizzato il programma di predizione SplicePort. È stata analizzata una sequenza di 210 nucleotidi, il programma impone sequenze di lunghezza non inferiore ai 162 nucleotidi (almeno 80 nucleotidi downstream e 80 nucleotidi upstream il sito di splicing di interesse). Il tempo richiesto per la predizione è lunghezza della sequenza dipendente (~1s/Kb). Come threshold è stato utilizzato il valore fornito di default dal programma (zero). Nella pagina seguente viene fornito l'output ottenuto (figura 44).

Description of Sequence:	SDHD w.t.		
Length of Sequence :	210		
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.5%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.5% for AG locations.			
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.8%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.2% for GT locations.			
Show:	Location:	Short Sequence:	Score
Donor:	113	ccgaggtgaggg	0.974367

Figura 44: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma SplicePort per la predizione dei siti di splicing nella sequenza *w.t.* ed in quella mutata (IVS1 +1G>A). In alto: vengono riportate alcune informazioni relative alla sequenza (il nome e la lunghezza della sequenza); al centro: viene riportato il valore di sensibilità con un threshold pari a zero di 88.5% per il sito accettore (*AG*) e di 88.8% per il sito donatore (*GT*); in basso: il sito analizzato, la sua localizzazione nella sequenza fornita, un breve sequenza fiancheggiante il dinucleotide di interesse e lo score.

Il programma predice la presenza del sito donatore di splicing nella sequenza inserita nell'input, ovvero la sequenza *wild type*. Di seguito viene fornito l'output relativo alla sequenza mutata (figura 45).

Description of Sequence:	SDHD mut IVS1 +1G>A		
Length of Sequence :	210		
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.5%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.5% for AG locations.			
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.8%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.2% for GT locations.			
Show:	Location:	Short Sequence:	

Figura 45: output relativo al sito donatore di splicing mutato IVS1 +1G>A. Il programma SplicePort non riconosce alcun sito nella sequenza mutata.

Il programma non predice alcun sito di splicing nella sequenza mutata.

4.3.1.4 Splice-Site Score

Infine è stato utilizzato il programma Splice-Site Score, lo score rappresenta il grado di match fra la sequenza di splicing fornita nell'input (*query*) e la sequenza consensus. Un match del 100% con il sito di splicing 5' **AAG|gtaagt** dovrebbe avere uno score di 12.6, mentre quello al 3' **tt ttccc tccag|G** uno score pari a 14.2. La media dello score dei siti di splicing è di al 8.1 al 5' e 7.9 al 3' (figura 46).

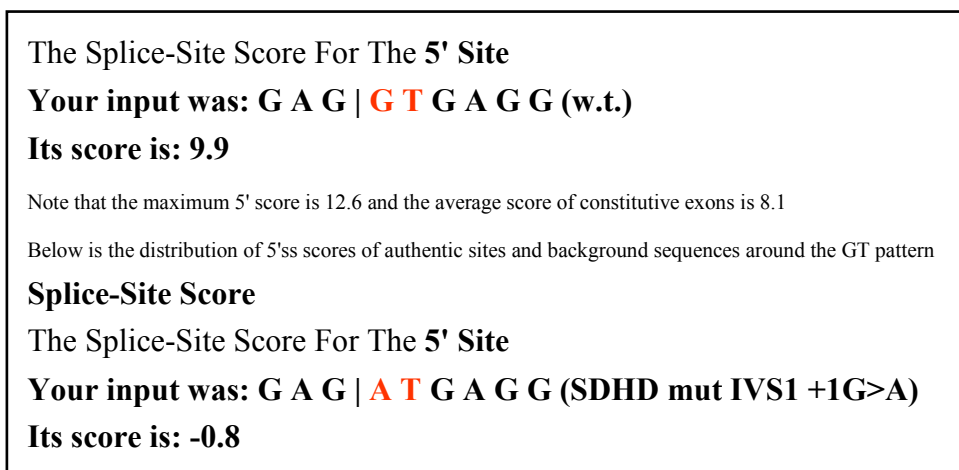


Figura 46: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma Splice-Site Score per la predizione dei siti di splicing nella sequenza *w.t.* ed in quella mutata (IVS1 +1G>A). La sequenza *w.t.* ha uno score di 9.9, quella mutata, invece di -0.8.

Lo score positivo della sequenza *wild type* è indicativo del match fra la sequenza fornita nell'input e quella consensus, lo score invece della sequenza mutata risulta essere negativo perché si discosta dal consensus.

4.3.2 La mutazione *SDHD* IVS2 +1G>C

Si tratta di una mutazione non descritta in letteratura presente nel sito donatore di splicing dell'introne 2 del gene *SDHD*. La mutazione è stata individuata in un ragazzo affetto da PGL metastatico.

Considerata la modalità di trasmissione *parent-of-origin effect* della Sindrome, quando causata da mutazioni a carico del gene *SDHD*, l'analisi genetica è stata estesa solo al padre del probando. In seguito all'analisi effettuata il padre è risultato carrier della mutazione e lo screening clinico ha evidenziato la presenza di un PGL carotideo.

Anche per questa mutazione è stata effettuata un'analisi in silico, utilizzando i tre programmi precedentemente descritti.

Di seguito viene riportato l'output ottenuto attraverso l'utilizzo del programma BDGP (figura 47).

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.25 (-7 +8 nc)				
Donor site predictions for w.t.:				
Start	End	Score	Exon	Intron
111	125	0.27	caccattg	tatgttc
Donor site predictions for SDHD IVS2 +1G>C:				
Start	End	Score	Exon	Intron

Figura 47: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma BDGP per la predizione dei siti di splicing nella sequenza *w.t.* ed in quella mutata (IVS2 +1G>C). Nella sequenza *w.t.* viene predetto un sito donatore di splicing, in quella mutata nessun sito.

Il programma utilizzato predice la presenza del sito donatore di splicing (*GT*) nella sequenza *wild type* e la sua perdita nella sequenza mutata.

Di seguito viene riportato l'output ottenuto mediante SplicePort (figura 48).

Description of Sequence:	SDHD w.t.		
Length of Sequence :	1155		
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.5%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.5% for AG locations.			
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.8%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.2% for GT locations.			
Show:	Location:	Short Sequence:	Score
Donor:	117	ccattgtatgtt	0.149067

Figura 48: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma SplicePort per la predizione dei siti di splicing nella sequenza *w.t.* ed in quella mutata (IVS2 +1G>C).

Il programma predice la presenza del sito donatore di splicing nella sequenza inserita nell'input, ovvero la sequenza *wild type*.

Di seguito viene fornito l'output relativo alla sequenza contenete il dinucleotide *CT* anzichè il dinucleotide *GT* (figura 49).

