



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

*DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA*

*SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA*

*IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE*

*INDIRIZZO GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE*

*XX CICLO*

**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE  
DELLE VARIAZIONI DI SEQUENZA DEL GENE hIDS  
IN PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DI HUNTER**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore:** Dr. Maurizio Scarpa

**Supervisore:** Dr.ssa Rosella Tomanin

**Dottoranda:** Alessandra Zanetti

30 giugno 2008



Indice	pag.3
Riassunto	pag.5
Abstract	pag.7
<b>INTRODUZIONE</b>	pag.9
<b>Patologie da accumulo lisosomiale</b>	pag.9
<b>Le Mucopolisaccaridosi</b>	pag.11
<b>La Sindrome di Hunter</b>	pag.13
Diagnosi	pag.15
Il gene hIDS	pag.16
Lo pseudogene IDS-2	pag.17
L'enzima IDS	pag.17
Variazioni genetiche del gene hIDS	pag.18
Correlazione genotipo-fenotipo	pag.21
Casi MPS II di sesso femminile	pag.22
Terapie disponibili	pag.22
Approcci terapeutici sperimentali	pag.24
<b>SCOPO</b>	pag.26
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag.27
Sequenziamento diretto dei 9 esoni del gene hIDS	pag.27
Amplificazioni allele-specifiche	pag.29
Analisi delle delezioni del gene hIDS	pag.30
Analisi delle ricombinazioni gene-pseudogene	pag.31
Estrazione e analisi dell'mRNA	pag.32
Analisi delle mutazioni	pag.33
<b>RISULTATI e DISCUSSIONE</b>	pag.34
<b>Paziente ID</b>	pag.36
<b>Paziente PI</b>	pag.37
<b>Paziente LS</b>	pag.38
<b>Paziente TC</b>	pag.39
<b>Paziente CL</b>	pag.42
<b>Paziente NG</b>	pag.44

<b>Paziente AR</b>	pag.45
<b>Paziente CM</b>	pag.46
<b>Paziente MC</b>	pag.49
<b>Paziente DS</b>	pag.50
<b>Paziente LSJ</b>	pag.51
<b>Paziente CJS</b>	pag.55
<b>Paziente IS</b>	pag.56
<b>Paziente MV</b>	pag.59
<b>Paziente JM</b>	pag.64
<b>CONSIDERAZIONI FINALI</b>	pag.68
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag.71

## Riassunto

La sindrome di Hunter o mucopolisaccaridosi tipo II (MPS II) è una malattia rara *X-linked* recessiva determinata dalla mancanza o dall'alterata funzionalità dell'enzima lisosomiale iduronato-2-solfatasi (IDS), un'esoidrolasi coinvolta nel catabolismo dei glicosaminoglicani (GAG) eparan solfato e dermatan solfato. Il difettoso metabolismo di queste molecole determina un eccessivo accumulo lisosomiale di frammenti parzialmente degradati di eparan e dermatan solfato, con forme più o meno gravi di coinvolgimento di tutti i tessuti e organi.

La sindrome di Hunter può presentare un ampio spettro di fenotipi clinici dal severo all'attenuato. La diagnosi si basa sulla raccolta di dati clinici, sul dosaggio dei GAG urinari e sulla ricerca di mutazioni nel gene hIDS.

Fino a qualche anno fa il trattamento della sindrome di Hunter era essenzialmente palliativo e mirava a tenere sotto controllo i numerosi sintomi clinici associati alla patologia. Recentemente è stata approvata la terapia enzimatica sostitutiva con l'enzima umano ricombinante iduronato -2- solfatasi: questo trattamento ha permesso di migliorare molti dei segni e sintomi tipici della patologia e il complessivo stato di benessere dei pazienti.

Il gene hIDS è lungo circa 24 kb, mappa nella regione Xq27.3-q28 ed è costituito da 9 esoni. A 20 kb di distanza dal gene hIDS, in posizione distale verso il telomero, e in orientazione opposta, si trova uno pseudogene IDS-2 che presenta più dell'88% di identità con le sequenze degli esoni II e III e degli introni 2, 3 e 7 del gene hIDS.

Ad oggi sono state riportate più di 330 diverse mutazioni del gene hIDS: nella maggior parte dei casi (89%) si tratta di mutazioni puntiformi o piccole lesioni (< 20 bp). Il restante 11% consiste in grosse delezioni o riarrangiamenti genici. Il più comune riarrangiamento osservato è una ricombinazione omologa intracromosomica tra gene hIDS e pseudogene IDS-2.

In questo studio sono stati analizzati complessivamente 15 casi di MPS II: 11 pazienti italiani e 4 brasiliani. Sono state riscontrate 16 variazioni di sequenza di cui 12 mutazioni puntiformi o piccole lesioni, una delezione di media entità, due ampie delezioni, una ricombinazione associata a delezione. Di queste, 9 sono nuove ovvero non sono state descritte precedentemente in letteratura e 2 sono mutazioni *de novo*, in quanto la madre non è risultata portatrice della mutazione presente nel figlio.

Data la rarità della malattia e il fatto che la maggior parte delle mutazioni sono private, le valutazioni genotipo-fenotipo generalmente risultano particolarmente difficili.

Dei pazienti analizzati 9 presentavano un forma severa di patologia, 4 un fenotipo intermedio, 2 attenuato. Un tentativo di correlazione genotipo-fenotipo è stato effettuato per ogni caso. La completa assenza di un enzima funzionale dovuta alla delezione totale o parziale del gene è sembrata associata ad una forma severa della malattia in tutti i casi di grosse alterazioni analizzati. Per le mutazioni puntiformi, la correlazione col fenotipo è risultata più complessa e ha richiesto una particolare discussione per ogni singolo caso.

L'analisi molecolare è un valido supporto alla diagnosi clinica e biochimica poichè permette di terminare l'iter diagnostico, confermando e completando i dati forniti dalle prime. La sua maggiore applicazione rimane, tuttavia, l'identificazione delle portatrici tra i familiari di pazienti MPS II e per tale ragione è essenziale nella consulenza genetica delle famiglie a rischio. Inoltre, è estremamente utile nella diagnosi pre-natale, per verificare se il feto abbia ereditato una mutazione patogena dalla madre portatrice.

## Abstract

Hunter syndrome or mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is an X-linked disorder caused by the deficient activity of the lysosomal enzyme iduronate-2-sulfatase (IDS) causing accumulation of partially degraded dermatan and heparan sulfates in various tissues and progressive impairment of function.

Hunter syndrome is a disease with multiorgan and multisystem involvement that shows a complete spectrum of phenotypes from attenuated to intermediate and severe.

The diagnosis is based on the collection of clinical data, on dosage of urine GAG levels and on mutational analysis of the hIDS gene.

Until recently, the management of Hunter syndrome has been palliative and focused on the treatment of signs and symptoms. Enzyme replacement therapy (ERT) with recombinant human iduronate-2-sulfatase (idursulfase) has lately been introduced. ERT has been shown to improve many of the signs and symptoms and overall wellbeing of patients with MPS II.

The IDS locus, located on Xq27.3-q28, spans a region of 24 kb and contains 9 exons. At 20 kb telomeric and in opposite orientation to the IDS gene, a pseudogene, IDS2, containing sequences homologous to exons 2, 3 and introns 2, 3, 7 is present. To date, more than 330 different mutations have been identified in the IDS gene: 89% being small variations, while 11% major structural alterations. The most common rearrangement is an intrachromosomal homologous recombination event between IDS and IDS-2 sequences.

Fifteen unrelated patients were analyzed in this study, 11 Italian and 4 Brazilian. Among the 15 cases analyzed 16 sequence variations were detected: 12 point mutations or small deletions, one medium size deletion, 2 large deletions, a recombination associated to a deletion. Among them 9 were novel sequence variations and 2 were *de novo* mutations as the mother didn't result carrier.

The rarity of the disease and the fact that most mutations are private make evaluation of the genotype-phenotype correlation very difficult.

Among the 15 patients described, 9 showed a severe form of the pathology, 4 an intermediate one and 2 were mild. A genotype-phenotype relationship was attempted for each case. The complete absence of functional enzyme caused by total or partial gene deletion or by gene-pseudogene rearrangement seemed to result in a severe form in the cases analyzed. Genotype-

phenotype correlation for point mutations was more complex and a specific discussion was necessary for each sequence variation.

Molecular analysis is a valid method to support clinical and biochemical diagnosis confirming the results obtained from the previous approaches. Gene analysis is the only secure method to identify female carriers among a patient's relatives and therefore it is essential in genetic counselling. Furthermore, it is useful in prenatal diagnosis in order to detect the mutation carried by a heterozygote mother.



# INTRODUZIONE

## Patologie da accumulo lisosomiale

Le patologie da accumulo lisosomiale (LSDs) comprendono un gruppo di più di quaranta diverse malattie ereditarie con un'incidenza complessiva di 1:5000 nati vivi [Meikle et al, 1999].

Tali patologie sono dovute al deficit di uno o più enzimi catabolici lisosomiali o dei loro cofattori (saposine e catepsine) o all'alterazione del loro trasporto nei lisosomi (*Inclusion-cell disease*) oppure ancora ad un difetto di proteine strutturali a livello di membrana lisosomiale (sialidosi). Le proteine deficitarie sono idrolasi acide coinvolte nella degradazione di macromolecole che rilasciano i relativi prodotti catabolici nel citosol. Le patologie da accumulo lisosomiale sono classificate in base al meccanismo coinvolto nell'alterazione e in base alla natura dei substrati accumulati. Sono noti difetti di degradazione dei mucopolisaccaridi (es malattia di Hurler), delle glicoproteine (es mucopolipidosi), a carico degli sfingolipidi (es malattia di Gaucher) e a carico del catabolismo del glicogeno (es malattie di Pompe).

Le malattie lisosomiali sono trasmesse con modalità autosomica recessiva ad eccezione della sindrome di Hunter (MPSII) e della malattia di Fabry (sfingolipidosi), che presentano una trasmissione di tipo *X-linked* recessiva. Il difetto genetico a carico dell'enzima o dei cofattori comporta il progressivo accumulo all'interno dei lisosomi di molecole non degradate o solo parzialmente degradate e costituisce il primo passo del processo che sfocia in una patologia da accumulo lisosomiale. L'accumulo dei substrati di reazione determina l'alterazione di tutta l'architettura cellulare e, dal momento che i lisosomi sono contenuti in tutte le cellule dell'organismo, fatta eccezione per gli eritrociti, il danno si ripercuote a carico di tutti i tessuti e organi [Winchester et al, 2000].

Gli studi hanno dimostrato come la fisiopatologia di queste malattie non sia dovuta al solo accumulo dei substrati nei lisosomi, ma sia la conseguenza di una serie di eventi

biochimici e strutturali secondari all'accumulo stesso, con conseguenti implicazioni per la terapia [Vellodi, 2004].

Le malattie da accumulo lisosomiale sono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di malattie multisistemiche ad andamento progressivo, caratterizzate principalmente da dismorfismi facciali e scheletrici, da visceromegalia, da segni ematologici, da alterazioni oculari, con coinvolgimento del sistema nervoso centrale e del cuore. La specificità del quadro clinico delle diverse patologie lisosomiali deriva principalmente dalla variabile associazione delle diverse manifestazioni cliniche.

La classificazione e caratterizzazione diagnostica dei pazienti con sospetta malattia da accumulo tiene conto di questi pattern, in associazione alla presenza di segni clinici peculiari.

Ad oggi la diagnosi clinica di malattia lisosomiale viene confermata dalla dimostrazione del difetto enzimatico specifico mediante indagini biochimiche e, una volta confermato il difetto enzimatico, mediante indagini molecolari, se disponibili. I test biochimici comprendono analisi quantitative e qualitative per la rilevazione dell'accumulo di substrati non degradati nelle urine e per la mancanza dell'attività enzimatica specifica in linfociti, leucociti o fibroblasti cutanei primari. La diagnosi molecolare, pur non spiegando pienamente l'ampia eterogeneità clinica di questi difetti e il valore prognostico del genotipo, ha permesso comunque, di stabilire correlazioni genotipo-fenotipo per molte malattie lisosomiali e l'identificazione di varianti cliniche.

## **Le Mucopolisaccaridosi**

Le mucopolisaccaridosi sono una famiglia di malattie dovute alla mancanza di uno dei 10 enzimi lisosomiali implicati nel catabolismo del dermatan, eparan, cheratan e condroitin-solfato. Nel nostro paese l'incidenza di queste forme è di circa 1:100000 nati vivi (fonte: associazione MPS Italia). I pazienti affetti da MPS non sono, pertanto, in grado di degradare uno o più di questi mucopolisaccaridi che si accumulano progressivamente all'interno dei lisosomi provocando dapprima sofferenza e, successivamente, morte cellulare. Le manifestazioni cliniche che caratterizzano le diverse MPS sono essenzialmente correlate alla quantità e al tipo di sostanza accumulata, da cui in genere prende origine la denominazione delle malattie.

I glicosaminoglicani (GAG) sono lunghe catene non ramificate di polisaccaridi, composte da unità disaccaridiche ripetute in cui uno dei 2 residui zuccherini è sempre un aminozucchero, mentre l'altro è un acido iduronico o glucuronico. I glicosaminoglicani sono generalmente legati covalentemente a dei polipeptidi per formare i proteoglicani. Questi, a loro volta, interagiscono con un elevato numero di proteine fibrose partecipando alla formazione della matrice extracellulare, all'adesione cellulare, al differenziamento e alla crescita cellulare e all'apoptosi. A seconda dei residui glucidici, del tipo di legame tra i residui e della posizione in cui sono collocati i gruppi solforici, si distinguono quattro tipi principali di glicosaminoglicani: dermatan-, condroitin-, eparan- e cheratan-solfato. La degradazione dei GAG procede a partire dalla terminazione non ridotta, per azione di glicosidasi e solfatasi. In Tabella 1 sono riportati per ogni MPS l'enzima mancante e la patologia conseguente.

<b>Mucopolisaccaridosi</b>	<b>Molecola accumulata</b>	<b>Enzima deficitario</b>
MPS I (Hurler/Scheie)	Eparan-solfato Dermatan-solfato	Alfa-L-iduronidasi
MPS II (Hunter)	Eparan-solfato Dermatan-solfato	L-Iduronato-2-solfatasi
MPS IIIA (S.Filippo A)	Eparan-solfato	Eparan-sulfamidasi
MPS IIIB (S.Filippo B)	Eparan-solfato	Alfa-N-acetilglucosaminidasi
MPS IIIC (S.Filippo C)	Eparan-solfato	AcetilCoA alfa-glucosaminide-N-acetiltransferasi
MPS IIID (S.Filippo D)	Eparan-solfato	N-acetilglucosamina-6-solfatasi
MPS IVA (Morquio A)	Cheratan-solfato Condroitin-solfato	Solfatasi N-acetilgalattosamina-6-solfato
MPS IVB (Morquio B)	Galattosio-oligosaccaridi	Beta-D-galattosidasi
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Dermatansolfato	Arilsolfatasi B
MPS VII (Sly)	Condroitin-solfato, Eparan e Dermatan-solfato	Beta-D-glucuronidasi
MPS IX	Acido ialuronico	Ialuronidasi

Tabella 1: Classificazione delle mucopolisaccaridosi

Tutte le MPS sono trasmesse come malattie autosomiche recessive tranne la MPS II, che è legata al cromosoma X. Esse presentano *facies* caratteristica, epato-splenomegalia, disostosi multiple, alterazioni della mobilità articolare, dell'apparato cardiovascolare e respiratorio, della vista e dell'udito con infezioni ricorrenti e con una progressione degenerativa cronica della patologia [Neufeld e Muenzer, 2001]. Solo in alcune è coinvolto anche il sistema nervoso centrale. In particolare, la MPS IH (sindrome di Hurler), la forma severa della MPS II (sindrome di Hunter) e tutti i sottotipi della MPS III (sindrome di Sanfilippo) sono associate a profondo ritardo mentale [Neufeld e Muenzer, 2001].

Il decorso si diversifica nelle varie forme per l'epoca di insorgenza, la rapidità di evoluzione e la variabilità del fenotipo. Nelle forme più gravi la morte potrebbe sopraggiungere prima dei dieci anni di vita, mentre pazienti con le forme meno gravi possono sopravvivere fino a sessanta anni o più. I pazienti affetti da mucopolisaccaridosi, eliminano grossi quantitativi di GAG attraverso le urine e questo, insieme al dosaggio dell'attività enzimatica nei leucociti o nei fibroblasti, costituisce ancora oggi il metodo diagnostico più comune. Nessuna di queste

patologie è clinicamente individuabile già dalla nascita poichè l'accumulo dei GAG inizia a manifestarsi non prima del 1° anno d'età. In alcuni casi, si può giungere anche fino ai 3-4 anni di vita senza che sia stata possibile una diagnosi precoce e corretta della patologia associata al fenotipo.

La messa a punto di metodiche rapide e non invasive per la diagnosi presintomatica della malattia permetterebbe di applicare precocemente le terapie disponibili, che risultano tanto più efficaci quanto prima applicate.

## **La Sindrome di Hunter**

La mucopolisaccaridosi tipo II o sindrome di Hunter (MPS II, OMIM 309900) è una malattia *X-linked* recessiva con una frequenza in Italia di 1:132000 maschi nati vivi. E' determinata dalla mancanza o dall'alterata funzionalità dell'enzima lisosomiale iduronato-2-solfatasi (IDS; I2S; EC 3.1.6.13), un'esoidrolasi lisosomiale che catalizza la rimozione del gruppo solfato in posizione 2 dell'acido L-iduronico nei glicosaminoglicani eparan solfato e dermatan solfato. Il difettoso metabolismo di queste molecole determina un eccessivo accumulo lisosomiale di frammenti parzialmente degradati di eparan e dermatansolfato, con forme più o meno gravi di coinvolgimento di tutti i tessuti e organi [Neufeld and Muenzer, 2001].

La prima descrizione di un caso di MPS II è stata effettuata nel 1917 dal medico canadese Charles Hunter da cui la malattia prese il nome.

La sindrome di Hunter è una patologia a coinvolgimento multisistemico e multiorgano che presenta un'età di insorgenza e un grado di progressione variabili.

I pazienti affetti da MPS II mostrano un ampio spettro di fenotipi clinici, dal severo all'attenuato. I sintomi precoci sono rappresentati da infezioni dell'alto tratto respiratorio, ernie inguinali e ombelicali e rigidità articolare. I tratti specifici delle forme più severe vanno da precoci disturbi del comportamento a un profondo ritardo mentale. Inoltre dimorfismi, disostosi e cifoscoliosi progrediscono rapidamente con l'età portando ad una bassa statura accanto a sintomi come epatosplenomegalia, alterazioni delle valvole cardiache e sordità. In genere la morte sopraggiunge entro il 15esimo anno d'età per complicazioni. Nelle forme attenuate non c'è coinvolgimento neurologico; dimorfismi e disostosi progrediscono lentamente, mentre la statura è pressochè normale. In questi casi i pazienti sopravvivono fino alla quarta decade di vita e sono stati descritti casi di soggetti affetti che hanno avuto figli [Froissart et al, 2007].

La valutazione dei fenotipi clinici e la predizione della loro severità, tuttavia risultano particolarmente difficili a causa dell'età precoce dei pazienti al momento della diagnosi, della rarità della patologia e della mancanza di un indice standardizzato di severità della patologia [Beck and Wraith, 2007]. Importanti progressi in questo senso potrebbero derivare dalla recente costituzione del cosiddetto HOS, *Hunter Outcome Survey*, deputato alla raccolta internazionale di dati dei casi di sindrome di Hunter giunti all'osservazione specialistica allo scopo di valutare ipotesi cliniche e condividere informazioni sui pazienti.