Description of Sequence:	SDHD mut IVS2 +1G>C		
Length of Sequence :	1155		
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.5%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.5% for AG locations.			
Your threshold of 0 produces a Sensitivity value, TP/(TP+FN), of 88.8%, and a False Positive Rate, FP/(FP+TN), of 1.2% for GT locations.			
Show:	Location:	Short Sequence:	Score
Acceptor:	1010	tttgtagctggc	0.122756

Figura 49: output relativo al sito donatore di splicing mutato IVS2 +1G>C. Il programma SplicePort non riconosce alcun sito nella sequenza mutata.

Il programma non predice alcun sito di splicing nella sequenza mutata. E' stato nuovamente utilizzato il programma Splice-Site Score e di seguito viene riportato l'output ottenuto (figura 50).

<p>The Splice-Site Score For The 5' Site Your input was: A T T G T A T G T (w.t.) Its score is: 4.6</p> <p>Note that the maximum 5' score is 12.6 and the average score of constitutive exons is 8.1</p> <p>Below is the distribution of 5'ss scores of authentic sites and background sequences around the GT pattern</p> <p>Splice Site Score</p> <p>The Splice-Site Score For The 5' Site Your input was: A T T C T A T G T (SDHD mut IVS2 +1G>C) Its score is: -6.2</p>

Figura 50: output ottenuto mediante l'utilizzo del programma Splice-Site Score per la predizione dei siti di splicing nella sequenza *w.t.* ed in quella mutata (IVS2 +1G>C). La sequenza *w.t.* ha uno score di 4.6, quella mutata, invece di -6.2.

Lo score positivo nella sequenza *wild type* e negativo in quella mutata è indicativo rispettivamente del *match* e del *non-match* con la sequenza consensus.

4.3.3 La mutazione *SDHD* IVS2 -1G>T

Si tratta di una mutazione nota⁹⁵, presente nel sito accettore di splicing (*AG*) dell'introne 2 del gene *SDHD*.

La mutazione in un sito accettore di splicing determina lo skipping dell'esone a valle della mutazione. Spesso l'esclusione di un esone ha un profondo effetto sull'espressione genica: può determinare un trascritto di RNA instabile o un polipeptide non funzionale, a causa della perdita di un gruppo critico di amminoacidi.

Il probando è una ragazza di 24 anni affetta da PGL giugulare sinistro con metastasi, operata all'età di 23 anni. Poiché mutazioni nel gene *SDHD* conferiscono un'alta suscettibilità allo sviluppo di HNPs, soprattutto nel glomo carotideo o giugulo-timpanico, si è deciso di analizzare mediante sequenziamento diretto il gene *SDHD*. Ciò ha portato all'identificazione repentina della mutazione causativa, escludendo dall'analisi molecolare gli altri due geni di suscettibilità (*SDHB*, *SDHC*). L'analisi genetica è stata estesa al padre, permettendo di confermare che la mutazione era stata ereditata per via paterna (vedi modalità di trasmissione della Sindrome), al fratello ed alla sorella. Inoltre lo screening clinico effettuato al padre ha permesso di identificare la presenza di un PGL carotideo e giugulare. In appendice B viene riportato l'albero genealogico.

La mutazione è stata inizialmente identificata dal gruppo di Renard nel 2003 (figura 51), in una donna di 35 anni, affetta da PGL vagale bilaterale che si estendeva dalla biforcazione carotidea fino al forame giugulare, senza invasione della base del collo⁹⁵.

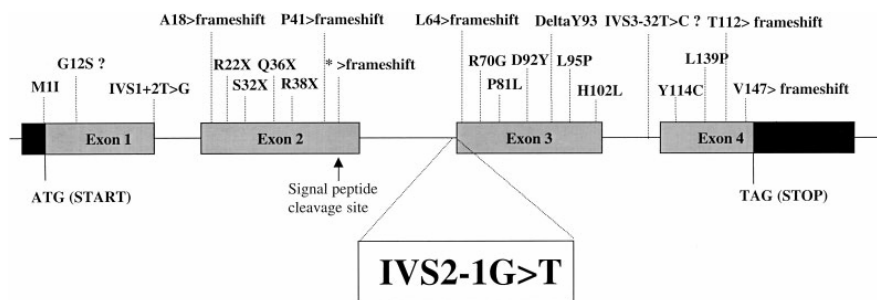


Figura 51: rappresentazione schematica del gene *SDHD*. In alto vengono riportati i cambiamenti amminoacidici causati da mutazioni note. Nel box viene riportata la mutazione individuata⁹⁵.

Sino ad oggi sono stati riportati 5 casi isolati e 5 famiglie indipendenti con questa mutazione, tuttavia dai dati presenti in letteratura emerge che il genotipo in questione è associato a fenotipi tumorali benigni. Nella Sindrome Paraganglioma non è possibile effettuare una correlazione genotipo-fenotipo, un determinato genotipo è responsabile di uno spettro fenotipico ampio. La mutazione *SDHD* IVS2 -1G>T è stata individuata in pazienti affetti da PGL giugulare, carotideo, vagale ed anche in un paziente affetto da feocromocitoma⁹².

4.3.4 La mutazione *SDHD* c.242C>T; p.P81L

Il probando è una donna affetta da PGL carotideo. Considerato che i PGL carotidei sono maggiormente causati da mutazioni a carico del gene *SDHD*, si è deciso di analizzare per primo questo gene. L'analisi effettuata ha portato all'identificazione della mutazione p.P81L, si tratta di una mutazione nota, nonché la prima scoperta da Baysal et al.,¹⁵ come mutazione responsabile dell'insorgenza del PGL (figura 52).

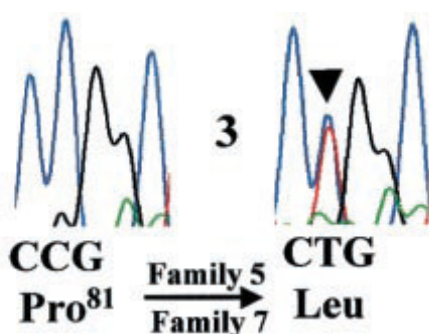


Figura 52: cromatogramma della sequenza *w.t.* e mutata, la freccia indica il nucleotide mutato¹⁵.

Dai dati presenti in letteratura emerge che la mutazione in questione è associata a fenotipi patologici vari quali PGL carotideo, feocromocitoma e feocromocitoma extra-surrenalico. Sino ad oggi è stata individuata in 6 casi isolati e 21 famiglie indipendenti⁹².

4.4 ANALISI DI DELEZIONE/DUPLICAZIONE

La tecnica del sequenziamento diretto permette di identificare, oltre a mutazioni puntiformi, anche micro-delezioni e/o micro-duplicazioni, tuttavia non consente l'identificazione di riarrangiamenti che riguardino regioni genomiche più estese.

Poiché in letteratura sono stati descritti casi di Sindrome Paraganglioma causati da eventi molecolari estesi a carico dei geni *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, quali delezioni di interi esoni o dell'intero gene, nel presente lavoro tutti i pazienti risultati negativi in seguito a sequenziamento diretto (nessuna mutazione puntiforme e/o micro-delezione/duplicazione) sono stati analizzati per la ricerca di possibili eventi molecolari di maggiori dimensioni (delezioni/duplicazioni) mediante la tecnica Multiplex Ligation Probe Assay (MLPA). È stato utilizzato il kit SALSA MLPA KIT P226-A2 SDHD, che contiene le sonde per tutti gli esoni del gene *SDHB*, *SDHC* ed *SDHD* ad eccezione del gene *SDHA*. Per stabilire quali pazienti avessero un numero aberrante di copie il risultato di ciascun campione è stato confrontato con quello di un campione di riferimento, privo di delezioni/duplicazioni a carico dei geni che sono stati analizzati. Delezioni in eterozigosi di una specifica sequenza dovrebbero dare una riduzione dell'area del picco del prodotto di amplificazione relativo a quella sonda del 35-50%. Nessuno dei pazienti analizzati ha mostrato evidenze di possibili delezioni o duplicazioni di interi esoni o dell'intero gene *SDHB*, *SDHC* o *SDHD*.

4.5 STIMA DELLA PREVALENZA DELLA MUTAZIONE *SDHD* p.Y114C IN TRENTINO

L'alta incidenza di HNP in una regione geografica ristretta del Trentino (Valsugana - Val dei Mocheni - Val di Cembra) aveva portato, dopo aver effettuato lo screening genetico, all'identificazione della stessa mutazione a carico del gene *SDHD*, in tutti i pazienti affetti. Sulla base dei risultati ottenuti (vedi paragrafo 1.5.1.5) si è deciso di effettuare uno screening di popolazione previa campagna divulgativa-preventiva sul Progetto "paraganglioma/chemodectoma in Trentino" (responsabile scientifico del progetto: Prof. Giuseppe Opocher) (figura 53). Lo screening è stato rivolto agli abitanti della Val dei Mocheni, Val di Cembra e Altopiano di Pinè, dopo aver fornito loro informazioni sulla mutazione fondatrice *SDHD* c.341G>C p.Y114C, individuata nelle loro valli.

I soggetti sono stati invitati a donare un campione della loro saliva, mediante l'utilizzo di un tampone sterile, con lo scopo di estrarne il DNA ed analizzare la presenza o assenza della mutazione fondatrice *SDHD*. Il campionamento è stato casuale ed il prelievo delle cellule di sfaldamento della mucosa buccale è stato preceduto dalla firma del modulo di consenso alla partecipazione allo studio ed al prelievo.

Progetto paraganglioma/chemodectoma in Trentino

In una zona compresa tra val dei Mocheni e val di Cembra sono stati riscontrati numerosi casi di paraganglioma o chemodectoma familiare, causati da una mutazione del gene *SDHD*

Non è nota la reale frequenza della mutazione nella popolazione sana residente in quest'area.

- ✓ Aiutaci a scoprirla.
- ✓ Partecipa alla raccolta volontaria di DNA (senza prelievo di sangue) del giorno:

Prof. Giuseppe Opocher
Responsabile scientifico del progetto

Figura 53: campagna divulgativa-preventiva sul Progetto “paraganglioma/chemodectoma in Trentino”.

Sono stati raccolti 355 campioni in Val dei Mocheni, 1275 nell'Altopiano di Pinè e 2395 in Val di Cembra. I 4.025 campioni sono stati analizzati per la presenza/assenza della mutazione fondatrice mediante discriminazione allelica, una tecnica che consente di genotipizzare SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) mediante l'utilizzo di 2 primers per l'amplificazione della sequenza di interesse e 2 sonde TaqMan[®] allele specifiche.

Tutti campioni sono stati analizzati anche mediante l'utilizzo di un'altra tecnica quale, la DHPLC. I risultati ottenuti con entrambe le metodiche sono risultati concordanti. I carriers della mutazione sono stati poi confermati attraverso

sequenziamento diretto.

L'analisi effettuata ha permesso di identificare 59 portatori della mutazione: 13 (22%) con storia familiare positiva e 46 (78%) con storia familiare negativa (figura 54).

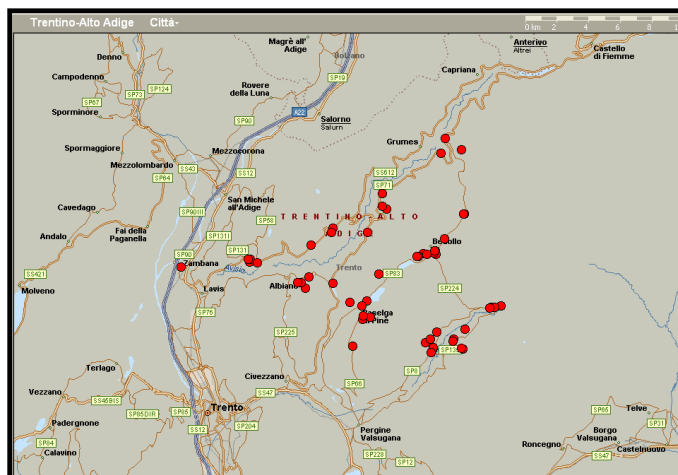


Figura 54: mappa delle valli analizzate, ciascun cerchio rosso rappresenta un carrier della mutazione *SDHD* c.341G>C p.Y114C.

Lo screening effettuato su un campione della popolazione generale di 4.025 individui ha permesso di stimare che il valore di prevalenza dell'allele mutato è pari all'1.5%, con una prevalenza maggiore in Val dei Mocheni, e progressivamente più bassa nell'Altopiano di Pinè e nella Val di Cembra (figura 55). Questo suggerirebbe l'origine della mutazione fondatrice in Val dei Mocheni e la sua successiva diffusione verso le altre due valli.

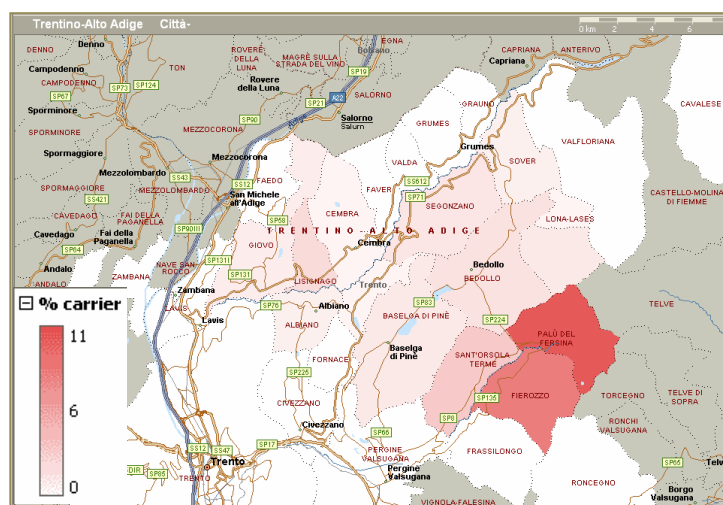


Figura 55: rappresentazione mediante scala colorimetrica della diffusione della mutazione p.Y114C dalla Val dei Mocheni verso le altre due valli.