Da un largo studio clinico su 77 pazienti MPS II, Schwartz e colleghi suggeriscono un approccio prognostico sulla severità della patologia basato su osservazioni di alcuni sintomi clinici precoci che sono stati osservati essere associati a forme severe della malattia. Tali sintomi comprendono: ritardo mentale, ritardo nello sviluppo del linguaggio, disordini comportamentali ed episodi convulsivi. Tuttavia, come è stato osservato per altre malattie lisosomiali, la problematica principale, al di là del grado di severità della patologia, è il significativo ritardo tra la comparsa dei primi segni e sintomi e la diagnosi effettiva di sindrome di Hunter [Schwartz et al, 2007].

## Diagnosi

La raccolta di dati clinici è il primo approccio per una corretta diagnosi della patologia. I segni e sintomi descritti non sono peculiari della MPS II e non si manifestano tutti in ogni paziente. I primi sospetti derivano dalla caratteristica *facies* che presentano i bambini malati (figura 1).



*Figura 1: fotografie di un paziente MPS II all'età di 6 mesi, 5, 9, 30 anni (da sinistra a destra) mostrano la progressione della caratteristica facies della sindrome di Hunter*

La valutazione dei GAG urinari è comunemente il saggio biochimico effettuato sui soggetti sospetti MPS II; tale test può essere quantitativo (misura dei GAG urinari totali) o qualitativo (elettroforesi dei GAG) e comunque non offre una diagnosi definitiva.

Una conferma dei risultati del dosaggio di GAG viene in seguito ottenuta mediante saggi di attività enzimatica effettuati su leucociti, fibroblasti o plasma, utilizzando specifici substrati per l'enzima IDS. In parallelo dovrebbe essere valutata l'attività enzimatica di un'altra solfatasi allo scopo di escludere una deficienza multipla di solfatasi. Nella quasi totalità dei casi, viene riportata un'attività residua molto bassa, al di sotto del limite di risoluzione del saggio effettuato con procedura standard, o assente.

La ricerca di mutazioni nel gene hIDS completa l'iter diagnostico offrendo una conferma molecolare della diagnosi clinica e biochimica. L'analisi si basa sul sequenziamento diretto delle regioni codificanti del gene hIDS e delle sequenze fiancheggianti.

L'analisi molecolare, inoltre, è l'unica metodica per l'identificazione delle portatrici tra le familiari di un soggetto affetto. La valutazione dell'attività enzimatica non risulta utile per questo scopo, poichè, sebbene l'attività IDS nelle *carriers* sia mediamente il 50% di quella rilevata nei soggetti sani, la distribuzione è piuttosto ampia ed esistono considerevoli sovrapposizioni.

La diagnosi prenatale, se la mutazione della madre è nota, si basa anch'essa sulla ricerca della variazione di sequenza, nelle cellule provenienti dal liquido amniotico o da una biopsia dei villi coriali, mediante metodiche molecolari.

Negli ultimi tempi, numerosi laboratori stanno investendo molti mezzi nella messa a punto di metodologie di valutazione dell'attività enzimatica allo scopo di iniziare un programma di *screening* sui neonati per le malattie lisosomiali. La loro incidenza complessiva infatti (1 su 7000 nati vivi) giustifica un programma di questo tipo. Questo permetterebbe di giungere ad una diagnosi molecolare in tempi precoci e, di conseguenza, di iniziare il trattamento prima che si manifestino i primi sintomi, rallentando così il decorso progressivo della malattia.

### Il gene hIDS

Il gene hIDS è lungo circa 24 kb e mappa nella regione cromosomica Xq27.3-q28. E' costituito da 9 esoni, dei quali l'esone 8 è presente in due varianti 8a e 8b che codificano per le due isoforme A e B dell'enzima (figura 2).

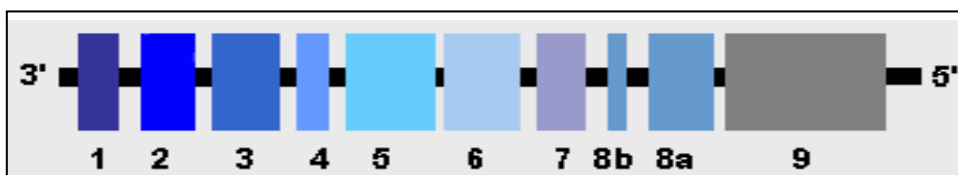


Figura 2: rappresentazione grafica del gene hIDS.

Un processo di *splicing* alternativo determina la scelta della variante esonica. Nel caso in cui venga trascritto il messaggero codificante per l'isoforma A del gene hIDS, l'*open reading frame* è costituito da 1650 bp, comprende gli esoni dall'I al IX e codifica per un polipeptide di 550 residui amminoacidici che, con un peptide segnale di 25 amminoacidi e 7 potenziali siti di N-glicosilazione, rappresenta la forma funzionale dell'enzima [Bonnuccelli et al, 1998]. Qualora venga trascritta l'isoforma B, l'*open reading frame* è costituito da 1029 bp, comprende gli esoni dall'I all'VIIIb e codifica per un polipeptide di 343 residui amminoacidici, la cui funzione non è nota.



## Lo pseudogene IDS-2

A 20 kb di distanza dal gene hIDS, in posizione distale verso il telomero, si trova una regione che presenta un alto livello di similarità con il *locus* hIDS. Essa si estende per circa 3 kb, ed è orientata inversamente rispetto al gene hIDS. In particolare, possiede più dell'88% di identità con le sequenze degli esoni II e III e degli introni 2, 3 e 7 del gene hIDS e per tale motivo è stata definita uno pseudogene, IDS-2 ( $\psi$ IDS, I2S2)

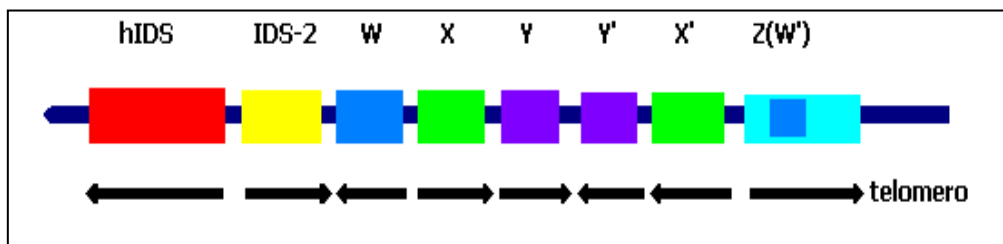


Figura 3: rappresentazione grafica della regione genomica situata distalmente al gene hIDS.

L'alto livello di similarità tra il gene e lo pseudogene IDS-2 determina eventi di ricombinazione omologa intracromosomica tra queste due regioni, responsabili del riarrangiamento del gene hIDS e quindi causanti malattia.

Distalmente rispetto al locus IDS-2, nella regione Xq27.5, mappano altri geni la cui funzione è sconosciuta: i geni W, X e Y. Essi, inoltre, si trovano duplicati e invertiti a livello della regione Xq28; i geni duplicati sono denominati Y', X' e Z e presentano un'identità del 94% rispetto ai geni W, X e Y (figura 3)[Lagerstedt et al, 2000].

## L'enzima IDS

L'isoforma A della proteina iduronato-2-solfatasi, di 550 amminoacidi, ha un unico dominio funzionale, che contiene sia un polipeptide di 42 KDa, sia un polipeptide di 14 KDa (iduronato-2-solfatasi del fegato) e che mostra un alto grado di omologia con la famiglia delle proteine solfatasi. La sua attività catalitica consiste nell'idrolisi del gruppo 2-solfato dell'unità L-iduronato-2-solfato presente nel dermatan solfato e nell'eparan solfato. Prodotta da un gran numero di tessuti, essa viene prima sintetizzata sottoforma di due precursori di 90 e 76 KDa nel reticolo endoplasmatico e trasportata in questa forma al complesso del Golgi. Qui subisce

una serie di modificazioni post-traduzionali, tra cui l'attacco del gruppo terminale mannosio-6-fosfato ad alcune catene N-oligosaccaridiche laterali. L'enzima viene legato da recettori specifici per il mannosio-6-fosfato presenti sulla superficie interna del Golgi e viene indirizzato ai lisosomi tramite una vescicola trasportatrice. Qui i due precursori subiscono un taglio proteolitico e vengono convertiti in polipeptidi maturi di 45 e 42 kDa ovvero l'isoforma A e B dell'enzima. L'isoforma A rappresenta la forma funzionale dell'enzima, mentre la funzione dell'isoforma B non è stata ancora chiarita [Daniele et al, 2002].

### **Variazioni genetiche del gene hIDS**

Ad oggi sono state riportate più di 330 diverse mutazioni del gene hIDS [Human Gene Mutation Database, giugno 2008].

La patologia presenta un'ampia eterogeneità genetica, in quanto buona parte delle mutazioni sono private.

Nella maggior parte dei casi (89%) si tratta di mutazioni puntiformi o piccole lesioni (< 20 bp): il 44% del totale è rappresentato da mutazioni missenso, il 10% da mutazioni nonsense, il 9% da alterazioni dei siti di *splicing* mentre il 26% è costituito da piccole inserzioni/delezioni [Lualdi et al, 2006]. Queste sono relativamente più frequenti negli esoni III, VIII e IX e generalmente consistono in transizioni C>T o G>A a livello di dinucleotidi CpG (*hotspot*) probabilmente dovute ad un processo di metilazione-deaminazione [Li et al, 1999].

Mentre le mutazioni evidenziate nell'esone IX interessano specifici codoni (*hot-spot*), le variazioni dell'esone III presentano una distribuzione casuale lungo la sequenza codificante; l'esone III contiene infatti due sequenze solfatasiche altamente conservate dal punto di vista evolutivo e codifica per il residuo Cys84, la cui ossidazione in formilglicina (FGly) è essenziale per l'attivazione della solfatasi.

Nel gene hIDS sono stati evidenziati due polimorfismi esonici: p.T146T nell'esone IV e p.R313C nell'esone VII [Li et al, 1995, Gort et al, 1999].

Il restante 11% dei casi consiste in grosse delezioni o riarrangiamenti intracromosomici tra le regioni a più alta similarità di gene e pseudogene. Nella maggior parte di questi avviene una ricombinazione omologa intracromosomica tra il gene hIDS e il suo pseudogene: in particolare il riarrangiamento avviene tra l'introne 7 di hIDS e la sua regione omologa in IDS-

2 e comporta un'inversione della sequenza genomica compresa, senza alcuna rilevabile delezione o inserzione (figura 4) [Bondenson et al, 1995].

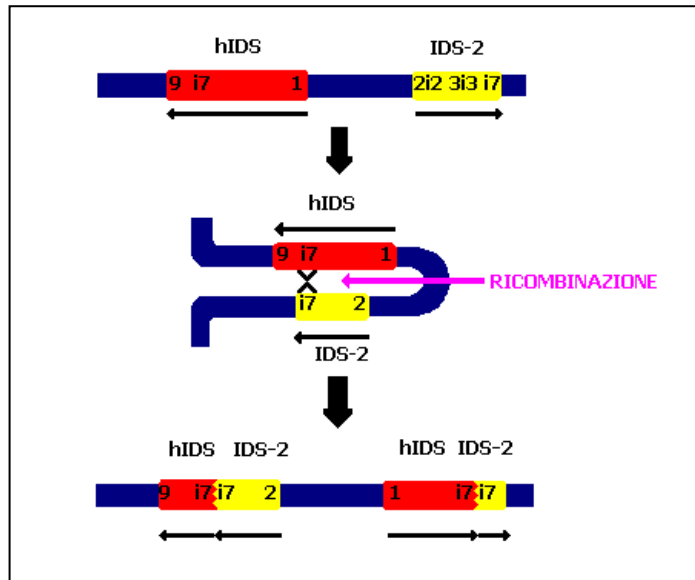


Figura 4: ricombinazione omologa intracromosomica tra IVS 7 di hIDS e IVS 7 di IDS-2.

Il sequenziamento dei frammenti di giunzione in alcuni pazienti ha messo in evidenza che la ricombinazione avviene in differenti siti all'interno di una stessa regione lunga circa 1 kb (*hot spot*) che presenta un grado di similarità maggiore rispetto al livello di similarità complessivo tra gene e pseudogene (98% vs 88%). Il meccanismo molecolare suggerito si basa su un modello di taglio del doppio filamento di DNA (*double strand break*) che prevede, in seguito alla doppia rottura, l'azione di una 5'-3' esonucleasi, l'invasione di un filamento 3'OH libero sul suo omologo nella molecola donatrice e la sua azione come *primer* della riparazione del DNA (figura 5). Questo modello spiegherebbe il pattern alternato di sequenze hIDS e IDS-2 evidenziato nei frammenti di giunzione attraverso un fenomeno di *gene conversion* ovvero riparazione di *gap* a doppio filamento o di *mismatch* che convertono la sequenza del gene in quella dello pseudogene o viceversa. Analoghi processi di inversione sono stati evidenziati tra l'introne 22 del gene del fattore VIII della coagulazione e la regione omologa di una delle sue due copie [Lagerstedt et al, 1997].

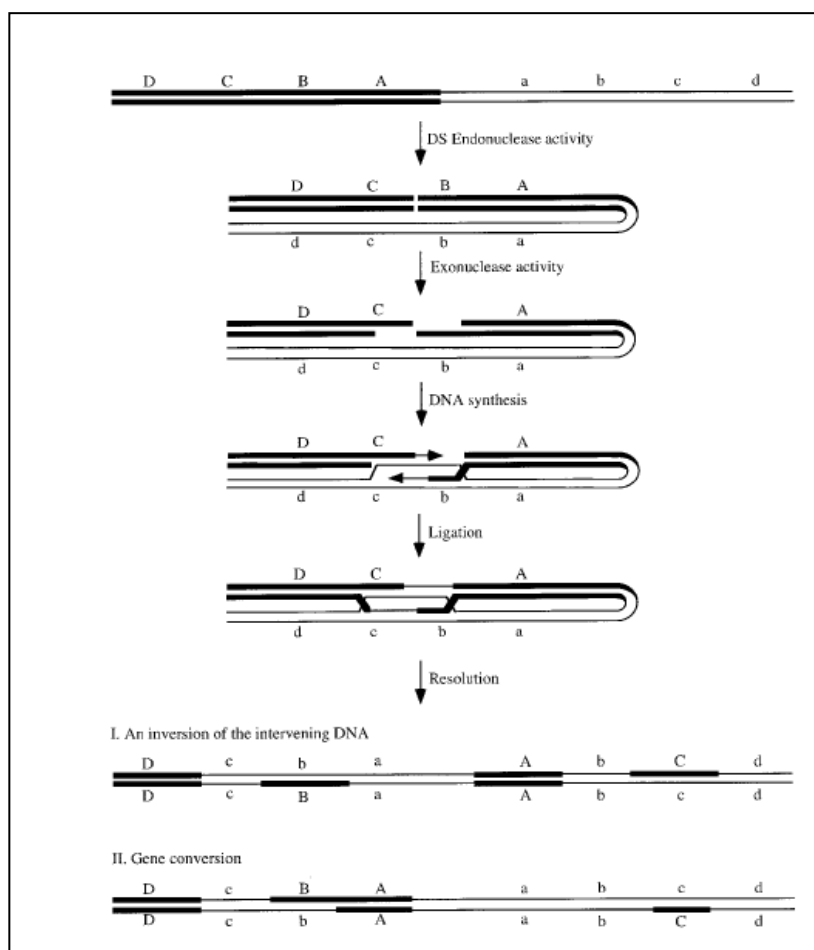


Figura 5: meccanismo molecolare suggerito per la ricombinazione omologa intracromosomica (double-strand break model)[Lagerstedt et al,1997].

In letteratura, inoltre, sono stati descritti eventi di ricombinazione analoghi a quello descritto sopra, ma che, a differenza di questo, comportano una delezione del frammento genico coinvolto e l'inserzione di una porzione dello pseudogene IDS-2 in orientazione opposta [Birot et al, 1996a, Bunge et al, 1998, Li et al, 1999].

Numerosi lavori, inoltre, hanno descritto delezioni parziali o totali del gene coinvolgenti, in alcuni casi, i geni distali ad hIDS quali IDS2, W, X, Y [Lagerstedt et al 2000] o i geni prossimali come FMR1 e FMR2, loci comunemente associati alla sindrome da X fragile [Birot et al, 1996b, Timms et al, 1997].

## Correlazione genotipo-fenotipo

La rarità della sindrome di Hunter e il fatto che la maggior parte delle mutazioni siano private rende difficile qualsiasi tipo di correlazione tra genotipo e fenotipo. Tuttavia, solo la completa assenza di un enzima funzionale in seguito a delezione totale o parziale del gene o dovuta a riarrangiamenti gene-pseudogene sembrerebbero sempre associate ad un fenotipo severo. Negli altri casi è riportato un'intero spettro di fenotipi dal severo all'attenuato [Martin et al, 2008].

Gli studi di espressione consentono di effettuare una valutazione *in vitro* delle conseguenze di una mutazione sulla funzionalità enzimatica attraverso misurazioni dell'attività IDS, studi sul processamento proteico e sulla localizzazione subcellulare. Ad oggi solo alcune mutazioni sono state espresse con successo e nella maggior parte dei casi, i risultati ottenuti sono concordi con le osservazioni cliniche [Froissart et al, 2007].

Altri tentativi di analisi delle conseguenze funzionali delle mutazioni si basano su studi strutturali. Viene utilizzato un modello di struttura terziaria di IDS creato mediante *homology modeling* avvalendosi delle strutture cristallografiche delle arilsolfatasi A e B umane. Tale approccio, tuttavia, non basandosi sulla struttura cristallografica dell'IDS, necessita di ulteriori conferme [Kato et al, 2005; Sukegawa et al, 2006].

Un altro approccio promettente, proposto di recente, si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali creati sull'enzima IDS denaturato, allo scopo di rilevare progressivi cambiamenti strutturali della proteina in presenza di una mutazione [Parkinson-Lawrence et al, 2005].

Tali approcci, tuttavia, non spiegano per quali ragioni mutazioni comuni osservate in diversi gruppi etnici siano associate a un fenotipo clinico variabile (es. p.R443X) o perché variazioni genetiche che causano drastici cambiamenti nel sito attivo diano un fenotipo di severità intermedia (es.p.H138D, p.D334N).

Altri studi che cercano di chiarire correlazioni genotipo-fenotipo si basano sulla valutazione dell'azione di meccanismi quali *non-sense mediated decay* (NMD) e *nonstop decay* su molecole di mRNA recanti mutazioni nonsense e *frame-shift*, mediante real-time RT-PCR. Questi meccanismi mirano, rispettivamente, a limitare la sintesi di proteine anomale attraverso l'eliminazione degli mRNA contenenti precoci codoni di stop traduzione (situati a più di 50-55nt a monte della giunzione esone-esone) o privi di codoni di stop in fase di lettura [Lualdi et al, 2006].

## **Casi MPS II di sesso femminile**

Poichè la MPS II è una malattia recessiva legata al cromosoma X, normalmente i soggetti affetti da sindrome di Hunter sono di sesso maschile; tuttavia, molto più raramente, la malattia può colpire anche le femmine. E' noto infatti che, per quanto riguarda i caratteri legati al cromosoma sessuale, le femmine possono essere definite come un mosaico. Questa definizione è una diretta conseguenza dell'inattivazione dell'X (o lionizzazione), il meccanismo attraverso cui in ogni singola cellula femminile viene scelto, in modo del tutto casuale, di inattivare il cromosoma X di origine paterna, o il cromosoma X di origine materna. L'inattivazione avviene dopo un procedimento di metilazione delle isole GC sparse in tutto il genoma, anche se per le malattie di origine genetica sono interessanti quelle che si trovano lungo il cromosoma X.

Le cause molecolari alla base della MPS II negli 11 casi di sesso femminile descritti fino ad oggi in letteratura , sono le seguenti:

- inattivazione *non random* del cromosoma X: 10 casi descritti; essa può essere :
  - idiopatica [Mossman et al, 1983; Clarke et al, 1991; Clarke et al, 1992; Sukegava et al, 1997; Sukegava et al, 1998; Cudry et al, 2000]
  - secondaria a gravi alterazioni di uno dei due cromosomi X [Broadhead et al, 1986; Clarke et al, 1990; Roberts et al, 1989]
  - secondaria ad inattivazione *non random* speculare del cromosoma X nei gemelli monozigoti [Winchester et al, 1992]
- omozigosi: un solo caso descritto [Cudry et al, 2000]

## **Terapie disponibili**

Fino a qualche anno fa non esisteva un trattamento efficace per la sindrome di Hunter: le cure erano essenzialmente palliative e miravano a tenere sotto controllo i numerosi sintomi clinici associati alla patologia.

Tra i trattamenti valutati va ricordato il trapianto eterologo di cellule staminali ematopoietiche. I potenziali benefici di questo approccio nel trattamento delle malattie lisosomiali sono dovuti probabilmente alla sostituzione dei macrofagi IDS-deficienti con i

macrofagi di origine midollare del donatore (cellule di Kupfer e cellule della microglia) che rappresentano una fonte di enzima capace di raggiungere i vari siti di accumulo di GAG. Tale terapia si è dimostrata efficiente nel migliorare il decorso clinico in pazienti affetti da MPS I e MPS VI, invece i risultati a lungo termine su pazienti Hunter non si sono rivelati così soddisfacenti [Vellodi et al, 1999].

La terapia enzimatica sostitutiva è stata di recente approvata per il trattamento di pazienti MPS II negli Stati Uniti, in Europa e in Svizzera. L'enzima ricombinante prodotto in linee cellulare umane e purificato (Elaprase, Shire Human Genetics Therapies, Cambridge, MA, USA) viene somministrato settimanalmente mediante infusione, in un arco di tempo di 3 h, ad una dose pari a 0.5 mg/kg di peso corporeo. La risposta a questo tipo di terapia dipende dalla severità della patologia e dall'età alla quale si inizia il trattamento. L'enzima ricombinante non è, tuttavia, in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica e quindi la sua somministrazione non è sufficiente per il trattamento del coinvolgimento neurologico. Il trattamento di pazienti di età inferiore ai 5 anni è tuttora limitato in quanto è difficile monitorare la risposta alla terapia, poiché il bambino non è ancora in grado di collaborare nei test clinici. Esistono tuttavia dei test clinici obiettivi che possono essere e vengono impiegati per il monitoraggio. Anzi, come tutti dicono ormai, il trattamento precoce è auspicabile. Una prima risposta all'ERT osservata nei pazienti trattati è una maggiore vitalità e capacità di prendere parte alle normali attività giornaliere. Dopo 2 mesi di somministrazioni, nella maggior parte dei casi si ha una riduzione dei GAG urinari a livelli normali e una diminuzione delle dimensioni di fegato e milza. A 3 mesi si osserva un miglioramento della mobilità articolare, mentre a 6 mesi la maggior parte dei pazienti mostra una stabilizzazione delle funzioni polmonari e un miglioramento della capacità di camminare (nel *6-minutes walk test*). La maggior parte dei miglioramenti tuttavia viene raggiunto nei primi 12-18 mesi, dopo i quali le condizioni dei soggetti in terapia si stabilizzano.

Le uniche reazioni avverse osservate nei pazienti sottoposti a ERT sono dovute all'infusione; si tratta di reazioni che compaiono durante la somministrazione come febbre, brividi, orticaria e che vengono trattate sospendendo temporaneamente l'infusione e somministrando antistaminici e paracetamolo. Reazioni avverse tardive come eritemi e lievi difficoltà respiratorie possono comparire dopo 12 ore dall'infusione.

Durante il *trial* clinico sono stati rilevati IgG e IgM in alcuni momenti della terapia: tali anticorpi probabilmente hanno un effetto neutralizzante, poiché risultano associati ad un aumento transiente dei livelli di GAG urinari [Wraith et al, 2008].

Recentemente è stato proposto l'utilizzo di genisteina nel trattamento delle mucopolisaccaridosi. Questa molecola è un isoflavone derivato dalla soia, ha una struttura molecolare molto simile a quella degli estrogeni endogeni e si lega, sebbene con minore affinità rispetto all'estradiolo, ai recettori alfa e beta per gli estrogeni. E' una molecola nota da anni proprio per il suo effetto estrogenico per il quale è stata utilizzata nella profilassi e terapia dell'osteoporosi, menopausa, patologie cardio-vascolari, per la terapia del cancro e di altre malattie croniche.

L'effetto di riduzione sulla sintesi dei GAG indotto dalla genisteina non sembra tuttavia legato al suo effetto estrogenico, quanto piuttosto alla sua capacità di ridurre l'espressione di geni coinvolti nella loro sintesi, effetto che la molecola determinerebbe tramite inibizione dell'attività proteinchinasica del recettore per l'*epidermal growth factor* (EGF).

Questo effetto è stato di recente valutato *in vitro* con risultati mediamente positivi. Per tali ragioni la comunità scientifica e, soprattutto, le associazioni dei familiari dei pazienti MPS II hanno spinto perchè venisse proposta la somministrazione di questa molecola nei bambini malati, nella maggior parte dei casi affiancata alla terapia di sostituzione enzimatica.

### **Approcci terapeutici sperimentali**

Sono attualmente in fase di studio nuovi approcci terapeutici per trattare la sindrome di Hunter.

In particolare sono da ricordare le terapie con farmaci che potenziano il naturale superamento in fase di traduzione (*read-through*) delle mutazioni nonsense recanti un codone di stop a bassa fedeltà (TGA anzichè TAG e TAA). I farmaci sperimentati in questo senso sono antibiotici aminoglicosidici come la gentamicina: questa molecola legandosi al ribosoma influenza il processo di riconoscimento tra il codone di stop e il tRNA determinando il *read-through* del codone stesso. Studi preclinici sono in corso per il trattamento di alcune malattie genetiche tra cui la MPS I; uno studio clinico su pazienti affetti da fibrosi cistica ha permesso di evidenziare miglioramenti biochimici e istologici. Poichè ridotti livelli di attività



enzimatica possono essere sufficienti per migliorare il decorso della sindrome di Hunter, questo approccio potrebbe risultare una strategia valida [Brooks et al 2006].

Un altro interessante approccio terapeutico è definito *enzyme enhancement therapy* (EET); consiste nell'utilizzo di piccole molecole chiamate chaperonine farmacologiche che permettono di recuperare quelle proteine mutate instabili o che non hanno subito un *folding* corretto e che quindi rimangono intrappolate nel reticolo endoplasmatico andando incontro a degradazione attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma. Queste molecole si legano reversibilmente alla proteina mutata e la stabilizzano, impedendone la degradazione e indirizzandola ai lisosomi [Desnick, 2004].

Entrambi gli approcci potrebbero essere utili nel trattare le forme di MPS II a coinvolgimento neurologico poiché entrambi i tipi di farmaci sono molecole di piccole dimensioni e quindi potenzialmente in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

## **SCOPO**

Lo scopo del presente lavoro è stato lo studio e la caratterizzazione molecolare delle variazioni di sequenza del gene hIDS in un gruppo di pazienti affetti da sindrome di Hunter.

Le variazioni di sequenza del gene hIDS sono prevalentemente mutazioni private e nell'11% dei casi sono alterazioni ampie e complesse che comportano delezioni parziali e totali del gene. L'analisi molecolare che permette la loro caratterizzazione risulta essere di conseguenza impegnativa richiedendo l'utilizzo di metodiche che vanno dal sequenziamento diretto all'analisi del cDNA ad altri approcci la cui applicazione è da valutare caso per caso.

L'analisi molecolare è un valido supporto alla diagnosi clinica e biochimica poiché permette di terminare l'iter diagnostico, confermando e completando i dati fornite dalle prime.

La maggiore applicazione della diagnosi molecolare rimane, tuttavia, l'identificazione delle portatrici tra i familiari di pazienti MPS II e per tale ragione è essenziale nella consulenza genetica delle famiglie a rischio.

Inoltre, è utile nella diagnosi pre-natale, per verificare se il feto abbia ereditato una mutazione patogena dalla madre portatrice.

# MATERIALI E METODI

## Sequenziamento diretto dei 9 esoni del gene hIDS

### Estrazione del DNA da sangue periferico

Un campione di sangue periferico in EDTA è stato prelevato dai pazienti e dalle madri previa accettazione del consenso informato. Il DNA genomico è stato estratto secondo un protocollo standardizzato utilizzando un kit disponibile in commercio (QiAmp DNA Blood Mini Kit, Qiagen). È stato effettuato quindi un controllo quantitativo del DNA estratto per determinarne la concentrazione e qualitativo per valutarne il grado di contaminazione proteica mediante la misurazione dell'assorbanza a  $\lambda$  pari a 260 nm e a 280 nm.

Tramite la relazione  $1 \text{OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  si è risaliti alla concentrazione, mentre da un rapporto  $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}} > 1.8$ , la preparazione di DNA è stata considerata priva di rilevanti contaminazioni proteiche.

Infine è stato eseguito un controllo dell'integrità del DNA genomico estratto, mediante corsa elettroforetica in gel agarosio 0.8% p/v.

### Amplicazione mediante PCR delle sequenze esoniche del gene hIDS

A partire dalla sequenza genomica di riferimento AF011889, contenente le sequenze complete del gene hIDS e dello pseudogene IDS-2, sono stati progettate le sequenze dei *primers* utilizzati per amplificare i 9 esoni del gene hIDS e le relative regioni fiancheggianti.

I *primers* sono stati forniti dalla Sigma Genosys in forma liofilizzata e poi risospesi ad una concentrazione finale pari a 100 pmol/ $\mu\text{l}$ .

Le sequenze dei *primers* sono riportate di seguito:

	Nome <i>primer</i> (Posizione in AF011889)	Sequenza 5'-3'	Lunghezza amplicone (bp)
01	hIDS ex1ter.fw (261612-271634)	ttcccgacgaggagggtctct	350
02	hIDS ex1ter.rv (271943-271962)	ttcccgacgaggagggtctct	
03	hIDS ex2ter.fw (270838-270855)	cacgaagcagcacacacc	230
04	hIDS ex2ter.rv (271049-271068)	ggttcagtgctcagtcaggt	
05	hIDS ex3-pseudo.fw (269474-269494)	gagagccagtttatcaggcag	807
06	hIDS ex3-pseudo.rv (270258-270281)	gttacctaagagatggcagacatg	
07	hIDS ex4.fw (267608-267634)	accagtagtttatgtgacaaaggaaa	250
08	hIDS ex4.rv (267838-267858)	ggttccacttgcccatttgtt	
09	hIDS ex5.fw (264758-264777)	ctgtgcaaatccctccctca	350
10	hIDS ex5.rv (265085-265108)	aatctgtgtgtgtagccttcatgg	
11	hIDS ex6.fw (262916-262934)	aggacacctccacccaccg	400
12	hIDS ex6.rv (263293-263316)	gacagtgatagaccacaagcttg	
13	hIDS ex7.fw (256932-256956)	ttcacaaaagagaacacacccatgt	305
14	hIDS ex7.rv (257214-257237)	agcattatctctgtatgccttggc	
15	hIDS ex8bis.fw (253559-253581)	aacccccaaagcctatgattcaa	300
16	hIDS ex8bis.rv (253831-253859)	tcattttctgtcattctgtgcttttatg	
17	hIDS ex9.fw (249406-249428)	gctctaactcctcctctcaccagc	630
18	hIDS ex9.rv (250016-250035)	tggagcccagacaggttctt	

Tabella 2: primers utilizzati per l'amplificazione delle sequenze esoniche.

I *primers* utilizzati per l'amplificazione dell'esone III sono stati disegnati in modo da appaiarsi a regioni esterne alla regione di identità tra gene e pseudogene allo scopo di amplificare solamente la sequenza del gene hIDS.

La reazione di PCR è stata effettuata in 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 0.2 mM dNTPs, 0.5 pmol/μl di ciascun *primer*, 0.05U/ μl di AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems) e 100 ng di DNA genomico in un volume finale di 50 μl. La concentrazione finale di MgCl<sub>2</sub> varia da 1mM a 1.5mM a seconda dell'esone. Il programma di amplificazione prevede una

denaturazione iniziale 2' a 94°C, 35 cicli (94°C per 30", T<sub>annealing</sub> 30", 72°C per 5" ) e un'estensione finale 72°C per 7', con una temperatura di *annealing* compresa tra 58 e 64°C.

#### Reazione di *cycle-sequencing*

Gli amplificati ottenuti mediante PCR vengono purificati dai residui della reazione (primers, dNTPs non incorporati, Taq, sali) mediante filtrazione con colonnine Microcon® YM-100 (Millipore).

Viene quindi allestita la reazione di *cycle-sequencing* utilizzando 2 µl BigDye®Terminator v.3.1, 1.5 µl BigDye®Terminator Sequencing Buffer 5X, 3.2 pmol *primer* fw/rv e 5 µl di amplificato precedentemente purificato. I *primers* utilizzati per il sequenziamento sono gli stessi utilizzati per l'amplificazione eccetto per l'esone III e IV per i quali sono stati disegnati dei primers più interni.

Le reazioni di *cycle-sequencing* vengono purificate dai dideossi-nucleotidi non incorporati attraverso gel filtrazione utilizzando le colonnine CentriSep (Princeton Separation).

Le sequenze vengono analizzate mediante elettroforesi capillare con un sequenziatore automatico (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer). Gli elettroferogrammi ottenuti vengono letti dal *software* Chromas 2.0 e confrontati con la sequenza di riferimento mediante il programma BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

#### **Amplificazioni allele-specifiche**

Per l'analisi della mutazione c.1327C>T (p.R443X), ci si è avvalsi anche di *primers* allele-specifici allo scopo di amplificare l'allele normale e il mutato separatamente, per confermare i risultati ottenuto dal sequenziamento diretto.

Gli oligonucleotidi utilizzati sono riportati di seguito.

	Nome <i>primer</i> (Posizione in AF011889)	Sequenza 5'-3'
19	TC ex9 249779-249798 wt FW	tctccaagtcacggaatcg
20	TC ex9 249779-249798 mut FW	tctccaagtcacggaatca
21	TC ex9 249916-249935 wt RV	ccatggacctgtggaactt

Tabella 3: *primers* allele-specifici per l'allele wt e l'allele c.1327C>T.

## Analisi delle delezioni del gene hIDS

Per alcuni soggetti sono state messe appunto una serie di amplificazioni PCR allo scopo di delineare i confini di ampie delezioni coinvolgenti il gene hIDS e i geni posti distalmente ad esso. Sono stati disegnati *primers* che si appaiano agli introni 6, 7 e 8 del gene hIDS e ai geni W, X e Y.

I *primers* utilizzati sono riportati nella tabella seguente.

	Nome <i>primer</i> (Posizione in AF011889)	Sequenza 5'-3'	Lunghezza amplicone (bp)
22	hIDS IVS 8A fw (249787-249798)	gtcacggaatcgaatgct	533
23	hIDS IVS 8A fw (250300-250319)	aatgtgtggggtgatcctgt	
24	hIDS IVS 8B fw (251072-251091)	ctagccctgtctccaggatg	439
25	hIDS IVS 8B fw (251491-251510)	agatccagaaggccagaat	
26	hIDS IVS 8C fw (251993-252012)	gaggaggaaaacctccaagg	587
27	hIDS IVS 8C rv (252560-252579)	gtgcactgcatgtcctgtct	
28	hIDS IVS 8D fw (253150-253169)	ggggagggcagagtagaatc	550
29	hIDS IVS 8 rv (253681-253699)	ttccttacctcgacccttt	
30	Gene W ex5 fw (294932-294952)	tccactccattaagctggag	225
31	Gene W ex5 rv (295137-295156)	aggaatgggaaaggagagga	
32	Gene W ex3-4fw (296050-296069)	ccatgtggcgaaggtagact	189
33	Gene W ex3-4rv (296219-296239)	ttctggttctgggtatgatg	
34	Gene W ex 2 fw (299597-299617)	tcaaggagcctcttcagga	392
35	Gene W ex 2 rv (299824-299843)	ttggcataggcagaactgtg	
36	Gene X ex 1 fw (307922-307941)	gggaagcagaggactgttca	156
37	Gene X ex 1 rv (308058-308077)	aagaaggctgagcacacagg	
38	Gene X ex 5 fw (313484-313503)	cggtgacattggggaaactt	168
39	Gene X ex 5 rv (313632-313651)	acatccttcctcctttct	
40	Gene Y fw (323354-323373)	caagggtcgagctcctacag	169
41	Gene Y rv (323503-323522)	ggttgctttccaggttcag	

42	hIDS del 5-6 fw (261591-261608)	ggcagctggtatgaggta	
43	hIDS del 5-6 rv (267710-267727)	gctggtctttccacctt	

Tabella 4: oligonucleotidi utilizzati per la caratterizzazione delle delezioni.

### Analisi delle ricombinazioni gene-pseudogene

Tutti i soggetti risultati negativi al sequenziamento diretto o che amplificano solo alcuni esoni vengono sottoposti ad una rapida analisi basata su tecniche di amplificazione PCR, allo scopo di individuare i tipi piú comuni di ricombinazione gene-pseudogene.

La metodica, messa a punto da Lualdi e colleghi [Lualdi et al 2005], consiste in 2 PCR consecutive seguite da analisi mediante RLFP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) con appropriati enzimi di restrizione che tagliano o meno a livello delle regioni note di *mismatch* tra IDS e IDS2. La prima amplificazione seguita da digestione con *HinfI* permette l'individuazione dei soggetti che hanno subito ricombinazione. L'ulteriore digestione con l'enzima *SacI* dei pazienti ricombinanti permette di distinguere tra 2 pattern di ricombinazione a livello dell'IVS 7. I prodotti della seconda PCR vengono sottoposti a digestione con *Eco57I* allo scopo di analizzare l'*hot spot* IVS 3.

### Estrazione e analisi dell'mRNA

L'RNA è stato isolato dai pazienti per i quali erano disponibili dei fibroblasti ottenuti da biopsia cutanea. I fibroblasti sono stati coltivati in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), addizionato con siero fetale bovino al 10% (FCS), in presenza di penicillina/streptomina (10U/mL). Il materiale per colture cellulari è stato fornito da Gibco-Invitrogen. Le cellule sono state tenute in un incubatore umidificato a 37°C e in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>.

#### Estrazione dell'RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA è stato necessario adottare specifiche precauzioni tali da evitare la contaminazione dei campioni con RNAsi, in particolare si è utilizzato del materiale ad uso specifico e le soluzioni necessarie per l'estrazione sono state preparate con appositi reagenti.

L'estrazione dell'RNA totale a partire dai campioni processati è stata eseguita secondo protocolli che prevedono l'omogeneizzazione in 1 ml di TRIzol Reagent (Sigma).