Poiché la densità demografica di queste valli è di circa 70.000 abitanti si può stimare la presenza di circa 1.000 portatori della mutazione.

La presenza di un numero elevato di portatori della mutazione potrebbe rendere possibile lo studio dei geni modificatori e quindi caratterizzare le motivazioni della eventuale variabilità fenotipica.

5 CONCLUSIONI

In questo lavoro di dottorato si è cercato di approfondire il coinvolgimento dei geni *SDHB/C/D* nella patogenesi dei tumori dei paragangli, sia derivati dal sistema nervoso simpatico che da quello parasimpatico. In particolare i pazienti affetti da feocromocitoma e/o paraganglioma a presentazione sporadica o familiare sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni nei geni di suscettibilità sino ad oggi individuati. È stato escluso dall'analisi il gene *SDHAF2* a causa della sua recente scoperta.

L'analisi eseguita ha portato all'identificazione di mutazioni germinali non descritte in letteratura, per alcune delle quali è stato eseguito anche uno studio funzionale in silico ed il controllo sulla popolazione generale. Per alcune di queste varianti di sequenza è stato possibile accreditare un ruolo patologico. I risultati ottenuti inoltre confermano l'importanza dello screening molecolare nei geni di suscettibilità della Sindrome Paraganglioma per i pazienti con tumori sporadici. Occorre tener presente che l'identificazione precoce di una sindrome ereditaria influenza il management del paziente nonché il trattamento medico-chirurgico.

Individuata la mutazione germinale a carico di uno dei geni *SDHx*, l'analisi genetica è stata poi estesa ai familiari del probando. Ciò ha permesso di identificare sia carriers asintomatici della specifica mutazione, sia individui non a rischio. L'estensione dello screening genetico ai familiari ha impatti evidenti sul piano psicologico sia pre, che post-test. La sua applicazione tuttavia si rivela utile perché permette di offrire ai carriers asintomatici un trattamento precoce, fondamentale soprattutto per le forme neoplastiche più aggressive, ed un *follow-up* continuo, volto ad evidenziare precocemente l'insorgenza di altri tumori endocrini. Diversamente, gli individui genotipicamente non a rischio, saranno esclusi da successive indagini.

In due pazienti affetti da paraganglioma testa-collo (*Head and Neck Paraganglioma*, HNP) metastatico è stata individuata una mutazione germinale a carico del gene *SDHD*, ciò non è in accordo con quanto presente in letteratura, dove il maggior numero di mutazioni responsabili dell'insorgenza di un fenotipo maligno sono state osservate nel gene *SDHB*. I risultati ottenuti dimostrano quindi che la possibilità di un fenotipo maligno nei carriers di mutazioni *SDHD* non è così raro, con conseguenze che si riflettono sul management clinico dei pazienti affetti da Sindrome PGL1 (Sindrome Paraganglioma di tipo 1).

Nel presente lavoro non sono stati identificati riarrangiamenti di notevoli dimensioni quali delezioni/duplicazioni di interi esoni o dell'intero gene *SDHB/C/D*. Sebbene i risultati ottenuti non siano in accordo con quanto presente in letteratura, occorre ricercare l'eventuale presenza di tali eventi molecolari, per coprire lo spettro di mutazioni che sino ad oggi si sono rivelate responsabili della progressione neoplastica.

Un'analisi accurata sia clinica che molecolare dei dati qui rappresentati, insieme a quelli provenienti da altri centri del "Feocromocitoma/Paraganglioma network" ha permesso di ottenere linee-guida per lo screening genetico della Sindrome Paraganglioma. Di seguito viene riportato il flow chart proposto⁹⁶ (figura 56).

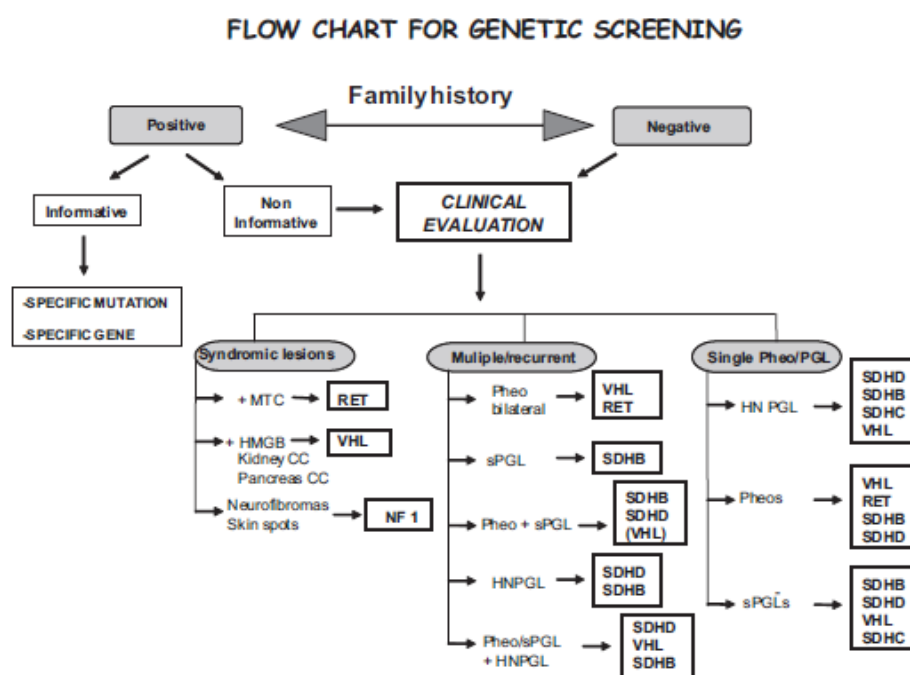


Figura 56: rappresentazione del flow chart proposto dal "Feocromocitoma/Paraganglioma network" per lo screening genetico in pazienti affetti da feocromocitoma e/o paraganglioma⁹⁶.

Relativamente all'effetto fondatore individuato nelle valli trentine (Val dei Mocheni - Val di Cembra - Altopiano di Pinè), la stima della prevalenza dell'allele mutato in un campione generale della popolazione ha permesso di individuare altri carriers delle mutazione e di ipotizzare, data la densità demografica della zona in questione, la presenza di 1000 individui con un genotipo predisponente lo sviluppo neoplastico.

Inoltre la presenza di un numero elevato di individui affetti da HNP, portatori

della mutazione *SDHD* p.Y114C, fornirà gli strumenti per una maggiore comprensione della modalità di espressione della Sindrome PGL1 ma potrà anche fornire preziosi elementi per lo studio di altri geni coinvolti nella particolare modalità di trasmissione della Sindrome PGL1.