Dopo incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti si aggiungono 200µl di cloroformio, si agita vigorosamente per 15 secondi e si incuba nuovamente a temperatura ambiente per altri 2-3 minuti. Si centrifuga a 12000 g per 15 min a 4°C, il surnatante viene prelevato e precipitato con 0.5 ml di isopropanolo. Segue un' incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente e una centrifugazione a 12000 g per 15 min a 4°C. Il surnatante viene rimosso e il precipitato di RNA viene lavato con 1 ml di etanolo al 75%, risospeso e centrifugato a 7500 g per 5 min a 4°C. Il precipitato di RNA viene fatto asciugare e quindi viene risospeso in un volume appropriato di dH<sub>2</sub>O RNAsi-free (10÷20 µl).

Prima di procedere alla retrotrascrizione si è effettuato un controllo quantitativo dell'RNA estratto attraverso la misurazione della densità ottica allo spettrofotometro, tenendo conto che per l'RNA una lettura di 1 OD<sub>260</sub> corrisponde ad una concentrazione di 40 µg/ml, e qualitativo mediante controllo in gel d'agarosio.

### Retrotrascrizione (RT-PCR)

La retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA è stata eseguita secondo protocolli standardizzati. La reazione di sintesi è stata condotta in una soluzione del volume finale di 20 µl con la seguente composizione: 2 µl di RNA (pari a ~ 1µg), 2 µl del tampone di reazione 10x, 1 µl di oligonucleotidi esamerici (*random primers*) 50 µM, 2 µl di dNTPs(10 mM ciascuno), 4 µl di MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µl di Rnase Inhibitor (20 U/µl) e 1 µl di trascrittasi inversa MuLV ( 50 U/µl). La reazione è stata condotta a 42°C per 30 minuti seguita da 5 minuti di inattivazione a 99°C. Prima di procedere all'amplificazione della regione d'interesse si è effettuato un controllo di qualità relativo alla bontà della retrotrascrizione amplificando il cDNA di un gene *housekeeping* (β actina).

### Amplificazione PCR del cDNA

Le reazioni di amplificazione vengono effettuate come descritto precedentemente.

A partire dalle sequenze del trascritto NM\_000202 codificate per la variante trascrizionale tipo 1 sono state disegnate una serie di coppie di *primers* che consentono di amplificare l'intera regione codificante.



Il set di primers utilizzati vengono riportati nella tabella 5 che segue

	Nome primer (posizione in NM_000202)	Sequenza (5'-3')	Amplicone (bp)
44	h $\beta$ -actina F	TCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGC	286
45	h $\beta$ -actina R	CATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGG	
46	hIDS isoA f1 fw (NM_00202: 211-231)	CTGTGTTGCGCAGTCTTCATG	800
47	hIDS iso A f1 rv (NM_00202: 991-1011)	TTATGATACCCAACGGCCAGG	
48	hIDS isoA f2 fw (NM_00202: 915-935)	CCTTGCCTGACAAACAGAGCA	705
49	hIDS iso A f2 rv (NM_00202: 1599-1619)	CAACGTGAAATGAAGGAACGG	
50	hIDS iso A f3 rv (NM_00202: 1521-1542)	CCATGGACCTTGTGGAAGCTTG	611
51	hIDS iso A f3 rv (NM_00202: 2112-2131)	CAGGCCAAATTGTTGATGCA	

Tabella 5: Primers housekeeping (controllo interno) e primers per l'analisi del messaggero.

### Analisi delle mutazioni

Le variazioni di sequenza individuate sono state riportate secondo la nomenclatura suggerita da den Dunnen, riportando la posizione dell'alterazione nucleotidica nella sequenza codificante e nella sequenza genomica (AF011889) e la posizione dell'eventuale sostituzione aminoacidica nella sequenza polipeptidica [den Dunnen and Antonarakis, 2001].

Inoltre per le mutazioni non descritte in letteratura si è valutato il loro eventuale effetto patogenico utilizzando il *software* disponibile in rete *Polyphen* che permette di valutare l'impatto di una sostituzione nucleotidica sulla struttura e funzione di una proteina attraverso valutazione strutturali e comparative [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>].

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Ricerca di variazioni di sequenza nel gene hIDS

I pazienti affetti da MPS II, giunti alla nostra attenzione, sono stati valutati per la ricerca di variazioni di sequenza nel gene hIDS mediante amplificazione e sequenziamento diretto della regione codificante e delle regioni introniche fiancheggianti.

Sono stati analizzati complessivamente 15 casi di MPS II: 11 pazienti italiani e 4 brasiliani. Sono state riscontrate 16 variazioni di sequenza di cui 10 mutazioni puntiformi, 2 piccole delezioni, una delezione di media entità, due ampie delezioni, una ricombinazione associata a delezione. Di queste, 9 sono nuove ovvero non sono state descritte precedentemente in letteratura.

Tra le mutazioni puntiformi 6 sono missenso e 3 nonsense. In un paziente sono state rilevate 2 mutazioni in *cis* nello stesso allele, mai descritte prima d'ora.

In 4 soggetti è stato evidenziato il polimorfismo c.438C>T (p.T146T).

Di tutti i soggetti eccetto uno si disponeva del DNA materno: l'analisi molecolare del gene hIDS nelle madri ha evidenziato la presenza della mutazione presente nel figlio in tutti i casi eccetto 2.

In alcuni casi si è analizzato il DNA di familiari della madre di sesso femminile, per verificare se fossero *carriers* dell'alterazione genetica trasmessa dalla madre.

La tabella 5 riassume le variazioni di sequenza rilevate nei soggetti analizzati.

Tutti i pazienti italiani e un brasiliano sono attualmente in terapia con l'IDS ricombinante [idursolfatasi o Elapraxe (Shire Human Genetics Therapies, Cambridge, MA, USA)]; inoltre, per volontà della famiglia, alcuni assumono genisteina [Soyfem (Biofarm, Poznań, Polonia)] al dosaggio di 5 mg/kg/die.

paziente	Sostituzione nucleotidica (a)	Esone/Introne	Sostituzione aminoacidica	Descrizione della variazione di sequenza	Riferimento (b)
<b>ID</b>	c.236C>A (g.270885 G>T)	ex II	p.A79E	Sostituzione aminoacidica	HGMD: CM981012
<b>MC</b>	c.189delT (g.270932delA)	ex II	p.N63KfsX129	Sostituzione aminoacidica, frameshift, inserimento 66 aa estranei; precoce codone stop	non descritta
<b>NG</b>	c.419G>T (g.267763 C>A)	ex IV	p.G140V	Sostituzione aminoacidica	Lualdi et al, 2006
<b>LSJ</b>	c.467C>A (g.267715 G>T)	ex IV	p.P156Q	Sostituzione aminoacidica	non descritta
	c.465T>A (g.267717 A>T)	ex IV	p.F155L	Sostituzione aminoacidica	non descritta
	c.438C>T (g.267744 G>A)	ex IV	p.T146T	Polimorfismo	Li et al, 1995
<b>DS</b>	c.473_475delATC (g.267707_267709delGAT)	ex IV	p.H159del	Delezione di un aminoacido	non descritta
	c.438C>T (g.267744 G>A)	ex IV	p.T146T	Polimorfismo	Li et al, 1995
<b>AR</b>	c.592G>A (g.264949 C>T)	ex V	p.D198N	Sostituzione aminoacidica	non descritta
	c.438C>T (g.267744 G>A)	ex IV	p.T146T	Polimorfismo	Li et al, 1995
<b>PI</b>	c.708G>A (g.264833 C>T)	ex V	p.K236K	Alterazione sito splicing 5', attivazione sito criptico, frameshift, inserimento 42 aa estranei; precoce codone stop	HGMD: CS961601
<b>CM</b>	c.792C>A (g.263159 G>T)	ex VI	p.Y264X	Precoce codone di stop	non descritta
<b>TC</b>	c.1327C>T (g.249798 G>A)	ex IX	p.R443X	Precoce codone di stop	HGMD: CM920368
<b>LS</b>	c.1327C>T (g.249798 G>A)	ex IX	p.R443X	Precoce codone di stop	HGMD: CM920368
<b>CL</b>	c.1403G>A (g.249722 C>T)	ex IX	p.R468Q	Sostituzione aminoacidica	HGMD: CM930422
<b>CJS</b>	g.271996_272174del			Delezione regione promotoriale	Timms et al, 1998
	c.438C>T (g.267744 G>A)	ex IV	p.T146T	Polimorfismo	Li et al, 1995
<b>IS</b>				delezione ex V-VI	non descritta
	g.257185 C>T	IVS 6			
<b>MV</b>				delezione gene hIDS IVS8-IDS2	non descritta
<b>JM</b>				delezione gene hIDS IVS.3-IVS7, inserzione IDS2	non descritta

Tabella 6: prospetto riassuntivo delle variazioni di sequenza riscontrate nei 15 pazienti analizzati.

(a) viene utilizzata come sequenza di riferimento la sequenza codificante e la sequenza genomica AF011889

(b) viene citato il codice d'accesso di Human Gene Mutation Database (HGMD) o nel caso la mutazione non sia citata in quest'ultimo, viene riportata la pubblicazione.

## **Paziente ID**

Il paziente ID, all'età di 15 anni, giunge al dipartimento di Pediatria di Padova per sospetta malattia da accumulo lisosomiale. Le condizioni generali del ragazzo sono buone: collabora e mostra un'intelligenza vivace. Tuttavia, in seguito a visita e ad analisi strumentali, mostra alcuni segni clinici che fanno sospettare si tratti di una MPS II: presenta tonsille ipertrofiche, epatosplenomegalia, addome globoso con ernia ombelicale, rigidità articolari. L'elettrocardiogramma rivela un soffio sistolico, insufficienza mitralica modesta e insufficienza aortica moderata. Le radiografie scheletriche evidenziano valgismo femorale e ossa delle mani grossolane. Il dosaggio dei GAG urinari e la valutazione dell'attività enzimatica IDS nei leucociti confermano il sospetto di MPS II.

Il paziente inizia la terapia enzimatica sostitutiva nel gennaio 2004 all'età di 19 anni: il trattamento determina un miglioramento generale della sintomatologia ad eccezione dei problemi cardiaci. Nel settembre 2006, infatti, viene ricoverato d'urgenza per fibrillazione atriale e viene sottoposto a cardioconversione elettrica. Poco dopo inizia la terapia antiaritmica con beta-bloccanti.

Il paziente attualmente prosegue le infusioni di idursolfatasi e assume genisteina.

### **Analisi molecolare**

Nel soggetto ID l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di una transversione C>A nell'esone II in posizione c.236, che comporta la sostituzione di un'alanina con l'acido glutammico al residuo 79 della proteina (p.A79E). Si tratta di una mutazione missenso già descritta in letteratura da Karsten e colleghi in un paziente russo con forma di patologia attenuata [Karsten et al, 1998]. Anche nel soggetto qui analizzato la malattia si presenta in forma non severa: il paziente ID infatti non mostra sintomi a livello neurologico e all'età di 23 anni svolge un'attività lavorativa.

Per verificare se la madre e le due sorelle maggiori del paziente fossero portatrici della mutazione c.236C>A, sono stati valutati i campioni di DNA di queste: tale variazione di sequenza è stata rilevata in eterozigosi soltanto nel DNA materno, mentre le due sorelle non sono risultate portatrici.

## **Paziente PI**

Il paziente PI presenta i primi sintomi già dal primo anno di vita, con frequenti affezioni delle alte vie respiratorie, una chiara macrocefalia e una *facies sui generis*. All'età di 2 anni e 4 mesi giunge all'attenzione del dipartimento di Pediatria di Padova, dove gli esami clinici rivelano un quadro di sintomi che comprende: epatosplenomegalia, ernia inguinale, lieve macroglossia, rigidità articolare, macrocefalia. A livello neurologico si evidenzia un lieve aumento del volume ventricolare e una caratteristica sella ad ogiva, mentre il cuore mostra insufficienze mitralica e aortica lievi. I GAG urinari risultano estremamente elevati (522 mg /g creatinina; v.n. 12-95 mg) e l'attività IDS leucocitaria rilevata è quasi nulla (0.8 nmol/mg/h): viene diagnosticata una MPS tipo II.

A giugno 2007, a 2 anni e 8 mesi, il bambino entra in terapia con Elaprase. Nel giro di un anno questo trattamento ha condotto ad una sensibile riduzione dei GAG urinari (118 mg/ g creatinina : v.n. 13-68 mg ) con normalizzazione dell'epatosplenomegalia e miglioramento della motilità articolare. Nel gennaio 2008 tuttavia si è reso necessario un'intervento di adenotonsillectomia allo scopo di migliorare la funzionalità respiratoria. Ad oggi il paziente continua la terapia enzimatica e assume genisteina; mostra un discreto sviluppo psicomotorio, anche se è rilevabile un lieve ritardo mentale.

### **Analisi molecolare**

Il sequenziamento diretto del gene hIDS nel paziente PI ha messo in evidenza la presenza della transizione c.708G>A già descritta in letteratura [Rathmann et al, 1996]. Si tratta di una mutazione silente che coinvolge l'ultimo nucleotide dell'esone V e altera il sito donatore di *splicing*: non si verifica, infatti, un cambiamento dell'aminoacido codificato dal codone (p.K236K). Gli effetti di questa variazione di sequenza sono stati studiati da Rathmann e colleghi che hanno rilevato in fibroblasti isolati un trascritto privo di 37 nucleotidi. La produzione di un trascritto più corto viene spiegata suggerendo l'utilizzo di un sito di *splicing* criptico (GGGT) all'interno dell'esone V situato in posizione c.670-673. L'alterazione condurrebbe ad uno sfasamento della fase di lettura e a una precoce terminazione della traduzione dopo l'incorporazione di 42 aminoacidi estranei all'enzima IDS [Rathmann et al, 1996].

A fine giugno 2007, nel momento in cui si stava analizzando la sequenza del gene del paziente PI e si stava verificando lo stato di portatrice della madre, questa ha dato alla luce un maschietto. Dato che non era stata eseguita una diagnosi prenatale poiché non si conosceva ancora la mutazione di PI, si temeva che anche il fratello potesse essere affetto dalla stessa malattia.

All'analisi la madre non presentava la mutazione c.708G>A e nemmeno il neonato. La variazione rilevata nel soggetto PI è quindi probabilmente una mutazione *de novo*, anche se un mosaicismo germinale non è mai escludibile.

Nei casi descritti da Rathmann e da Vafiadaki l'alterazione descritta è stata evidenziata in pazienti MPS II con forme intermedia e severa rispettivamente [Rathmann et al, 1996; Vafiadaki et al, 1998].

Il soggetto PI presenta una forma intermedia della patologia che data la sua precoce età potrebbe evolversi in una forma più severa come dimostrano alcuni segni clinici come il lieve ritardo mentale.

## **Paziente LS**

Il paziente LS viene diagnosticato nel 1985 all'età di 4 anni in seguito ad ernioplastica inguinale e ombelicale. Presenta una cardiopatia valvolare che nel 1994 rende necessario l'inserimento di protesi delle valvole aortica e mitralica. Nello stesso anno subisce un intervento di adenotonsillectomia e l'anno successivo è sottoposto a tracheostomia di cui è attualmente portatore. Soffre periodicamente di attacchi di panico e ansia e di episodi di cefalea. All'esame obiettivo mostra caratteristiche fisiche e del volto compatibili con la malattia: macrocrania, macroglossia, gibbo dorsolombare, disostosi ossee e rigidità articolari. Nel 2006 inizia la terapia enzimatica sostitutiva che comporta una riduzione dei GAG urinari, un miglioramento dell'epatosplenomegalia e a una stabilizzazione della motilità articolare; tuttavia, presenta scarsa autonomia di deambulazione e attualmente si muove con l'ausilio di una carrozzina. Non presenta coinvolgimento neurologico.

### Analisi molecolare

Nel paziente LS il sequenziamento del gene hIDS ha rilevato la presenza della transizione c.1327C>T a livello dell'esone IX. Questa variazione di sequenza determina la precoce terminazione della traduzione proteica a causa dell'inserimento di un codone di stop al posto del codone codificante per l'aminoacido arginina che, verosimilmente, comporta la produzione di una proteina tronca di 442 aminoacidi (p.R443X), invece che di 550 aminoacidi.

La mutazione è stata riscontrata nel campione di DNA della madre del paziente e confermata tramite digestione con l'enzima di restrizione *TaqI* (figura 6)

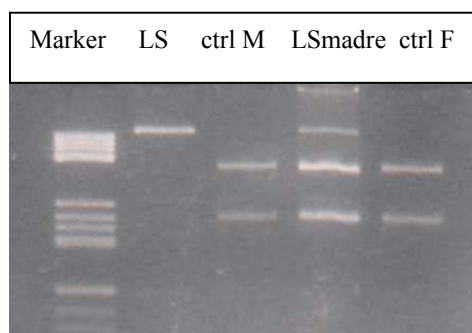


Figura 6: corsa elettroforetica degli amplificati dell'esone IX del soggetto LS, della madre, e di due soggetti di controllo maschio e femmina (*ctrl M*, *ctrl F*) digeriti con *TaqI*.

### **Paziente TC**

Nei primi 3 anni di vita il soggetto TC presenta frequenti infezioni delle vie aeree superiori, ipertrofia adenoidea e a 2 mesi gli viene riscontrata un'ernia inguinale. A 3 anni evidenzia ritardo nello sviluppo del linguaggio e rigidità articolari. A 4 anni, in seguito ad intervento di adenoidectomia e visita endocrinologica viene sospettata una mucopolisaccaridosi. Il dosaggio enzimatico effettuato poco dopo, permette di effettuare diagnosi di MPS II. Il paziente quindi viene inviato al Centro Malattie Metaboliche di Monza per la presa in carico e il *follow up*. A febbraio 2004, all'età di 7 anni, il bambino entra in trattamento con Elaprased; 4 anni di terapia hanno portato ad un miglioramento delle condizioni generali, della motilità articolare e dell'epatosplenomegalia.

### Analisi molecolare

Il sequenziamento diretto del gene hIDS nel soggetto TC ha evidenziato la presenza della transizione c.1327C>T a livello dell'esone IX. Questa variazione di sequenza determina la precoce terminazione della traduzione proteica a causa dell'inserimento di un codone di stop, come descritto per il paziente LS (p.R443X).

La mutazione non è stata messa in evidenza nel campione di DNA della madre del paziente tramite sequenziamento diretto e nemmeno attraverso digestione con l'enzima di restrizione *TaqI* (figura 7).

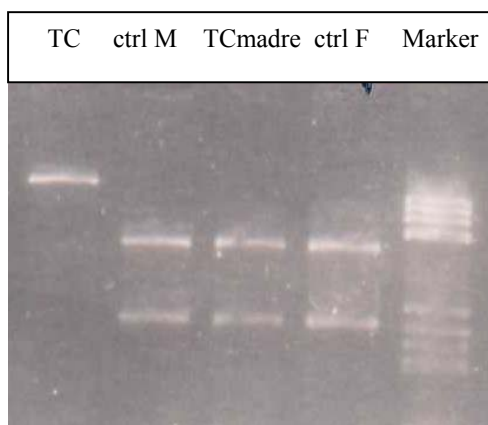


Figura 7: corsa elettroforetica degli amplificati dell'esone IX del soggetto TC, della madre, e di due soggetti di controllo maschio e femmina (ctrl M, ctrl F) digeriti con *TaqI*.

Ad ulteriore conferma dei risultati ottenuti dal DNA materno, sono state messe a punto amplificazioni PCR con *primers* allele-specifici per l'allele mutato e per l'allele normale allo scopo di evidenziare la presenza della mutazione nella madre. Sono stati utilizzati come controlli positivi i campioni di DNA della madre del soggetto LS (portatrice della mutazione p.R443X) e del paziente LS stesso. I risultati non hanno rilevato la presenza della mutazione in eterozigosi nella madre del soggetto TC (figura 8)



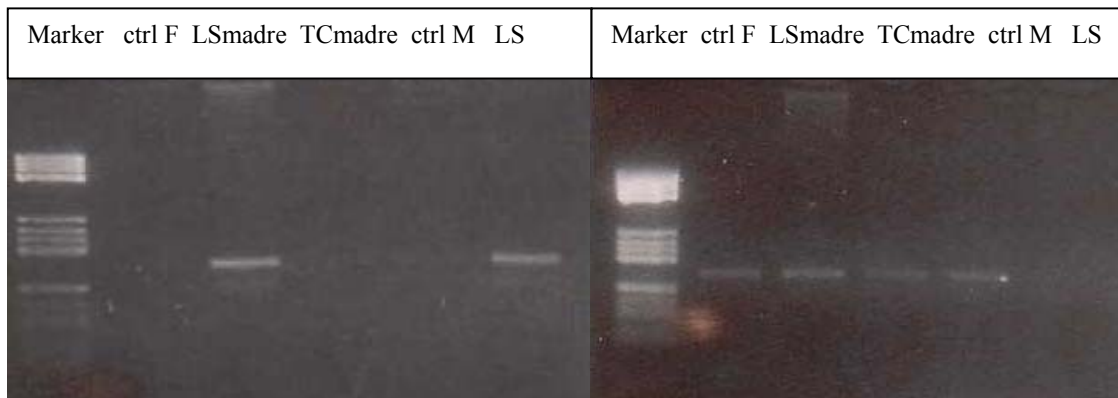


Figura 8: corse elettroforetiche delle PCR allele-specifiche, a sinistra l'amplificazione dell'allele R443X mutato, a destra dell'allele wild-type.

Il risultato ottenuto sostiene l'ipotesi di una probabile assenza di un mosaicismo somatico nella madre e rafforza l'ipotesi che la variazione di sequenza p.R443X possa rappresentare una mutazione insorta *de novo* durante la meiosi materna. La valutazione del DNA proveniente da diversi tessuti permetterebbe di escludere con certezza un mosaicismo somatico e di sostenere che si tratta di una mutazione *de novo* anche se un mosaicismo germinale non può mai essere escluso in madri non portatrici di casi sporadici di MPS II. [Froissart et al, 1997].

### **Discussione della mutazione p.R443X**

La mutazione riscontrata nei soggetti TC e LS presenta una frequenza relativamente elevata, essendo già stati descritti molti casi in letteratura che presentano un ampio spettro di fenotipi dall'attenuato all'intermedio al severo [Bunge et al, 1992; Flomen et al, 1992; Sukegawa et al, 1992; Froissart et al, 1993; Hopwood JJ et al, 1993; Rathmann et al, 1996; Gort et al, 1998b; Gort et al, 1998a; Vafiadaki et al, 1998; Hartog et al, 1999; Filocamo al, 2001; Moreira da Silva et al, 2001].

Uno studio di Sukegawa e colleghi su fibroblasti isolati da pazienti recanti la mutazione suddetta, ha messo in luce la perdita di attività della proteina mutata e la sua instabilità, compatibile con un fenotipo intermedio [Sukegawa et al, 1992].

I pazienti TC e LS, analizzati in questo studio, presentano entrambi una forma intermedia della patologia: l'mRNA recante la mutazione potrebbe sfuggire al meccanismo di *nonsense-mediated decay* e, essendo il codone mutato un codone di stop a bassa fedeltà (*low fidelity stop codon*) potrebbe venire bypassato in fase di traduzione (*stop-codon read-through*) con la produzione di una proteina normale [Brooks et al, 2006; Froissart et al, 2007].

## **Paziente CL**

Nasce prematuro e a 2 anni e 8 mesi viene sottoposto ad indagini più approfondite per sospetta MPS. Presenta, infatti, un quadro clinico peculiare: modesta epatosplenomegalia, ernia inguinale, note dismorfiche, cifosi lombare, ritardo nel linguaggio. L'ECG rivela una lieve insufficienza mitralica. Il livello di GAG urinari risulta molto elevato (303.3 mg/g creatinina) e il saggio di attività enzimatica effettuato sui leucociti mostra un'attività enzimatica pressochè nulla (0.3 nmol/mg/h).

Nel maggio 2006 viene sottoposto ad adenotonsillectomia allo scopo di migliorare la capacità respiratoria. Ad agosto dello stesso anno una RMN cerebro-cervicale evidenzia un sistema ventricolare normale, una caratteristica sella ad ogiva e accumulo di mucopolisaccaridi nella giunzione atlo-occipitale.

Dall'ottobre 2006, a 3 anni, viene sottoposto con cadenza settimanale a terapia enzimatica sostitutiva. A quasi 2 anni dall'inizio del trattamento mostra buone condizioni generali e una riduzione sensibile dei GAG urinari (94.5 mg/g creatinina). Presenta, tuttavia, una compromissione cognitiva e comportamentale di media-severa entità.

### **Analisi molecolare**

Nel paziente CL l'analisi molecolare ha permesso di rilevare nell'esone IX in posizione c.1403 la transizione G>A che a livello proteico determina la mutazione p.R468Q. Si tratta di una delle mutazioni missenso più frequentemente osservate; inoltre, il codone viene considerato *hot spot*; nello stesso si collocano, infatti, anche le mutazioni R468L e R468W [Li et al, 1999].

Tale variazione di sequenza è stata citata in molti lavori [Whitley et al, 1993, Sukegawa et al, 1995, Goldenfum et al, 1996, Rathmann et al, 1996, Villani et al, 1997, Li et al, 1999, Moreira da Silva et al, 2001] e in genere è associata a fenotipo severo, tranne che in un paziente descritto da Goldenfum, che presentava una forma attenuata.

Villani e colleghi hanno effettuato uno studio di espressione su 5 mutazioni tra cui la p.R468Q. Cellule COS 7 transfettate con il vettore contenente il gene hIDS mutagenizzato presentavano un'attività enzimatica residua molto bassa. L'enzima presenta un'apparente normale maturazione come evidenziano gli esperimenti di *immunoblotting* dalla presenza di tutte le bande corrispondenti ai vari intermedi di maturazione del polipeptide. Tuttavia, la proteina va incontro ad una scorretta localizzazione: dal frazionamento subcellulare si evince che solo una parte dei polipeptidi mutati raggiunge i lisosomi [Villani et al, 2000].

Nell'analogo studio di Sukegawa, l'attività enzimatica è molto bassa, al di sotto del limite di risoluzione del saggio. La proteina sembra non raggiungere una maturazione completa: solo i precursori primari vengono rilevati mediante *western blotting* degli estratti cellulari, indicando una rapida degradazione del polipeptide o un insufficiente processamento a causa delle alterazioni strutturali della proteina [Sukegawa et al, 2006].

Sebbene i due studi rilevino attività enzimatica diversa per la medesima mutazione, entrambi gli autori descrivono i pazienti affetti da una forma severa di MPSII, così come severo è il fenotipo osservato nel paziente qui descritto. Da ciò appare evidente che il rinvenimento di attività enzimatica residua mediante saggio biochimico potrebbe non corrispondere ad una reale attività enzimatica *in vivo* nel paziente. Una corretta attività enzimatica presuppone infatti sia la presenza di una proteina attiva che una sua adeguata localizzazione nei lisosomi.

## Paziente NG

Il paziente NG è affetto da una forma severa di MPS II; a 4 anni il bambino viene sottoposto ad intervento per ernia inguinale che tuttavia ricompare a 12 anni. Dal 2004 è sottoposto a terapia con oxcarbazepina per la comparsa di crisi epilettiche. Il paziente inizia la terapia enzimatica sostitutiva nel gennaio 2007, all'età di 13 anni. Tale trattamento ha permesso una riduzione dell'organomegalia e un miglioramento della motilità articolare e della funzionalità respiratoria. Permane, tuttavia, un grave ritardo psicomotorio. Attualmente il paziente assume anche genisteina su richiesta dei genitori.

### Analisi molecolare

Nel soggetto NG è stata riscontrata tramite sequenziamento diretto la transversione G>T in posizione c.419 ovvero a livello del primo nucleotide dell'esone IV. La variazione di sequenza sopra citata determina la sostituzione dell'aminoacido glicina con l'aminoacido valina a livello del residuo 140 dell'enzima (p.G140V)

L'aminoacido G140 è un residuo conservato durante l'evoluzione anche se non risulta conservato tra le 17 solfatasi umane note [Sardiello et al, 2005].

La sostituzione nucleotidica, inoltre, altera un sito accettore di *splicing*. L'analisi del cDNA ottenuto da cellule mutagenizzate, effettuata da Lualdi e colleghi, ha messo in luce la presenza, oltre al trascritto completo recante la mutazione, di altri due trascritti. Il primo ha una lunghezza inferiore al *wild-type* e deriva dall'attivazione di un sito donatore di *splicing* criptico all'interno dell'esone IV, che determina lo *skipping* dell'esone III e parte dell'esone IV. Il secondo incorpora 103 nucleotidi dell'introne 3 a causa dell'attivazione di due siti di *splicing* criptici 3' e 5' all'interno dell'introne 3.

Tuttavia, l'espressione dell'mRNA non subisce un decremento rispetto alle cellule *wild-type*, suggerendo una possibile evasione del meccanismo di *nonsense-mediated decay* che consente alla cellula di eliminare gli mRNA contenenti precoci siti di terminazione della traduzione. Inoltre, è stata valutata l'attività enzimatica *in vitro* che risulta nulla [Lualdi et al, 2006].

La forma severa della patologia nel paziente NG concorda, quindi, con quanto riportato in letteratura. Tuttavia, rimane difficile valutare quale dei due fattori, sostituzione aminoacidica o alterazione del sito di *splicing*, sia predominante nel determinare il fenotipo osservato.

## **Paziente AR**

Nato a termine, ha uno sviluppo pressochè normale nei primi 2 anni di vita, sebbene presenti già i primi segni correlabili alla patologia: frequenti otiti, ernie inguinale e ombelicale (per le quali subisce gli interventi di riduzione) e un ritardo nel linguaggio. Circa un anno fa, all'età di 4 anni giunge all'attenzione del dipartimento di Pediatria di Padova dove vengono valutati i GAG urinari (359 mg GAG/g creatinina; v.n. 13-68) e diagnosticata MPS II. Poco dopo entra in trattamento con Elaprase. Gli accertamenti effettuati in quella data mettono in evidenza ipoacusia, tonsille ipertrofiche, un aumentato volume del sistema ventricolare, insufficienza mitralica lieve-moderata, ernia ombelicale.

### **Analisi molecolare**

Nel paziente AR l'analisi molecolare del gene *hIDS* ha permesso di evidenziare la sostituzione nucleotidica G>A a livello del nucleotide c.592 dell'esone V; questa variazione di sequenza determina la sostituzione dell'aminoacido acido aspartico con l'aminoacido asparagina a livello del residuo 198 (p.D198N). Inoltre, è stato rilevato il polimorfismo c.438C>T nell'esone IV (p.T146T). La ricerca delle stesse variazioni di sequenza nel campione di DNA materno ha permesso di rilevare la presenza in eterozigosi della mutazione c.592G>A e del polimorfismo c.438C>T in condizione di omozigosi.

La mutazione p.D198N è stata evidenziata anche nella zia materna del bambino, mentre non è stata rilevata in due cugine della madre.

Tale variazione di sequenza non è stata descritta precedentemente in letteratura.

Allo scopo di poter formulare qualche ipotesi sul possibile effetto sulla proteina codificata, è stato utilizzato il *software* disponibile in rete *Polyphen* che permette di valutare l'impatto di una

sostituzione nucleotidica sulla struttura e funzione di una proteina attraverso valutazione strutturali e comparative. Il risultato fornito dal programma definisce la mutazione inserita come “*probably damaging*” ovvero probabilmente dannosa per la funzione dell’enzima. Osservando l’allineamento con le sequenze aminoacidiche di iduronato solfatasi di altre specie si rileva che il residuo D198 è altamente conservato (figura 9) [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>], anche se non risulta conservato se confrontato con le 17 solfatasi umane [Sardiello et al, 2005]. Queste ipotesi sono in accordo con il quadro clinico severo presentato dal paziente.

0	QUERY:	... GPDGELHANLLCPVDVLDVPEGLTLP D KQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAV ...
1	<a href="#">ref NP_001041590.1</a> iduronate-2-sulfatase [Canis familiaris] >gi...	... GPDGELHANLLCPVDIADVPEGLTLP D KQSTEQAIRLLEKTKTSTRPFFLAV ...
2	<a href="#">tpsl CAI84989.1</a> TPA: iduronate-2-sulfatase [Rattus norvegicus]	... GQDGKLTNLLCPVDVADVPEGLTLP D KQSTEEAIRLLEKMKTSVSPFFLAV ...
3	<a href="#">db BAE21082.1</a> unnamed protein product [Mus musculus]	... GQDGKLTNLLCPVDVADVPEGLTLP D KQSTEEAIRLLEKMKTSASPFFLAV ...
4	<a href="#">ref XP_615420.3</a> PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	... GPDGELHANLLCPVDVVDVPEGLTLP D KQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAV ...
5	<a href="#">ref XP_579042.2</a> PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	... GQDGKLTNLLCPVDVADVPEGLTLP D KQSTEEAIRLLEKMKTSVSPFFLAV ...
6	<a href="#">gb AAA37880.1</a> iduronate sulfatase	... GQDGKLTNLLCPVDVADVPEGLTLP D KQSTEEAIRLLEKMKTSASPFFLAV ...
7	<a href="#">ref XP_001376201.1</a> PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase ...	... GQDEELHANLLCPVDVADMPEGLTLP D KQSTEEAIRLLEKMKRVDDLFFLAV ...
8	<a href="#">ref XP_420381.2</a> PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	... GKDGRLYANLVCPIDVTEMPGGTLP D IETTEEAIRLLNVMKTKKQKFFLAV ...
9	<a href="#">ref NP_001074043.1</a> hypothetical protein LOC559959 [Danio rerio]...	... DKDGLTNSNLLCPVNVSEMPGLTLP D IENTEEAIRLLRSMRGSQKPPFLAV ...
10	<a href="#">emb CAF94563.1</a> unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	... GDDGRLHANLLCAVNVTEQPGGTLTLP D MESTDEAISLLKSKQAEQNPFFLAV ...

Figura 9: allineamento delle sequenze aminoacidiche di 10 iduronato solfatasi di specie diverse; in azzurro è evidenziato il residuo D198 [ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>].

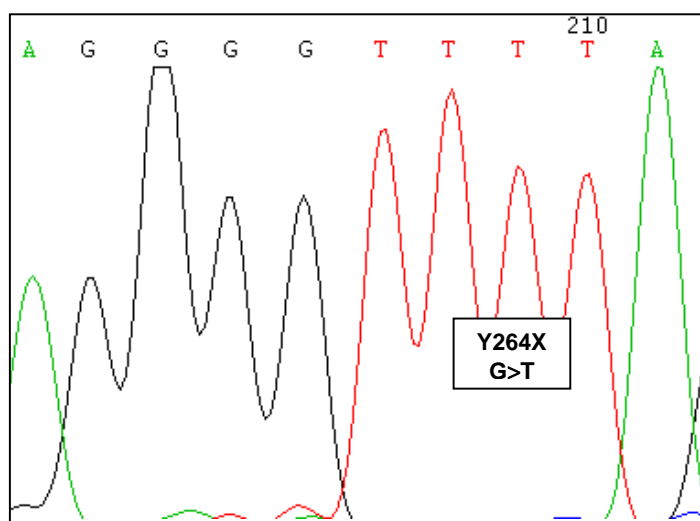
## Paziente CM

Il soggetto CM è stato diagnosticato nel 2004, all’età di 5 anni, presso il Centro Malattie Metaboliche di Monza. Presenta una forma di MPS II che non mostra coinvolgimento neurologico. Dal 2006 viene sottoposto a somministrazioni di Elaprased a cadenza settimanale: questo trattamento ha condotto ad un miglioramento della rigidità articolare e ad un aumento

della motilità spontanea. Il paziente attualmente assume anche genisteina per os, inoltre è in terapia con antipertensivi e diuretici allo scopo di trattare lo scompenso cardiaco.

### **Analisi molecolare**

Nel paziente CM è stata evidenziata in emizigosi la transversione C>A nell'esone VI a livello del nucleotide c.792 (figura 10). Tale variazione di sequenza determina la conversione di un codone codificante per l'aminoacido tirosina con un codone di stop (p.Y264X).



*Figura 10: soggetto CM: particolare dell'elettroferogramma dell'esone VI a livello della transversione G>T in posizione c.916*

La sostituzione nucleotidica rilevata nel paziente è stata evidenziata in eterozigosi nell'esone VI della madre (figura 11).

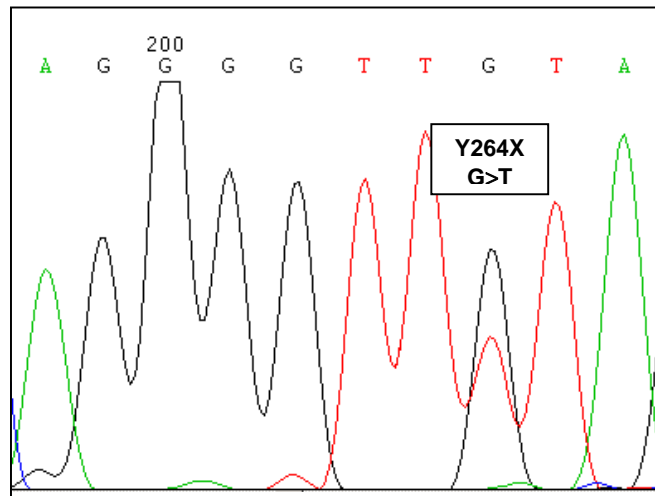


Figura 11: madre del soggetto CM: particolare dell'elettroferogramma dell'esone VI a livello della transversione G>T in posizione c.916, presente in eterozigosi

La mutazione individuata nel paziente analizzato è una mutazione nonsense ovvero un'alterazione di sequenza che introduce un precoce codone di terminazione della traduzione e attiva un meccanismo chiamato *nonsense-mediated decay* (NMD) che elimina l'mRNA anomalo impedendo la sintesi di una proteina anormale (in questo caso priva di 286 aa).

Per tale ragione le mutazioni nonsense sono correlate ad un fenotipo severo, anche se in letteratura in un crescente numero di pazienti con mutazioni di stop sono state rilevati fenotipi attenuati. Questi casi vengono spiegati attraverso fenomeni di evasione del meccanismo NMD o con la presenza di un codone di stop a bassa fedeltà (*low fidelity stop codon*) che viene by-passato in fase di traduzione (*stop-codon read-through*) e permettono la produzione di una proteina normale. Il soggetto CM qui descritto, sebbene sembri presentare un fenotipo attenuato, non rientra in questi ultimi casi: infatti, data la posizione della sostituzione nucleotidica, la mutazione p.Y264X attiverebbe il processo NMD e il codone di stop inserito è un codone ad alta fedeltà (TAA) [Brooks et al, 2006; Froissart et al, 2007]. Studi di espressione saranno quindi necessari per chiarire se effettivamente l'enzima venga prodotto e sia funzionale.