6 BIBLIOGRAFIA

- ¹ Glenner GG, Grimley PM, Tumors of the extra-adrenal paraganglion system (including chemoreceptors). Atlas of tumor pathology. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1974.
- ² De Lellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C *WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs*. Lyon, France. IARC Press; 2004.
- ³ 2nd International Symposium on Pheochromocytoma, UK 17th-20th September 2008
- ⁴ Yeo H., Roman S. Pheochromocytoma and functional paraganglioma. *Curr Opin Oncol* 2005 Jan;17(1):13-8.
- ⁵ McNicol A.M. Assessment of malignancy in adrenal cortical tumors. *Endocr Pathol* 2006 Summer;17(2):131-6.
- ⁶ Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C, Smith WM, Munk R, Manz T, Glaesker S, Apel TW, Treier M, Reineke M, Walz MK, Hoang-Vu C, Brauckhoff M, Klein-Franke A, Klose P, Schmidt H, Maier-Woelfle M, Peçzkowska M, Szmigielski C, Eng C; Freiburg-Warsaw-Columbus Pheochromocytoma Study Group. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med*. 2002 May 9;346(19):1459-66.
- ⁷ Neumann HP, Pawlu C, Peçzkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA, Hoegerle S, Boedeker CC, Opocher G, Schipper J, Januszewicz A, Eng C; European-American Paraganglioma Study Group. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA*. 2004 Aug 25;292(8):943-51.
- ⁸ Peçzkowska M, Cascon A, Prejbisz A, Kubaszek A, Cwikła BJ, Furmanek M, Erlic Z, Eng C, Januszewicz A, Neumann HP. Extra-adrenal and adrenal pheochromocytomas associated with a germline SDHC mutation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Feb;4(2):111-5.
- ⁹ Amar L, Bertherat J, Baudin E, Ajzenberg C, Bressac-de Paillerets B, Chabre O, Chamontin B, Delemer B, Giraud S, Murat A, Niccoli-Sire P, Richard S, Rohmer V, Sadoul JL, Strompf L, Schlumberger M, Bertagna X, Plouin PF, Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo AP. Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 1;23(34):8812-8.
- ¹⁰ Neumann HP, Berger DP, Sigmund G, Blum U, Schmidt D, Parmer RJ, Volk B, Kirste G. Pheochromocytomas, multiple endocrine neoplasia type 2, and von Hippel-Lindau disease. *N Engl J Med*. 1993 Nov 18;329(21):1531-8.
- ¹¹ Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, van Amstel HK, Lips CJ, Nishisho I, Takai SI, Marsh DJ, Robinson BG, Frank-Raue K, Raue F, Xue F, Noll WW, Romei C, Pacini F, Fink M, Niederle B, Zedenius J, Nordenskjöld M, Komminoth P, Hendy GN, Mulligan LM, et al. The relationship

between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA*. 1996 Nov 20;276(19):1575-9.

¹² Riccardi VM. Von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med*. 1981 Dec 31;305(27):1617-27.

¹³ Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Sköldbberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2001 Jul;69(1):49-54. Epub 2001 Jun 12.

¹⁴ Niemann S, Müller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*. 2000 Nov;26(3):268-70.

¹⁵ Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*. 2000 Feb 4;287(5454):848-51.

¹⁶ Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley JP, Kunst H, Devilee P, Cremers CW, Schiffman JD, Bentz BG, Gygi SP, Winge DR, Kremer H, Rutter J. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*. 2009 Aug 28;325(5944):1139-42. Epub 2009 Jul 23.

¹⁷ Plouin PF, Degoulet P, Tugayé A, Ducrocq MB, Ménard J. [Screening for phaeochromocytoma : in which hypertensive patients? A semiological study of 2585 patients, including 11 with phaeochromocytoma (author's transl)]. *Nouv Presse Med*. 1981 Mar 7;10(11):869-72.

¹⁸ Mannelli M, Ianni L, Cilotti A, Conti A. Pheochromocytoma in Italy: a multicentric retrospective study. *Eur J Endocrinol*. 1999 Dec;141(6):619-24.

¹⁹ Erlic Z, Neumann HP. Familial pheochromocytoma. *Hormones (Athens)*. 2009 Jan-Mar;8(1):29-38.

²⁰ Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V, Khau Van Kien P, Corvol P, Plouin PF, Jeunemaitre X; COMETE Network. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant phaeochromocytomas. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5615-21.

²¹ Gujrathi CS, Donald PJ. Current trends in the diagnosis and management of head and neck paragangliomas. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005 Dec;13(6):339-42.

²² Grufferman S, Gillman MW, Pasternak LR, Peterson CL, Young WG Jr. Familial carotid body tumors: case report and epidemiologic review. *Cancer*. 1980 Nov 1;46(9):2116-22.

²³ Drovdic CM, Myers EN, Peters JA, Baysal BE, Brackmann DE, Slattery WH 3rd, Rubinstein WS. Proportion of heritable paraganglioma cases and associated clinical characteristics. *Laryngoscope*. 2001 Oct;111(10):1822-7.

²⁴ van der Mey AG, Maaswinkel-Mooy PD, Cornelisse CJ, Schmidt PH, van de

Kamp JJ. Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: evidence for new genetic theory. *Lancet*. 1989 Dec 2;2(8675):1291-4.

²⁵ Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*. 1994 Oct;74(4):829-98.

²⁶ Baysal BE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Drovdic CM, Savul SA, McLeod DR, Yee HA, Brackmann DE, Slattery WH 3rd, Myers EN, Ferrell RE, Rubinstein WS. Prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD germline mutations in clinic patients with head and neck paragangliomas. *J Med Genet*. 2002 Mar;39(3):178-83.

²⁷ Schiavi F, Boedeker CC, Bausch B, Peçzkowska M, Gomez CF, Strassburg T, Pawlu C, Buchta M, Salzmann M, Hoffmann MM, Berlis A, Brink I, Cybulla M, Muresan M, Walter MA, Forrer F, Välimäki M, Kawecki A, Szutkowski Z, Schipper J, Walz MK, Pigny P, Bauters C, Willet-Brozick JE, Baysal BE, Januszewicz A, Eng C, Opocher G, Neumann HP; European-American Paraganglioma Study Group. Predictors and prevalence of paraganglioma syndrome associated with mutations of the SDHC gene. *JAMA*. 2005 Oct 26;294(16):2057-63.

²⁸ Bayley JP, van Minderhout I, Weiss MM, Jansen JC, Oomen PH, Menko FH, Pasini B, Ferrando B, Wong N, Alpert LC, Williams R, Blair E, Devilee P, Taschner PE. Mutation analysis of SDHB and SDHC: novel germline mutations in sporadic head and neck paraganglioma and familial paraganglioma and/or pheochromocytoma. *BMC Med Genet*. 2006 Jan 11;7:1.

²⁹ Castellano M, Mori L, Giacchè M, Agliozzo E, Tosini R, Panarotto A, Cappelli C, Mulatero P, Cumetti D, Veglio F, Agabiti-Rosei E. Genetic mutation screening in an Italian cohort of nonsyndromic pheochromocytoma/paraganglioma patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Aug;1073:156-65.

³⁰ Benn DE, Gimenez-Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, Crosson M, Dahia PL, Elston M, Gimm O, Henley D, Herman P, Murday V, Niccoli-Sire P, Pasiaka JL, Rohmer V, Tucker K, Jeunemaitre X, Marsh DJ, Plouin PF, Robinson BG. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):827-36. Epub 2005 Nov 29.

³¹ Astuti D, Hart-Holden N, Latif F, Laloo F, Black GC, Lim C, Moran A, Grossman AB, Hodgson SV, Freemont A, Ramsden R, Eng C, Evans DG, Maher ER. Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and pheochromocytoma susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Dec;59(6):728-33.

³² Young W.F. Jr. Adrenal causes of hypertension: pheochromocytoma and primary aldosteronism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Dec;8(4):309-20.

³³ Peczkowska M, Erlic Z, Hoffmann MM, Furmanek M, Cwikla J, Kubaszek A, Prejbisz A, Szutkowski Z, Kawecki A, Chojnowski K, Lewczuk A, Litwin M, Szyfter W, Walter MA, Sullivan M, Eng C, Januszewicz A, Neumann HP. Impact of screening kindreds for SDHD p.Cys11X as a common mutation associated with paraganglioma syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Dec;93(12):4818-25. Epub 2008 Sep 30.

³⁴ Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Keiser HR, Goldstein DS, Eisenhofer G. Biochemical diagnosis of

pheochromocytoma: which test is best? *JAMA*. 2002 Mar 20;287(11):1427-34.

³⁵ Ilias I, Pacak K. Current approaches and recommended algorithm for the diagnostic localization of pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;89(2):479-91. Review.

³⁶ van der Harst E, de Herder WW, Bruining HA, Bonjer HJ, de Krijger RR, Lamberts SW, van de Meiracker AH, Boomsma F, Stijnen T, Krenning EP, Bosman FT, Kwekkeboom DJ. [(123)I]metaiodobenzylguanidine and [(111)In]octreotide uptake in benign and malignant pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Feb;86(2):685-93.

³⁷ Furuta N, Kiyota H, Yoshigoe F, Hasegawa N, Ohishi Y. Diagnosis of pheochromocytoma using [123I]-compared with [131I]-metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Int J Urol*. 1999 Mar;6(3):119-24.

³⁸ Hoegerle S, Nitzsche E, Althoefer C, Ghanem N, Manz T, Brink I, Reincke M, Moser E, Neumann HP. Pheochromocytomas: detection with 18F DOPA whole body PET--initial results. *Radiology*. 2002 Feb;222(2):507-12.

³⁹ Hoegerle S, Ghanem N, Althoefer C, Schipper J, Brink I, Moser E, Neumann HP. 18F-DOPA positron emission tomography for the detection of glomus tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003 May;30(5):689-94. Epub 2003 Mar 5.

⁴⁰ Scheffler IE. Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998;60:267-315.

⁴¹ LEIGH D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1951 Aug;14(3):216-21.

⁴² Baysal BE, Lawrence EC, Ferrell RE. Sequence variation in human succinate dehydrogenase genes: evidence for long-term balancing selection on SDHA. *BMC Biol*. 2007 Mar 21;5:12.

⁴³ Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, Munnich A, Rötig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*. 1995 Oct;11(2):144-9.

⁴⁴ Parfait B, Chretien D, Rötig A, Marsac C, Munnich A, Rustin P. Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum Genet*. 2000 Feb;106(2):236-43.

⁴⁵ Hensen EF, Jordanova ES, van Minderhout IJ, Hogendoorn PC, Taschner PE, van der Mey AG, Devilee P, Cornelisse CJ. Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-origin-dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and pheochromocytoma families. *Oncogene*. 2004 May 20;23(23):4076-83.

⁴⁶ Baysal BE, Farr JE, Rubinstein WS, Galus RA, Johnson KA, Aston CE, Myers EN, Johnson JT, Carrau R, Kirkpatrick SJ, Myssiorek D, Singh D, Saha S, Gollin SM, Evans GA, James MR, Richard CW 3rd. Fine mapping of an imprinted gene for familial nonchromaffin paragangliomas, on chromosome 11q23. *Am J Hum Genet*. 1997 Jan;60(1):121-32.

- ⁴⁷ Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 1;12 Spec No 1:R61-8. Review.
- ⁴⁸ Zhang Y, Tycko B. Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet.* 1992 Apr;1(1):40-4.
- ⁴⁹ Sparago A, Russo S, Cerrato F, Ferraiuolo S, Castorina P, Selicorni A, Schwienbacher C, Negrini M, Ferrero GB, Silengo MC, Anichini C, Larizza L, Riccio A. Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet.* 2007 Feb 1;16(3):254-64. Epub 2006 Dec 11.
- ⁵⁰ Heutink P, van der Mey AG, Sandkuijl LA, van Gils AP, Bardoel A, Breedveld GJ, van Vliet M, van Ommen GJ, Cornelisse CJ, Oostra BA, et al. A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter. *Hum Mol Genet.* 1992 Apr;1(1):7-10.
- ⁵¹ Milunsky J, DeStefano AL, Huang XL, Baldwin CT, Michels VV, Jako G, Milunsky A. Familial paragangliomas: linkage to chromosome 11q23 and clinical implications. *Am J Med Genet.* 1997 Oct 3;72(1):66-70.
- ⁵² Baysal BE. Genomic imprinting and environment in hereditary paraganglioma. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004 Aug 15;129C(1):85-90.
- ⁵³ Pigny P, Vincent A, Cardot Bauters C, Bertrand M, de Montpreville VT, Crepin M, Porchet N, Caron P. Paraganglioma after maternal transmission of a succinate dehydrogenase gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1609-15. Epub 2008 Jan 22.
- ⁵⁴ Cascon A, Ruiz-Llorente S, Cebrian A, Telleria D, Rivero JC, Diez JJ, Lopez-Ibarra PJ, Jaunsolo MA, Benitez J, Robledo M. Identification of novel SDHD mutations in patients with pheochromocytoma and/or paraganglioma. Cascon A, Ruiz-Llorente S, Cebrian A, Telleria D, Rivero JC, Diez JJ, Lopez-Ibarra PJ, Jaunsolo MA, Benitez J, Robledo M.
- ⁵⁵ Neumann HP, Erlic Z. Maternal transmission of symptomatic disease with SDHD mutation: fact or fiction? *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1573-
- ⁵⁶ Neumann HP, Erlic Z, Boedeker CC, Rybicki LA, Robledo M, Hermsen M, Schiavi F, Falcioni M, Kwok P, Bauters C, Lampe K, Fischer M, Edelman E, Benn DE, Robinson BG, Wiegand S, Rasp G, Stuck BA, Hoffmann MM, Sullivan M, Sevilla MA, Weiss MM, Peczkowska M, Kubaszek A, Pigny P, Ward RL, Learoyd D, Croxson M, Zabolotny D, Yaremchuk S, Draf W, Muresan M, Lorenz RR, Knipping S, Strohm M, Dyckhoff G, Matthias C, Reisch N, Preuss SF, Esser D, Walter MA, Kaftan H, Stöver T, Fottner C, Gorgulla H, Malekpour M, Zarandy MM, Schipper J, Brase C, Glien A, Kühnemund M, Koscielny S, Schwerdtfeger P, Välimäki M, Szyfter W, Finckh U, Zerres K, Cascon A, Opocher G, Ridder GJ, Januszewicz A, Suarez C, Eng C. Clinical predictors for germline mutations in head and neck paraganglioma patients: cost reduction strategy in genetic diagnostic process as fall-out. *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3650-6. Epub 2009 Apr 7.