## Paziente MC

Il soggetto MC ha 7 anni e presenta una forma grave di sindrome di Hunter. Da agosto 2006 è in trattamento con Elaprase e da giugno dello stesso anno con genisteina. L'ERT ha determinato un notevole miglioramento dell'organomegalia e dello stato di benessere generale con una maggiore partecipazione del bambino nelle attività quotidiane. Permane tuttavia l'ipoacusia neurosensoriale evidenziata prima del trattamento, che sarà trattata mediante posizionamento di protesi acustica. Nel 2007 subisce un intervento per l'inserimento di un catetere ventricolare per ridurre l'idrocefalo.

### Analisi molecolare

Nel soggetto MC è stata rilevata la delezione del nucleotide T in posizione c.189 a livello dell'esone II.

La rimozione di una base determina la sostituzione dell'aminoacido asparagina in posizione 63 con il residuo lisina, lo sfasamento della fase di lettura e l'inserimento a partire dal codone 63 di una sequenza polipeptidica di 66 aminoacidi estranei all'enzima hIDS. La terminazione della traduzione avviene precocemente a livello del codone 129 (TGA) con produzione di una proteina di 128 aminoacidi (p.N63fsX129) (figura 12)

1	MPPPR	TGRGL	LWLGL	VLSV	CVALG	SETQA	NSTTD	ALNVL	LIIVD	DLRPS	LGCYG	DKLVR
61	SPKLT	NWHPT	ASSRM	PLRS	KQCAP	RAAFL	SSLAG	DLTPP	ACTT	STPTGG	CTLET	SPPSPST
121	SRRMAM											

Figura 12: In rosso è messa in evidenza la sequenza polipeptidica di 66 aminoacidi estranei alla proteina IDS prodotti nel soggetto MC.

Tale variazione di sequenza non è stata descritta in letteratura prima d'ora.

La ricerca della mutazione p.N63fsX129 nel campione di DNA della madre ha dato esito positivo.

La mutazione descritta altera ampiamente la proteina comportando la perdita di 422 aminoacidi, qualora l'mRNA evada i meccanismi di controllo e quindi l'enzima venga prodotto. Queste

alterazioni risulterebbero compatibili con un quadro clinico severo. Il paziente MC presenta una forma di MPS II severa e questo concorda con le osservazioni riportate sopra.

## Paziente DS

Il soggetto DS ha 14 anni e presenta una forma grave di sindrome di Hunter. Da agosto 2006 è in trattamento con Elapraxe e da giugno 2007 con genisteina. L'ERT ha determinato una riduzione dei GAG urinari, miglioramento dell'epatosplenomegalia e una stabilizzazione della sintomatologia. Rimangono tuttavia irrisolti i problemi cardiaci e i disturbi comportamentali.

### Analisi molecolare

L'analisi molecolare nel paziente DS ha evidenziato la presenza di una delezione di tre nucleotidi a livello dell'esone IV (c. 473\_475delATC). La perdita di tre nucleotidi determina la delezione dell'aminoacido istidina a livello del codone 159 (p.H159del). Tale alterazione di sequenza, sebbene non avvenga in fase, ovvero in corrispondenza di un codone, non determina alcuna sostituzione aminoacidica, in quanto la delezione avviene a livello di una sequenza ripetuta di 3 nucleotidi (ATCATC) (figura 13). Inoltre, è stato evidenziato il polimorfismo c. 438C>T nell'esone IV (p.T146T).

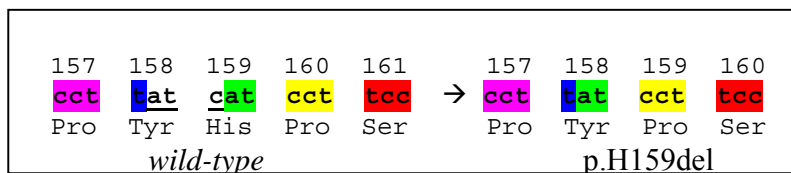


Figura 13: viene evidenziata la delezione ATC e l'effetto sulla traduzione nel soggetto DS

La madre del soggetto DS è risultata portatrice sia della variazione di sequenza p.H159del che del polimorfismo p.T146T.

La delezione individuata nel paziente non è mai stata descritta in questo modo precedentemente; un'analogia variazione, che comporta il medesimo effetto sulla proteina ovvero la perdita del residuo 159 di istidina, è stata descritta da Hopwood e colleghi come delezione della tripletta CAT secondo un'annotazione non più in uso [Hopwood et al,1993].

Il paziente mostra una forma severa di MPS II come il soggetto descritto da Hopwood; la delezione di questo residuo potrebbe alterare considerevolmente la conformazione proteica compromettendo la funzionalità enzimatica.

## **Paziente LSJ**

Il soggetto LSJ è un paziente brasiliano che presenta una forma attenuata di MPS II. Evidenzia i peculiari segni clinici della patologia: perdite dell'udito, ipertrofia gengivale, dentizione anormale, insufficienza mitralica, epatosplenomegalia, mani ad artiglio, rigidità articolare e iperattività. Ha raggiunto l'età di 15 anni ed è stato inserito nella fase III del trial clinico per terapia enzimatica sostitutiva.

### **Analisi molecolare**

Nel soggetto LSJ sono state individuate due variazioni di sequenza *in cis* nell'esone IV: c.465T>A e c.467C>A. Le alterazioni nucleotidiche riscontrate interessano due codoni adiacenti e comportano entrambe una sostituzione aminoacidica. Nella prima l'aminoacido fenilalanina viene sostituito dal residuo leucina (p.F155L), la seconda invece determina la sostituzione prolina-glutamina (p.P156Q).

Inoltre, è stato rilevato il polimorfismo c. 438C>T nell'esone IV.

L'analisi molecolare della madre ha evidenziato la presenza di tutte e tre le variazioni di sequenza.

Le variazioni p.F155L e p.P156Q sono nuove ovvero non sono mai state descritte prima d'ora in letteratura.

Allo scopo di formulare delle ipotesi sull'effetto delle nuove mutazioni individuate sulla struttura e funzione proteica, si è utilizzato anche in questo caso il programma *Polyphen*. La sostituzione p.F155L viene considerata benigna: avviene, infatti, a livello di un residuo non conservato tra IDS di diverse specie e comporta la sostituzione di un aminoacido recante una catena laterale aromatica (Phe) con un aminoacido alifatico di grosse dimensioni (Leu). La sostituzione osservata non comporterebbe quindi una grossa alterazione strutturale della proteina presentando,

entrambi i residui, una catena laterale idrofobica e avendo un ingombro sterico compatibile. Si tratta quindi molto probabilmente di un polimorfismo: rimane, tuttavia, da effettuare l'analisi di 100 alleli di controllo per poter confermare tale ipotesi.

La sostituzione p.P156Q risulta, invece, con un alto livello di confidenza, una mutazione che altera la struttura e la funzione proteica: il risultato fornito dal software è infatti “*possibly damaging*”. La sostituzione dell'aminoacido prolina con la glutamina, infatti, potrebbe comportare un'alterazione della struttura secondaria della proteina, data la rigidità strutturale della prolina, spesso collocata nei *turns* della catena polipeptidica.

Inoltre, l'allineamento della proteina con iduronato solfatasi di altra specie rivela che il residuo p.F155 non è conservato, mentre si può affermare che risulta tale l'aminoacido p.P156 (figura 14, 15). Tuttavia, il confronto della sequenza con le altre 12 solfatasi umane mette in evidenza come il residuo 155 sia conservato, mentre non lo sia il 156 (figura 16) [Sardiello et al 2005].

Studi di espressione *in vitro* delle variazioni di sequenza espresse singolarmente e combinate, sono quindi necessari per valutare il loro effetto patogenico. In letteratura sono riportati 3 casi simili: in due di questi le mutazioni interessano due codoni adiacenti, come nel caso qui descritto [Ricci et al, 2003; Froissart et al, 2007].

0	QUERY:	...TMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWS F PPYHPSSEKYEENTKTCRGPDGELHA...
1	ref NP_001041590.1  iduronate-2-sulfatase [Canis familiaris] >gi...	...TMSVGKVFHPGISSNYSDDSPYSWS I PPYHPSSEKYEENTKTCRGPDGELHA...
2	tpel CA84989.1  TPA: iduronate-2-sulfatase [Rattus norvegicus]	...TMSVGKVFHPGISSNHSDDYPSYSWS F PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHT...
3	dbj BAE21082.1  unnamed protein product [Mus musculus]	...TMSVGKVFHPGISSNHSDDYPSYSWS F PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHA...
4	ref XP_615420.3  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	...TMSVGKVFHPGISSNHSDSPYSWS V PPYHPSSEKYEENTKTCRGPDGELHA...
5	ref XP_579042.2  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	...TMSVGKVFHPGISSNHSDDYPSYSWS F PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHT...
6	gb AAA37880.1  iduronate sulfatase	...TMSVGKVFHPGISSNHSDDYPSYSWS F PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHA...
7	ref XP_001376201.1  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase ...	...TMSVGKVFHPGISSNHSDDFPSYSWS V PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHA...
8	ref NP_420361.2  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	...TMSVGKVFHPGISSNYSDDYPSYSWS I PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHA...
9	ref NP_001074043.1  hypothetical protein LOC559959 [Danio rerio]...	...TMSVGKVFHPGIA SNHSDDYPSYSWS V PPYHPSSEKYEENTKTCRQDQGLHA...
10	emb CAF94563.1  unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...TMSVGKVFHPGIA SNHSDDYPSYSWS I PLYHPASFREFKMKCKGDDGRLHA...

Figura 14: allineamento delle sequenze aminoacidiche di 10 iduronato solfatasi di specie diverse; in azzurro è evidenziato il residuo F155 [ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>].

0	QUERY:	...MSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRGPDDELHAN...
1	ref NP_001041590.1  iduronate-2-sulfatase [Canis familiaris] >gi...	...MSVGKVFHPGISSNYSDDSPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRGPDDELHAN...
2	tpel CAI84989.1  TPA: iduronate-2-sulfatase [Rattus norvegicus]	...MSVGKVFHPGISSNHSDDYPPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRQDQGLHTN...
3	dbj BAE21082.1  unnamed protein product [Mus musculus]	...MSVGKVFHPGISSNHSDDYPPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRQDQGLHTN...
4	ref XP_615420.3  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	...MSVGKVFHPGISSNHSDDYPPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRGPDDELHAN...
5	ref XP_579042.2  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	...MSVGKVFHPGISSNHSDDYPPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRQDQGLHTN...
6	gi AA37880.1  iduronate sulfatase	...MSVGKVFHPGISSNHSDDYPPYSWSP...PYHPSSEKYENTKTCRQDQGLHTN...
7	ref XP_001376201.1  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase ...	...LSVGKVFHPGISSNHSDDFPPYSWSP...PFHPSSEQYENSKTCRQDDELHAN...
8	ref XP_420361.2  PREDICTED: similar to Iduronate 2-sulfatase pre...	...MSVGKVFHPGISSNYSDDYPPYSWSP...PFHPSSEKYENTKTCRQDQGLHTN...
9	ref NP_001074043.1  hypothetical protein LOC559959 [Danio rerio]...	...LSVGKVFHPGIASNHSDDYPPYSWSP...PYHPPSEYERKRVCKDKDGLHNS...
10	emb CAF94563.1  unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...MSVGKVFHPGIASNHHTDDYPPYSWSP...AYHPASFREKMKCKDQDGLHTN...

Figura 15: allineamento delle sequenze aminoacidiche di 10 iduronato solfatasi di specie diverse; in azzurro è evidenziato il residuo P156 [ <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>].

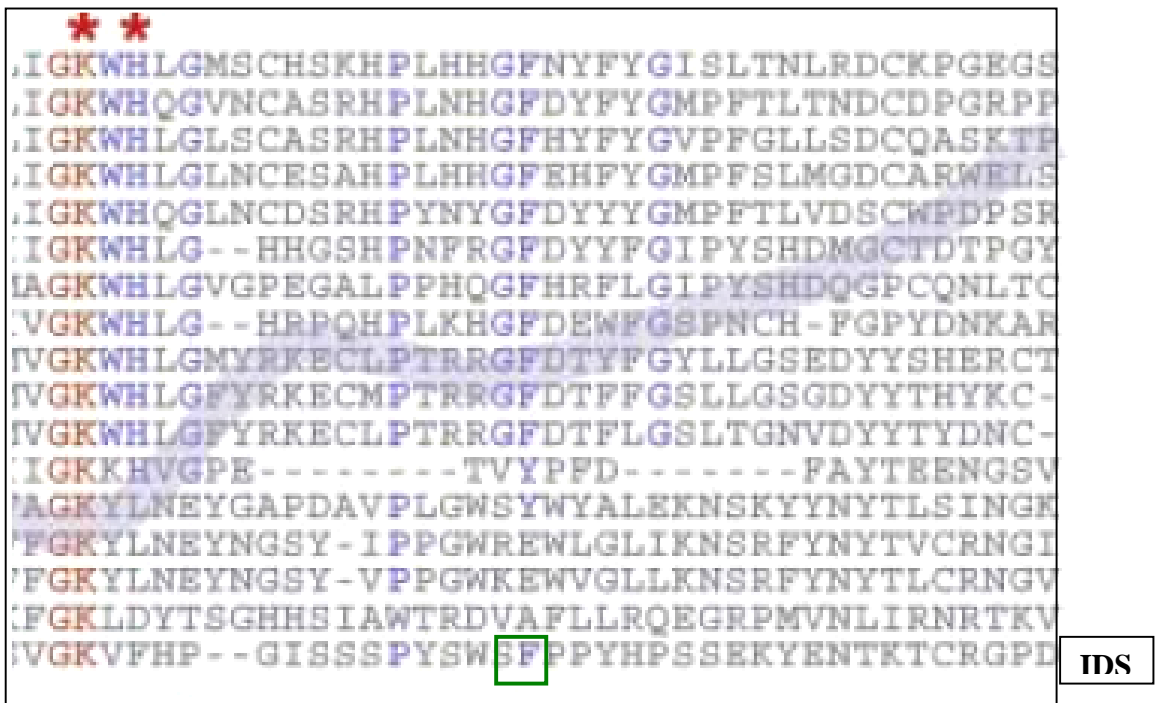


Figura 16: allineamento di una porzione delle sequenze aminoacidiche delle 13 solfatasi umane; in rosso sono evidenziati i residui F155 e P156. Gli asterischi rossi indicano i residui aminoacidici che hanno una funzione nota nella reazione di idrolisi [ Sardiello et al, 2005].

## Paziente CJS

Il paziente CJS è un soggetto brasiliano che presenta una forma intermedia di MPS II: evidenza, infatti, segni clinici come *facies sui generis*, bassa statura, rigidità articolari, mani ad artiglio, scoliosi, oltre a ridotta capacità visiva, frequenti affezioni dell'apparato respiratorio e uditivo. Non presenta coinvolgimento neurologico. E' stato diagnosticato all'età di 20 anni, in seguito alla valutazione dell'attività enzimatica nel plasma i cui valori sono risultati molto inferiori all'intervallo di controllo (10 nmol/4h/ml; v. n. 110-370 nmol/4h/ml). Nella sua storia clinica sono presenti vari interventi chirurgici: adenoidectomia, riduzione di ernia ombelicale, decompressione del tunnel carpale e inserimento di protesi acustiche. Dal 2004, all'età di 24 anni è sottoposto, a cadenza settimanale, a trattamento con idursolfatasi.

### Analisi molecolare

L'analisi molecolare tramite amplificazione e sequenziamento diretto degli esoni e delle regioni limitrofe del gene hIDS ha permesso di rilevare solamente il polimorfismo c. 438C>T nell'esone IV. La mancata rilevazione di mutazioni esoniche ha fatto supporre la presenza di qualche variazione di sequenza a livello degli introni, nella regione promotoriale o nelle regioni regolatrici dello *splicing*, non rilevabili tramite sequenziamento diretto.

A tal scopo si sono messe a punto due amplificazioni PCR per amplificare una zona di circa 700 bp dove si colloca il promotore del gene hIDS predetto mediante il programma disponibile *online Neural Network Promoter prediction* [[http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)]. Il sequenziamento diretto dei due ampliconi, ha messo in luce la presenza di una delezione di 178 bp dalla posizione 271996 alla posizione 272174 della sequenza genomica di riferimento AF011889. La delezione è localizzata a monte del sito d'inizio trascrizione ed è fiancheggiata da due sequenze di 13 bp ripetute dirette di cui solo una viene eliminata nella delezione, mentre l'altra rimane intatta (figura 17). Lo stesso tipo di delezione è stato descritto da Timms e colleghi [1998].

Per questo paziente non si è valutato lo stato di portatrice della madre perchè il campione di DNA materno non era disponibile.

```

272700
cgcaccccttc ttgcagacct caatgcggct tgctccctca cttgcttcaa aatthttgttc aaatgccact tcactagtga
ggccctgcct ggccacccca tagaaaataa caagcatgcc cgcacccac gctttatthtt tctccagacc gggatgccc
accgacactc tctatathttt thttattgtht taagctccac caaagcaggg acatagagcc ccagtgccac caacagcgcc
tggtatacat atthtgcgata chtaataaga atthagttaa gaaatgaata ggaaagggag tccctthtaga tggaggaagg
gactthctca aaaggcctca tggaaggaga atggcattga ggctggctta caagaagtht gtctthtata aaaagaagga
agggcagggc ttccagthga aaggcatagc acaagcaaag gcaaaaagac gggtaactgc tagthgttaa gggcagthggc
tgaatcgcta taccctagc agthtctacac ctaggggcct gcgggccgct gggthctgca agctthgcaag gcaactggcc
cgcccccgct ctgcgcctgt ctctcggcca cgcctatthg cgcagthgta cgcgcacctc tagaacccgc cccggagggg
aggggacgca ggaagagthc gcacggacgc actcgcgctg cggccagcgc ccgggcctgc gggcccgggc ggcggtctgtg
ttgcgcagthc ttcathggtht cccgacgaggg agthctctgt ggctgcggcg gcgthctgcta actgcgccac ctgctgcagc
ctgtccccgc cgtctgaa gggccgcgth gaagccgaaa tgccgccacc cggaccgthc cgagthcttc tctgthctggg
tctgthctctg agthctcgtct gcgthcgcct cggatccgaa acgagthcca actgcaccac agthgcccgc cacgcccctc
ctgcatctc thctccctc ctccctcct thctctctc thctctctt cctctctct thgtthatat cctthcttht
taccctctct ctctctacc atthctctct tcathcatca thctgthcct cctctcatt thctctctct
cctacgthcc ctthctcct cctthctctc
271561

```

Figura 17: viene riportata la regione genomica a monte dell'esone I (in grassetto) coinvolta nella delezione, evidenziata in grigio. In fucsia e blu le coppie di primer utilizzate per l'amplificazione della regione promotoriale. Le sequenze di 13 bp ripetute dirette sono evidenziate in grassetto sottolineato. In violetto e arancio i siti promotoriali predetti rispettivamente da Neural Network Promoter prediction e da Timms e colleghi [Timms et al 1998].

Per valutare l'effetto della delezione individuata sulla trascrizione del gene hIDS, si è analizzato il cDNA ottenuto dai fibroblasti cutanei del paziente. Tale analisi ha messo in evidenza, tramite amplificazioni PCR, la presenza di un trascritto con un'estremità 5' priva di circa 400-480 nucleotidi. Tali risultati differiscono da quelli ottenuti da Timms e colleghi che non rilevano alcun trascritto del gene hIDS.

Rimane da definire la sequenza dell'estremità 5', in modo da essere in grado di formulare qualche ipotesi sull'effetto della delezione descritta. Una possibile ipotesi è l'utilizzo da parte dell'RNA polimerasi, in assenza del sito promotoriale al quale normalmente si lega, di un sito promotoriale criptico vicariante, situato più a valle; ciò potrebbe comportare l'inizio trascrizione da uno *start codon* diverso con la produzione di un trascritto più corto ed eventualmente anomalo, qualora venga alterata la fase di lettura normalmente utilizzata.

Il rinvenimento di un trascritto potrebbe spiegare anche il fenotipo attenuato osservato nel soggetto CJS.

Le sequenze ripetute fiancheggianti la delezione suggeriscono un probabile evento di ricombinazione non omologa mediata da topoisomerasi tipo II [Timms et al, 1998].

## **Paziente IS**

Il soggetto IS è un bambino di origine cilena, affetto da una forma severa di MPS II, di cui non si dispone di informazioni cliniche a parte il decesso avvenuto circa un anno fa.

### **Analisi molecolare**

L'amplificazione dei 9 esoni del gene hIDS nel paziente IS non ha dato alcun prodotto per gli esoni V e VI. Il sequenziamento diretto dell'esone VII ha permesso di individuare una sostituzione nucleotidica a livello dell'introne 6 in posizione 257185 (seq. rif. AF011889), 19 bp a monte dell'inizio dell'esone VII.

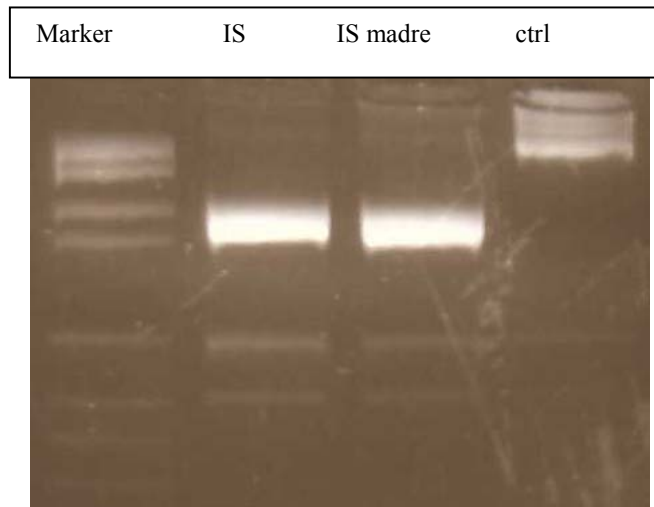
La mancata amplificazione degli esoni V e VI ha suggerito la presenza di una delezione intragenica coinvolgente questi esoni. I tentativi effettuati per amplificare il frammento di giunzione con *primers* situati appena esternamente agli esoni indicati, non hanno dato risultati positivi: l'amplicone ottenuto era quasi sicuramente un prodotto aspecifico la cui sequenza non appaiava con la sequenza genomica usata per gli allineamenti in BLAST.

L'utilizzo di una coppia di *primers* appaianti rispettivamente sull'introne 6 e sull'esone IV ha permesso di ottenere un prodotto di amplificazione di circa 1200 bp nel soggetto in esame e un frammento di 6000 bp nel campione di controllo. Il sequenziamento diretto del frammento ottenuto ha permesso di definire la sequenza di giunzione (figura 19).

Il soggetto IS presenta quindi una delezione di 4892 bp che comporta la perdita delle intere sequenze di esone VI, introne 5 e esone V, del 25% dell'introne 6 e del 75% dell'introne 4.

La madre del paziente IS è portatrice della medesima delezione evidenziata nel figlio (figura 18).





*Figura 18: corsa elettroforetica degli amplificati del frammento di giunzione della delezione del soggetto IS, della madre e di un ctrl.*

```

261241 tcaaggggtgc agtgagatgg gcttggatgc ggacatccaa agctacaaga ggacagtgag
261301 caggccagag ttcaagggga acacagggct gagaccagca catgcaggca tcagggaggc
261361 cctctgagtc atgctgtcca ctgtgtgtaa ggaggggact aagagaactt gaaggagata
261421 gctccgtgca gccgacacgg tcctagatac ttctacatgc tctctttggt tcttgctgaa
261481 aatctctaaa gtagggtgta tcatggaaaa actttaccta ccttgtttca gttttataga
261541 gaagaaaact cagggaggct cagggaggta acatgacttg acagaggtta ggcagctggt
261601 atgaggtaga acatgaattc gaaccacac tgctgggaac caacagatcc aacctgggg
261661 ctttggagtt acagtccctg gggatgaatt ggctccacc agcactaatt ttgtgctgtc
261721 agacaagtca gcacacctcc catgccttga gtttcctcac ctagacaaca gagagcaggt
261781 acctcactaa gtccccatga ggactaaagg cgataaccaca catgaatcag cgcccttctc
261841 ggcacacagt ccattttgaa gggtcatttt aagtgacct cactaataaa gcatccaggt
261901 gcagcctcag agccagttca agccacttca ccatcaggag ccagaaaaca caaaattaga
261961 aaacaacag atggatgcat tgctttccaa actctcagtg aaacaggaat caaatacatt
262021 tgaggaatgt acacctctca ccaaccaaac tcttgtgtg caaactcagg ggccaagtaa
262081 gtttggatag caagggatat ctgt

```

IVS6

DELEZIONE 967 bp IVS6

DELEZIONE TOTALE ex VI

DELEZIONE TOTALE IVS5

DELEZIONE 1961 bp IVS4

```

267001 tgtattctga aatggaaagc tgtcaagaac ttagaacaat accttcacc gttttcac tcacttccaa
267061 atcctcacc ttcccaacac gatgtttact aaaacctcag agatacattt catgtctcag
267121 ttcccagct ggttttctga gtttcttaaa tgtgggtttt agtttcattt atacatttgg
267181 gattcctcta aaccaagatt ttctttgtag gttacttttt ttcataatgc tctaaaaatt
267241 caaaaccctc atcagaggtc tcagctgctg aacatacaca ttaggtcaga gacagataca
267301 cggcatgect ttctoccat ctgggctgag gctcctggag ctcagcctct tttctccctc
267361 ccatgtctca gcatctccta caactctcag tctcatccag cgtgagcact ggggagctat
267421 tcaatgagtc tgacacgtta gagcccaagg ttttagaaca agtagcacc accagcttct
267481 agaatgaagc cactgctcct gtgggctccta atgctgaaga tccaacact tacttctgtc
267541 aaaacattat cacaaatgaa acccacaact tcgtggtata taaccagctt cacagaacat
267601 gcagtatacc cagtagttta tgtgacaaag gaaaaagtgg ttcctcttca gaaatgtccc
267661 tttcacagcc ttaccttagt gttttcatac ttctcagagg aaggatgata aggtggaaaa
267721 gaccagctat acggagaatc atcgggatgg ttagaagata tcccttgaa aaaaaaaaaa
267781 gttgttaaaa catgatgagt ctttcaacac cccactcccc ataattaaaa ctctgtaaac
267841 aaatgggcaa gtggaacctc ccttctttgg ggctcagttt cctcatctac aaaagtcccc
267901 tctaaagcca aactctctag tttctatttg agaactaagc atctgacttc ctggtcccta
267961 agccctgatg atttgtgcta ggctctgtgg aagggacca caaggacaag atcagtcagc
268021 tccttagagc ccattgctgaa acctatctct caccctatga aggaggcagc agaggcatca
268081 gcaccatcag ggagccgatg ggggcaggag agggaggctc agggaaggta tgtgacttac
268141 ctatgctaac cagatattag ataagggagc caggactcaa aacctgttt tagaattcca
268201 agttcaagtg ctcatctatg aagcagaaac ccaccctaa gcttagtagt ttatagttta
268261 tttgtgaaga cagtataaca gcaactgaaa ccaaggaagg acttccagct ttcaaaagca

```

IVS4

ex IV

Figura 19: sequenza del frammento di giunzione della delezione individuata nel paziente IS. La tripletta GT evidenziata in fucsia può appartenere sia all'introne 6 che all'introne 4.

Numerosi casi di delezioni parziali del gene hIDS sono state descritte in letteratura: sono state riportate delezioni di 1, 2, 3, 6 esoni [Hopwood et al, 1993; Lissens et al, 1997; Vafiadaki et al 1998]. Karsten e colleghi hanno caratterizzato una delezione dell'esone V e VII di 5581 bp associata a duplicazioni e inversioni dovuta probabilmente ad un fenomeno di ricombinazione non-omologa. Il caso qui descritto invece è una netta delezione senza nessuna rilevabile inserzione o presenza di frammenti residui.

Tutti i casi descritti di parziale delezione genica sono osservati in pazienti con forme severe della patologia.

## **Paziente MV**

Il paziente MV è un bambino di origine brasiliana; il soggetto presenta i primi sintomi all'età di 2 anni; la diagnosi di MPS II viene confermata a 4 anni in seguito a misurazione dell'attività enzimatica plasmatica (non rilevabile; v.n. 110-370 nmol/4h/ml). Dall'età di 6 anni comincia a presentare una progressiva perdita della funzionalità motoria, diventando ad oggi, all'età di 11 anni, non autosufficiente.

Manifesta i classici sintomi associati alla patologia, *facies* tipica, epatosplenomegalia, rigidità articolare, insufficienza mitralica oltre a coinvolgimento neurologico. Nel corso degli anni ha subito interventi di tonsillectomia, adenoidectomia, riduzione di ernie inguinali e ombelicali. Inoltre, ha subito l'inserimento di un catetere ventricolare per ridurre l'idrocefalo. Attualmente assume carbamazepina e non è in trattamento con Elaprase.

### **Analisi molecolare**

L'amplificazione dei 9 esoni del gene hIDS del paziente MV ha permesso di ottenere un prodotto di amplificazione solo per l'esone IX, e nessun amplificato per gli esoni I-VIII. Il sequenziamento diretto dell'esone IX non ha evidenziato alcuna alterazione di sequenza.

Tali risultati hanno suggerito la presenza di un'ampia delezione genica coinvolgente buona parte del gene hIDS.

L'analisi del cDNA ha evidenziato la presenza dell'estremità 3' del trascritto dell'isoforma A, corrispondente all'esone IX, risultato concorde con l'analisi genomica.

Allo scopo di stimare l'ampiezza della delezione sono state messe a punto una serie di amplificazioni PCR, che permettono di verificare la presenza o meno dei geni IDS-2, W, X, Y situati distalmente al gene hIDS (figura 20). Infatti, essendo presente solo un cromosoma X, trattandosi di soggetti di sesso maschile, le amplificazioni PCR permettono di amplificare un solo allele e rendono la caratterizzazione delle delezioni relativamente più agevole.

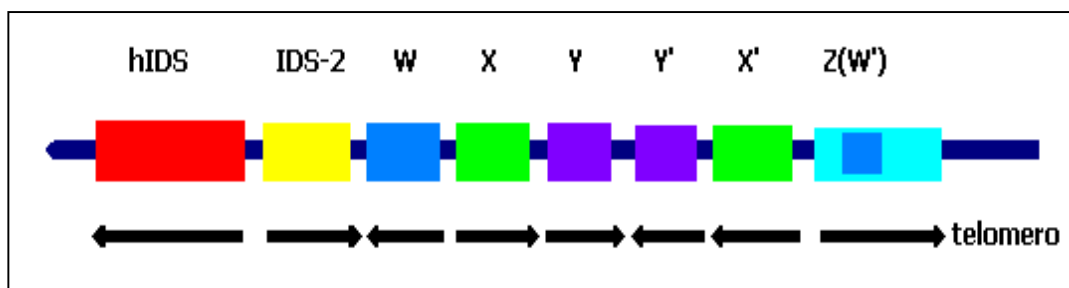


Figura 20: sono rappresentati i geni situati distalmente al gene hIDS

Le prime amplificazioni effettuate hanno rilevato la presenza dei frammenti corrispondenti all'esone II del gene W, all'esone I e V del gene X e al gene Y. La delezione non risulta quindi, ad una prima analisi, estremamente ampia. L'amplificazione di frammenti più interni del gene W (ex III-IV e esone V) ha dato esito positivo.

Per verificare se la delezione coinvolgesse lo pseudogene, si sono amplificati due frammenti di circa 1300 bp, comprendenti quasi l'intero IDS-2, che non hanno dato alcun prodotto. L'estremità distale della delezione quindi è collocata tra IDS-2 e il gene W.

Ulteriori amplificazioni di 4 frammenti dell'introne 8, hanno permesso di collocare il confine prossimale della delezione a livello della parte centrale dell'introne 8.

Delineati approssimativamente i confini distale e prossimale, allo scopo di isolare e sequenziare il segmento di giunzione, si è effettuata un'amplificazione PCR con un *primer forward* che si appaia all'esone IX del gene hIDS e un *primer reverse* che si lega all'esone III-IV del gene W. Questa ha permesso di ottenere un frammento di circa 2200 bp che è stato sequenziato completamente.

Il paziente MV presenta una delezione del gene hIDS e della regione genomica contigua di 43 kb, che si estende dall'introne 8 del gene hIDS (posizione 251048 in AF011889) allo pseudogene IDS-2 (posizione 294370-72 in AF011889). L'alterazione genomica individuata comporta la perdita di due terzi dell'introne 8 sul versante prossimale e di buona parte dello pseudogene dal versante distale.

Il sequenziamento dell'intero frammento di giunzione ha rivelato inoltre la presenza di due nucleotidi residui e di un ulteriore frammento dell'introne 8 lungo 54 bp. E' stata individuata anche una sostituzione di singola base in posizione 251048 nell'introne 8 (figura 21).

```

249361 ccctcaggct gcttccaata ttatgggtaa tcacaaaag accagctcta actcctcctc
249421 tcaccagctg gaagggagca catcacattt gccatccatg gttggcaaaa cTcaaggcat
249481 caacaactgg aaaagatctc caccttggga atcattatac atatttggat cctgcaatgg
249541 gtcagaatcc acaaaataca gttcccctgc atggatgtca gaaaagttag ctagaaattc
249601 atcaggattg aagccaaccc acacagtata cctatagtct atggtgcgta tggaaatagcc
249661 catgatcttt atatctttta aactcggctt gtcagaatc cactgaggga tgtctgaagg
249721 cgggggatac tggctatagg caatcagttc acggggatta ccaggagggt acggatcctc
249781 ttccaagtca cggaatcgaa aatgcttcag aaggttcttg ccttctctgc acagctcaac
249841 gtgaaatgaa ggaacggggc agcgagggtg aacctgcagt cctgcaagtc cagccagcgt
249901 gggaaaaaga gacacaagtt ccacaaggtc catggattgc ctgctgaaa caggaagcga
249961 cagagcagaa tgggttacat tataaaaacc tgccatggcc aggcaggagc agtaaaggaa
250021 cctgtctggg ctccatattg tttctttttt taatttacia catttatctt tagcaacaga
250081 cgtttagaaa caccacctcg gcacctcacc ctgcattaat tactcatcca atcaaatagc
250141 aggatgcaaa attagggccc cacgaggctg ttggcgcttt ttaaacaac ctgaattttg
250201 gaaccaccga ttaataaact gactcagaca aggatcatca attaaggcta caaccactag
250261 gggattatac ctggtgagga acaggatatt ctgactccca caggatcacc ccacacatta
250321 ctccctctcg gatgtctgca ttagagttat ctttgcattt tattacgac aaatacacac
250381 accatgacat ttaccatcgt aaccactttt tagtatacag ttcagtggaa ttaagtacac
250441 ttatactggt gtgccatcat taccaccatc tatctccaga actcctctta atttacacia
250501 ctgaaactct gtccccatta agtaacaact cccctttctc catcctcacc cagcaactgg
250561 aaaccacat tctactttct atgtctatga actggactac tctagatacc tcataggagt
250621 gggattatac agtatttctc cttttgtgac tgactttttt cacttagcat aatgtcctca
250681 aggctcatcc atgatgtagc atgtgtcagt ttccttctt ttaagactg aataatattc
250741 cattgcatgg acggaccaca ttttgtctgt tcttctgtca atagacatct gaattgcttc
250801 cactttctgg ttactgtgaa tagtgctgct atgaacagta atgtacaacc tttgattgaa
250861 tacctgtttt cagctctgtg gatataatcc taggagtgga acttctgggc catagagtaa
250921 ttctatggtt aactctgagg atccacaaa ttcttttcca cagtggctgc accattttac
250981 attcttacca gcaatgcaca agtgttccaa tttttccata taactactaa cactcttaa
251041 acttTttt 251048

```

hIDS  
esone IX

hIDS  
introne 8

DELEZIONE 75 bp

ga 2 bp

DELEZIONE 43196 bp

```

251123 ctgcaacc tccgtctccc aggttcaagt gattctctg
251161 cctcagcctc ctgagta 251177

```

```

294370 g taTcaaaaag ggtgctgtaa ctttaaaga ctgggtattt ccaacttga
294421 atattcaaac catcttttgc aaggatgtt ttaaataaac atgaagggtt gtgttgtttt
294481 taatcagggt taaggatctg gaatcaagg ttatggttta ctccatctat ggcgtatctt
294541 aaaaactgag caagatgtcc ttgccttttt tgaatttgat gattgtgctg cagttccaca
294601 gctcactggt aggtggcaca taccacaaac tgaaaacctg agcttggagg aaatgagtga
294661 aaagataggt aggtacagga cagggcagtg gtgacactac agcattcagg gttcccagcc
294721 tgtcaagaat gagcatgtct tagcagtag gcattttcac atcttctcaa atccacctgt
294781 ggcagttttt ggtgtctttg gttattttta taaccctaaa tatttatata caatttatat
294841 acatgtacaa aagggacatg tacattatat attttgatac aaaatatgca caagtacata
294901 ttttgtatca aaaaagggtt ctccaggagaa ttccacttcc ataaagctgg agtagacata
294961 cttttcccta ttcttccgac taagtgcctt aaaaccctt gataatatac acaaaaacaaa
295021 cataagactc tgaagggtgg agtgaaggca gatcagacgg ggaccttgtg acctgaggaa
295081 caatggagtt aattagttct ctgggtgtgtg tctctctctc tttctttctt tccctctctc
295141 ctcccttccc attcctccct tcccctctct ttttctctt cttttctct ctttcccctt

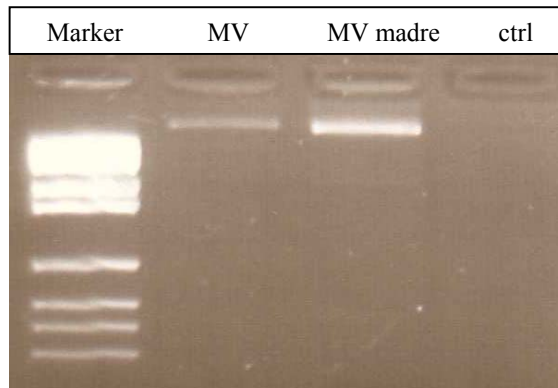
```

IDS-2

gene W  
esone V

Figura 21: sequenza del frammento di giunzione della delezione individuata nel paziente MV. La tripletta GTA evidenziata in fucsia potrebbe appartenere sia all'introne 8 che a IDS-2.

La ricerca della medesima delezione nella madre del paziente ha evidenziato una banda elettroforetica delle medesime dimensioni di quella del figlio (figura 22). La conferma che la madre fosse effettivamente portatrice si è poi ottenuta tramite sequenziamento diretto.



*Figura 22: corsa elettroforetica degli amplificati del frammento di giunzione della delezione del soggetto MV, della madre e di un ctrl*

Una delezione come quella qui caratterizzata, non è mai stata descritta in letteratura.