- ⁵⁷ Taschner PE, Jansen JC, Baysal BE, Bosch A, Rosenberg EH, Bröcker-Vriends AH, van Der Mey AG, van Ommen GJ, Cornelisse CJ, Devilee P. Nearly all hereditary paragangliomas in the Netherlands are caused by two founder mutations in the SDHD gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001 Jul;31(3):274-81.
- ⁵⁸ Velasco A, Palomar-Asenjo V, Gañan L, Catusus L, Llecha N, Panizo A, Palomar-Garcia V, Quer M, Matias-Guiu X. Velasco A, Palomar-Asenjo V, Gañan L, Catusus L, Llecha N, Panizo A, Palomar-Garcia V, Quer M, Matias-Guiu X. Mutation analysis of the SDHD gene in four kindreds with familial paraganglioma: description of one novel germline mutation. *Diagn Mol Pathol*. 2005 Jun;14(2):109-14.
- ⁵⁹ Simi L, Sestini R, Ferruzzi P, Gaglianò MS, Gensini F, Mascalchi M, Guerrini L, Pratesi C, Pinzani P, Nesi G, Ercolino T, Genuardi M, Mannelli M. Phenotype variability of neural crest derived tumours in six Italian families segregating the same founder SDHD mutation Q109X. *J Med Genet*. 2005 Aug;42(8):e52.
- ⁶⁰ Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Population Genetics. In: *From an introduction to genetic analysis*. New York: W.H. Freeman & Co: 1999
- ⁶¹ Milunsky JM, Maher TA, Michels VV, Milunsky A. Novel mutations and the emergence of a common mutation in the SDHD gene causing familial paraganglioma. *Am J Med Genet*. 2001 May 15;100(4):311-4.
- ⁶² Pasini B, McWhinney SR, Bei T, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Muchow M, Boikos SA, Ferrando B, Pacak K, Assie G, Baudin E, Chompret A, Ellison JW, Briere JJ, Rustin P, Gimenez-Roqueplo AP, Eng C, Carney JA, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet*. 2008 Jan;16(1):79-88. Epub 2007 Aug 1.
- ⁶³ McWhinney SR, Pasini B, Stratakis CA; International Carney Triad and Carney-Stratakis Syndrome Consortium. Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *N Engl J Med*. 2007 Sep 6;357(10):1054-6.
- ⁶⁴ Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, Virta SK, Peçzkowska M, Morrison CD, Lehtonen R, Januszewicz A, Järvinen H, Juhola M, Mecklin JP, Pukkala E, Herva R, Kiuru M, Nupponen NN, Aaltonen LA, Neumann HP, Eng C. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2004 Jan;74(1):153-9. Epub 2003 Dec 18.
- ⁶⁵ Korpershoek E, Petri BJ, van Nederveen FH, Dinjens WN, Verhofstad AA, de Herder WW, Schmid S, Perren A, Komminoth P, de Krijger RR. Candidate gene mutation analysis in bilateral adrenal pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):453-62
- ⁶⁶ Isobe K, Minowada S, Tatsuno I, Suzukawa K, Nissato S, Nanmoku T, Hara H, Yashiro T, Kawakami Y, Takekoshi K. Novel germline mutations in the SDHB and SDHD genes in Japanese pheochromocytomas. *Horm Res*. 2007;68(2):68-71. Epub 2007 Feb 15.

- ⁶⁷ Mannelli M, Ercolino T, Giachè V, Simi L, Cirami C, Parenti G. Genetic screening for pheochromocytoma: should SDHC gene analysis be included? *J Med Genet.* 2007 Sep;44(9):586-7. Epub 2007 Jun 8.
- ⁶⁸ Badenhop RF, Jansen JC, Fagan PA, Lord RS, Wang ZG, Foster WJ, Schofield PR. The prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD mutations in patients with head and neck paraganglioma and association of mutations with clinical features. *J Med Genet.* 2004 Jul;41(7):e99.
- ⁶⁹ Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell.* 2005 Jul 1;121(7):1043-57.
- ⁷⁰ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review
- ⁷¹ Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002 Aug;192(2):131-7.
- ⁷² van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 9;304(3):487-97.
- ⁷³ Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 9;304(3):463-70. Review.
- ⁷⁴ Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajan MP, Farese RV, Freeman RS, Carter BD, Kaelin WG Jr, Schlisio S. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell.* 2005; 8(2): 155-167.
- ⁷⁵ Baysal BE. On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Dec;14(10):453-9.
- ⁷⁶ Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann Med.* 2003;35(8):632-9.
- ⁷⁷ Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P, Rötig A, Jeunemaitre X. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet.* 2001 Dec;69(6):1186-97. Epub 2001 Oct 16.
- ⁷⁸ Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):677-84.
- ⁷⁹ Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002;8(4 Suppl):S62-7.
- ⁸⁰ Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):468-72.

Epub 2001 Apr 5.

⁸¹ Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9630-5.

⁸² Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):975-8. Epub 2002 Jun 5.

⁸³ Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1886-9. Epub 2002 May 9.

⁸⁴ George DJ, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 31;349(5):419-21. No abstract available.

⁸⁵ Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005 Jan;7(1):77-85.

⁸⁶ Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, Terashima M, Horiuchi S. Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep*. 2003 Sep-Oct;10(5):1375-80.

⁸⁷ Dahia PL, Hao K, Rogus J, Colin C, Pujana MA, Ross K, Magoffin D, Aronin N, Cascon A, Hayashida CY, Li C, Toledo SP, Stiles CD; Familial Pheochromocytoma Consortium. Novel pheochromocytoma susceptibility loci identified by integrative genomics. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9651-8.

⁸⁸ HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298-300.

⁸⁹ Rustin P, Munnich A, Rötig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet*. 2002 May;10(5):289-91.

⁹⁰ Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*. 1995 May 24;1271(1):195-204.

⁹¹ Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, Ohkubo T, Yoshimura S, Nakazawa H, Hartman PS, Ishii N. A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2001 Nov 9;276(45):41553-8. Epub 2001 Aug 29.

⁹² <http://www.lovd.nl/2.0/> LOVD v.2.0 - *Leiden Open Variation Database*

⁹³ Burnichon N, Rohmer V, Amar L, Herman P, Leboulleux S, Darrouzet V, Niccoli P, Gaillard D, Chabrier G, Chabolle F, Coupier I, Thieblot P, Lecomte P, Bertherat J, Wion-Barbot N, Murat A, Venisse A, Plouin PF, Jeunemaitre X,

Gimenez-Roqueplo AP; PGL.NET network. The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Aug;94(8):2817-27. Epub 2009 May 19.

⁹⁴Erlic Z, Rybicki L, Peczkowska M, Golcher H, Kann PH, Brauckhoff M, Müssig K, Muresan M, Schäffler A, Reisch N, Schott M, Fassnacht M, Opocher G, Klose S, Fottner C, Forrer F, Plöckinger U, Petersenn S, Zabolotny D, Kollukch O, Yaremchuk S, Januszewicz A, Walz MK, Eng C, Neumann HP; European-American Pheochromocytoma Study Group. Clinical predictors and algorithm for the genetic diagnosis of pheochromocytoma patients. *Clin Cancer Res.* 2009 Oct 15;15(20):6378-85. Epub 2009 Oct 13.

⁹⁵Renard L, Godfraind C, Boon LM, Vikkula M. A novel mutation in the SDHD gene in a family with inherited paragangliomas--implications of genetic diagnosis for follow up and treatment. *Head Neck.* 2003 Feb;25(2):146-51.

⁹⁶Mannelli M, Castellano M, Schiavi F, Filetti S, Giacchè M, Mori L, Pignataro V, Bernini G, Giachè V, Bacca A, Biondi B, Corona G, Di Trapani G, Grossrubatscher E, Reimondo G, Arnaldi G, Giacchetti G, Veglio F, Loli P, Colao A, Ambrosio MR, Terzolo M, Letizia C, Ercolino T, Opocher G; Italian Pheochromocytoma/Paraganglioma Network. Clinically guided genetic screening in a large cohort of italian patients with pheochromocytomas and/or functional or nonfunctional paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1541-7. Epub 2009 Feb 17.

APPENDICE A

GENE <i>SDHB</i>	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	T_{ann}	bp
Esone 1	AAGTCGCCCTGCCTCTCAG	AACTCACAAGCTGCTGCGAG	68°C	585
Esone 2	TTGGATATTGAATGCCTGCCTT	GGATGTGAAAAGCATGTCCCTAA	56°C	387
Esone 3	TCCGAAGGTGACCTGAGAAGA	GAAAAGGAATTAGGTTGCACAGC	56°C	387
Esone 4	TGATGGCACAGCAAGGAGG	AATAGCGTAACACACATAGCACTGC	60°C	337
Esone 5	AAAAGAGTCTGGCTTCTGCCTG	AATGGCTTGCATCAGCTTATGTT	58°C	387
Esone 6	TTGTTTCATGCACTGACCCCA	CTGTTTGGACTGGCTGGATGGC AA	56°C	368
Esone 7	CTGCACTCCCAGAGCTTTGAG	GACTAGGGTTGCTCTCTGCCA	56°C	342
Esone 8	TGAGGAAGGAGTTTCACCCAA	TCCCCTGCGGCAAGTTAAAG	56°C	388

Tabella 1: primer, temperatura di annealing (T_{ann}) e dimensioni di ciascun amplificato per gli 8 esoni del gene *SDHB*.

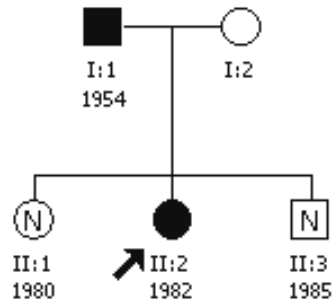
GENE <i>SDHC</i>	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	T_{ann}	bp
Esone 1	TCTCTAGGATCCCCGAGCG	TCTCTAGGATCCCCGAGCG	56°C	360
Esone 2	TCCCTTCACCCCTAAAAATAGAGA	TGGCGTGAACCCAAGAGG	56°C	308
Esone 3	AACCATGCCTGGCTTGGTATT	TCAACCTTCAGAACTTTCACCCA	56°C	307
Esone 4	CTGGGCAACAGAGCGAGACT	AAGAGACTTACTGTCCCTCTAA	64°C	352
Esone 5	CAGCCTGGGTGACAGAATGA	AGCGAGACTCCACTCTTGGG	60°C	493
Esone 6	TGGGTTTTGAGAAGGGTAAAGG	TTGCAGCCACCTCATCTTTAGA	56°C	505

Tabella 2: primer, temperatura di annealing (T_{ann}) e dimensioni di ciascun amplificato per i 6 esoni del gene *SDHC*.

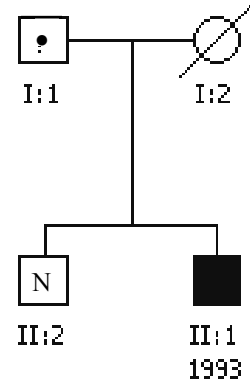
GENE <i>SDHD</i>	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	T_{ann}	bp
Esone 1	TGTTTTCTTTTCGTCGTCGTGG	CCTCACTTCCATCCCCTTCC	58°C	237
Esone 2	CTATTTATTGTTAAGTAGCTTACCTATG	GGAAGTCTTGCTAAAGGCATGA	56°C	337
Esone 3	CACTGCCTGTCAGTTTGGGTT	TCACAAATTTAGGGCATTTC AATC	56°C	387
Esone 4	AGACATTGCATTTGAACTTGACAGA	AGAGAAGAAGGCTGTCCACCAA	56°C	437

Tabella 3: primer, temperatura di annealing (T_{ann}) e dimensioni di ciascun amplificato per i 4 esoni del gene *SDHD*.

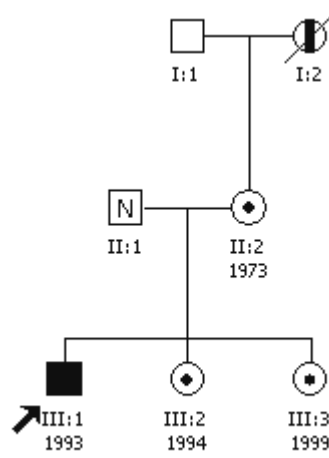
APPENDICE B



PGL 01



PGL 02



PGL 03