Ad oggi il *database* HGMD riporta più di 20 grosse delezioni del gene hIDS: alcune di esse coinvolgono solo qualche esone, mentre altre comportano la perdita dell'intero gene e/o dello pseudogene; in alcuni casi queste si estendono distalmente fino a coinvolgere i geni posti a valle di hIDS verso il telomero. In tutti i casi descritti la patologia si manifesta nella sua forma più severa, anche se è difficile da valutare il contributo degli altri geni deleti sul grado di severità della patologia.

Il paziente MV presenta anch'egli una forma severa della patologia con uno spiccato coinvolgimento neurologico; come già detto, un alto grado di severità è predicibile, data l'assenza di buona parte del gene hIDS.

## **Paziente JM**

Il paziente JM presenta una crescita normale nei primi 12 mesi di vita. A 18 mesi tuttavia, comincia a mostrare i primi segni di un ritardo nello sviluppo neuropsicomotorio. Inizia a parlare all'età di 2 anni e mezzo. Nel 2000, a 7 anni, subisce un intervento di adenotonsillectomia. All'età di 10 anni evidenzia uno spiccato ritardo mentale, non è in grado di nutrirsi da solo e non ha raggiunto il controllo sfinterico; presenta inoltre una perdita della capacità uditiva. L'*exitus* avviene nel 2005, in seguito ad aggravamento dei problemi cardiopolmonare.

### **Analisi molecolare**

L'amplificazione dei 9 esoni del gene hIDS nel paziente JM ha dato esito positivo solo per gli esoni I, II, VIII e IX, mentre gli esoni centrali dal III al VII compresi non hanno dato alcun prodotto di amplificazione. Questi risultati hanno suggerito la presenza di una delezione intragenica che si estende dall'esone III all'esone VII.

Un frammento di giunzione di circa 2000 bp è stato amplificato utilizzando un *primer forward* che appaia sull'introne 7 e uno *reverse* che si lega all'esone III. Il suo sequenziamento ha mostrato una delezione dall'introne 7 del gene hIDS (posizione 254414-254433 in AF011889) all'introne 3 (posizione 269617-269794 in AF011889). Inoltre, la sequenza ha evidenziato un'inserzione di parte dello pseudogene IDS2, in orientazione opposta, dalla posizione 294479-294459 alla posizione 293058-292880. Dato l'alto grado di similarità di gene e pseudogene nelle zone coinvolte nella delezione-inserzione, l'appartenenza a hIDS o IDS-2 delle sequenze ottenute è stata stabilita, utilizzando variazioni di sequenza di singolo, di-, tri-nucleotide, ovvero avvalendosi di marcatori specifici a uno dei due geni (figura 23).

Il soggetto JM presenta quindi una delezione di circa 15 kb del gene hIDS associata all'inserzione di circa il 50 % della sequenza di IDS-2. Un'alterazione genetica di questo tipo è dovuta molto probabilmente ad un fenomeno di ricombinazione omologa tra introne 7 e introne 3 di gene e pseudogene che a differenza del tipo di ricombinazione più frequentemente osservato che determina solo un'inversione del frammento compreso tra i due punti di scambio, questo associa ad un'inversione una delezione (figura 24).





Figura 23: sequenza del frammento di giunzione della delezione-inserzione osservata nel paziente JM. I singoli, di-, tri-nucleotidi evidenziati in azzurro e giallo sono i marcatori rispettivamente del gene hIDS e pseudogene IDS-2.

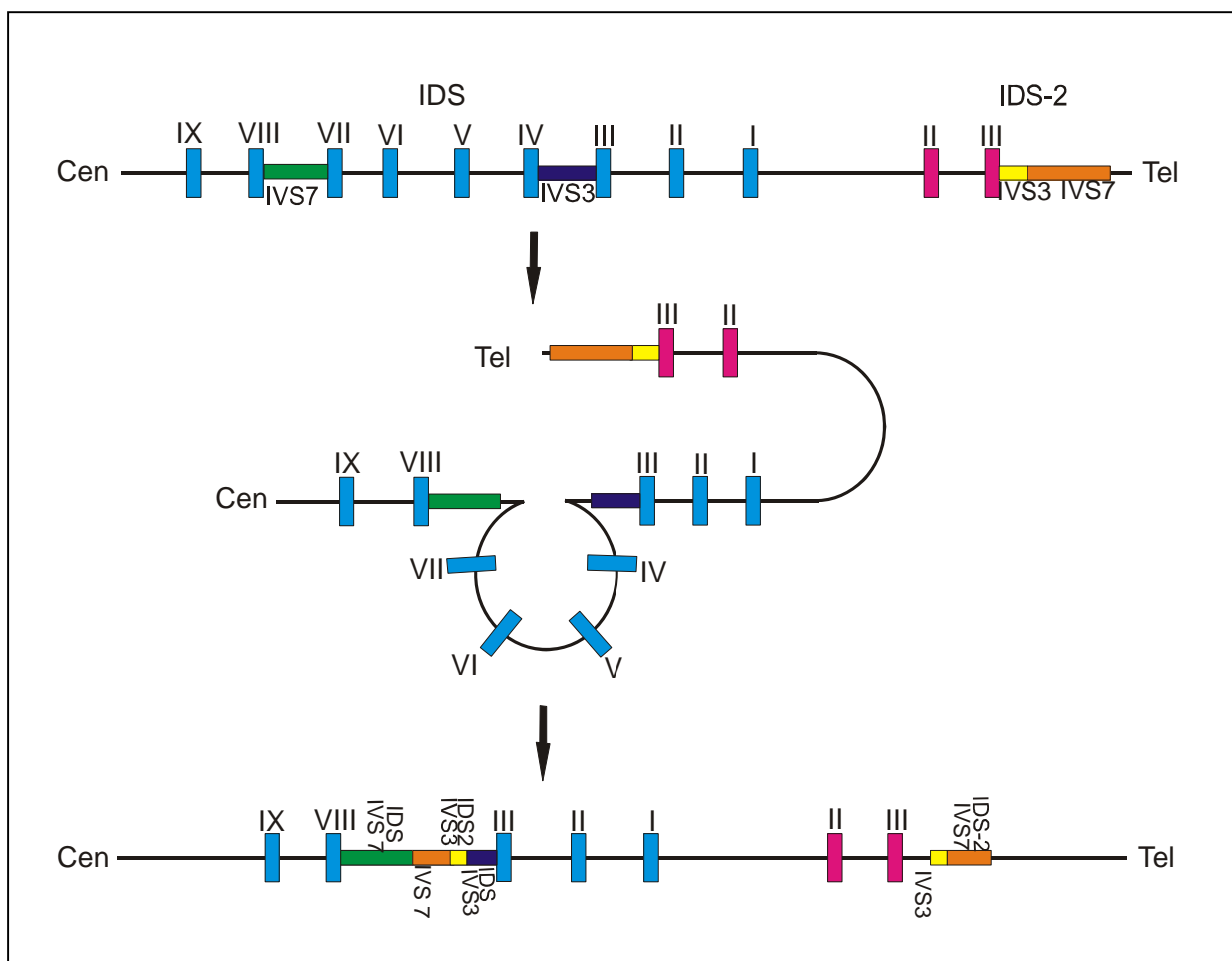


Figura 24: rappresentazione grafica della ricombinazione osservata nel paziente JM.

Casi simili, sebbene non caratterizzati molecularmente, sono stati riportati in letteratura [Biro et al, 1996; Bunge et al, 1998; Li et al, 1999].

La ricerca della stessa variazione nel DNA della madre del paziente JM ha evidenziato una banda elettroforetica delle medesime dimensioni di quella del figlio. La conferma che la madre fosse effettivamente portatrice si è ottenuta tramite sequenziamento diretto.

Parallelamente il soggetto JM è stato sottoposto ad un'analisi basata sul metodo proposto da Lualdi e colleghi per l'analisi delle ricombinazioni gene-pseudogene [Lualdi et al, 2005].

Una coppia di primers viene utilizzata per amplificare sia l'eventuale zona che ha subito ricombinazione sia la regione dello pseudogene integra. La digestione dell'amplificato con

l'enzima *Hinf I* permette di discriminare, in seguito a corsa elettroforetica tra soggetti ricombinanti e soggetti non ricombinanti. Questa analisi ha evidenziato nel soggetto JM la presenza di uno pseudogene IDS-2 non riarrangiato accanto ad una copia ricombinata (figura 25). Un caso analogo è descritto da Birot e colleghi. La presenza di un'extra copia di IDS-2 viene spiegata attraverso un fenomeno di ricombinazione omologa intercromosomica tra gene e pseudogene durante la meiosi, che porta alla generazione di un cromosoma X recante due copie di IDS-2 [Birot et al, 1996].

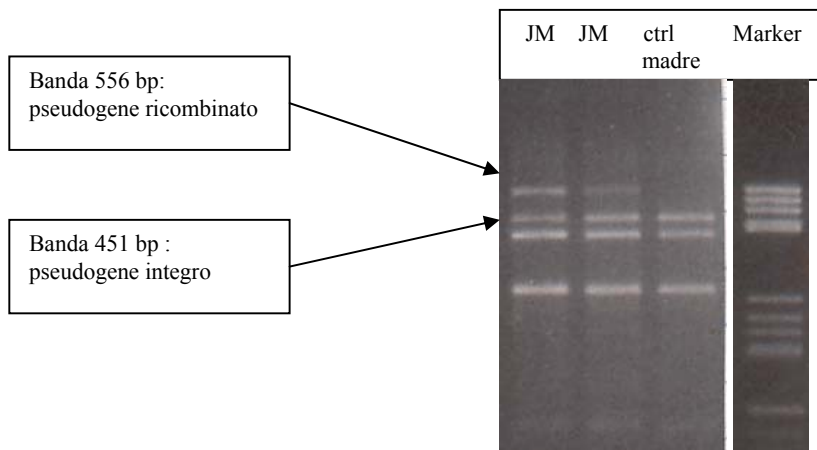


Figura 25: corsa elettroforetica dell'amplificato della zona ricombinante digerito con *HinfI*

Il complesso riarrangiamento subito dal gene hIDS in questo paziente impedisce la produzione di una proteina normale ed è compatibile con una forma severa della patologia.

## CONSIDERAZIONI FINALI

La sindrome di Hunter è una malattia rara con un elevato numero di mutazioni descritte, per la maggior parte private; inoltre, la sequenza codificante presenta un basso numero di esoni, 9. La diagnosi molecolare effettuata mediante la tecnica del sequenziamento diretto, che rimane indubbiamente la più affidabile, è perciò uno strumento importante di diagnosi per questi pazienti. In questo studio, l'analisi molecolare del gene hIDS in 15 pazienti affetti da sindrome di Hunter ha confermato l'estrema eterogeneità genetica della malattia. Nel lavoro qui presentato, infatti, sono state caratterizzate molecolarmente 16 variazioni di sequenza: di queste 12 sono mutazioni puntiformi ovvero alterazioni che coinvolgono meno di 20 nucleotidi, 1 è una delezione di medie dimensioni e 3 sono grossi riarrangiamenti. Tra queste, 9 mutazioni sono nuove ovvero non sono state descritte precedentemente in letteratura e 2 sono mutazioni *de novo*, in quanto la madre non è risultata portatrice. In quasi tutti i pazienti è stata evidenziata una variazione di sequenza diversa, eccetto che in 2 pazienti nei quali è stata rilevata la mutazione p.R443X. Poiché uno dei 15 pazienti analizzati non mostrava alterazioni di sequenza dopo l'analisi degli esoni e delle sequenze di splicing fiancheggianti, l'analisi ha incluso per questo soggetto il sequenziamento della zona promotoriale rivelando un'importante delezione. In letteratura sono descritti parecchi casi di soggetti affetti da MPSII per i quali l'analisi della sequenza codificante non evidenzia alterazioni, l'inclusione in tale analisi della sequenza promotoriale ed eventualmente dei 3' e 5' UTR potrebbe in qualche caso rivelare alterazioni importanti.

Per quanto riguarda la severità della patologia, 11 pazienti studiati su 15 presentano un fenotipo severo o intermedio tendente al severo, concordemente con quanto descritto in letteratura, dove i casi di forme severe riportati sono molto più frequenti di quelli intermedi.

In generale, data la rarità della malattia e il fatto che la maggior parte delle mutazioni sono private, le valutazioni genotipo-fenotipo risultano particolarmente difficili.

Questo tipo di valutazioni si possono effettuare con un certo grado di sicurezza nei casi di grossi riarrangiamenti del gene, ampie delezioni o ricombinazioni che rimuovono o alterano profondamente buona parte del gene e che per questa ragione determinano un fenotipo severo. Tra i casi descritti in questo studio vi sono anche 2 decessi in età precoce di soggetti recanti, il

primo, una delezione di 2 esoni e, il secondo, una ricombinazione omologa accompagnata da una delezione di 4 esoni del gene hIDS.

La difficoltà di correlazione genotipo-fenotipo risulta particolarmente marcata per le mutazioni puntiformi. Dal momento che non esiste la struttura cristallografica della proteina iduronato-2-solfatasi, rimane difficile effettuare una previsione corretta delle conseguenze di eventuali sostituzioni aminoacidiche sulla struttura e/o funzione della proteina. Alcuni elementi risultano comunque essenziali nel tentare di stabilire la severità della mutazione: variazioni di sequenza a carico del sito catalitico risultano invariabilmente in un fenotipo severo, così come variazioni a carico di aminoacidi grandemente conservati dal punto di vista evolutivo.

Tuttavia, anche in riferimento ad una specifica variazione di sequenza la letteratura riporta numerosi esempi di fenotipo discordante a fronte di una medesima mutazione patogena. Sull'espressività e sulla penetranza di mutazioni tipo *missense* o *nonsense* potrebbe certamente influire anche il *background* genomico. Inoltre, la mancanza di un indice standardizzato di severità rende la valutazione di un fenotipo ancora soggettiva.

L'analisi molecolare effettuata sui pazienti completa la diagnosi; inoltre, dato che questa patologia presenta una trasmissione X-linked, la ricerca delle mutazioni nelle madri o negli altri soggetti femminili della famiglia ne risulta molto facilitata, soprattutto nei casi di ampie delezioni, non evidenziabili in un eterozigote a causa dell'amplificazione dell'allele non mutato. E' utile, inoltre, nella diagnosi pre-natale, per verificare se il feto ha ereditato o meno la mutazione dalla madre portatrice. La corretta definizione molecolare di una sequenza alterata potrebbe infine consentire l'eventuale applicazione dei nuovi approcci terapeutici in grado di operare il *rescue* di proteine affette da *misfolding* generate da mutazioni *missense* (*enzyme enhancement therapy*, EET) o lo *stop codon read-through* di mRNA con precoci segnali di terminazione generati da mutazioni *nonsense*. Dato che per quanto riguarda la sindrome di Hunter, e più in generale per le patologie da accumulo lisosomiale, percentuali di attività enzimatica pari al 3-5 % potrebbero risultare sufficienti ad ottenere un effetto terapeutico, l'impiego di strategie terapeutiche, quali l'EET o lo *stop codon read-through*, potrebbe risultare una valida alternativa all'ERT. Tale terapia comporta, infatti, la produzione di un certo livello di anticorpi neutralizzanti, presenta costi elevati e soprattutto non permette di trattare i problemi neurologici nelle forme severe della malattia, poichè l'IDS ricombinante non oltrepassa la barriera ematoencefalica. Molecole come le chaperonine o gli antibiotici che potenziano il *read-*

*through* del codone di stop presentano caratteristiche di ridotte dimensioni e di idrofobicità compatibili con l'attraversamento della barriera cerebrale.

## BIBLIOGRAFIA

**Beck M and Wraith E.** Update on mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatrica* 2007; 96:55

**Birot AM, Bouton O, Froissart R, Maire I, Bozon D.** IDS gene-pseudogene exchange responsible for an intragenic deletion in a Hunter patient. *Hum Mutat* 1996a; 8(1):44-50.

**Birot AM, Delobel B, Gronnier P, Bonnet V, Maire I, Bozon D.** A 5-megabase familial deletion removes the IDS and FMR-1 genes in a male Hunter patient. *Hum Mutat* 1996b; 7(3):266-8

**Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, Kleijer WJ, Tønnesen T, Carlberg BM, Pettersson U.** Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1995; 4(4):615-21

**Bonnucelli G, Regis S, Filocamo M, Corsolini F, Caroli, Gatti R.** A deletion involving exons 2-4 in the iduronate-2-sulfatase gene of a patient with intermediate Hunter syndrome. *Clin Genet* 1998; 53:474-477

**Broadhead DM, Kirk JM, Burt AJ, Gupta V, Ellis PM, Besley GT.** Full expression of Hunter's disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation. *Clin Genet* 1986; 30(5):392-8.

**Brooks DA, Muller VJ, Hopwood JJ.** Stop-codon read-through for patients affected by a lysosomal storage disorder. *Trends Mol Med* 2006; 12(8):367-73.

**Bunge S, Rathmann M, Steglich C, Bondeson ML, Tylki-Szymanska A, Popowska E, Gal A.** Homologous nonallelic recombination between the iduronate- sulfatase gene and pseudogene cause various intragenic deletion and inversions in patients with mucopolysaccharidosis type II. *European Journ Hum Genet* 1998; 6(5):492-500

**Bunge S, Steglich C, Beck M, Rosenkranz W, Schwinger E, Hopwood JJ, Gal A.** Mutation analysis of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Hum Mol Genet* 1992; 1(5):335-9.

**Clarke JT., Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN.** Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosomes in a karyotypically normal girl. *Am Journ Hum Genet* 1991; 49(2):289-297

**Clarke JT, Willard HF, Teshima I, Chang PL, Skomorowski MA.** Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) in a karyotypically normal girl. *Clin Genet* 1990; 37(5):355-362

**Clarke JT, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Richards RI, Sutherland GR, Ray PN.** Characterization of a deletion at Xq27-q28 associated with unbalanced inactivation of the nonmutant X chromosome. *Am Journ Hum Genet* 1992; 51(2):316-322

**Cudry S, Tigaud I, Froissart R, Bonnet V, Maire I, Bozon D.** MPSII in females: molecular basis of two different cases. *J Med Genet* 2000; 37(10):E29

**Daniele A, Tomanin R, Villani GR, Zacchello F, Scarpa M, Di Natale P.** Uptake of recombinant iduronate-2-sulfatase into neuronal and glial cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588(3):203-9

**den Dunnen JT, Antonarakis SE.** Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001 Jul;109(1):121-4.

**Desnick RJ.** Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27(3):385-410

**Filocamo M, Bonuccelli G, Corsolini F, Mazzotti R, Cusano R, Gatti R.** Molecular analysis of 40 Italian patients with mucopolysaccharidosis type II: New mutations in the iduronate-2-sulfatase (IDS) gene. *Hum Mutat* 2001; 18(2):164-5

**Flomen RH, Green PM, Bentley DR, Giannelli F, Green EP.** Detection of point mutations and a gross deletion in six Hunter syndrome patients. *Genomics* 1992; 13(3):543-50.

**Froissart R, Blond JL, Maire I, Guibaud P, Hopwood JJ, Mathieu M, Bozon D** Hunter syndrome: gene deletions and rearrangements. *Hum Mut* 1993; 2(2):138-40.

**Froissart R, Maire I, Bonnet V, Levade T, Bozon D.** Germline and somatic mosaicism in a female carrier of Hunter disease. *J Med Genet* 1997; 34(2):137-40

**Froissart R, Moreira da Silva I, Maire I.** Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta paediatrica* 2007; 96:71-77

**Goldenfum SL, Young E, Michelakakis H, Tsagarakis S, Winchester B** Mutation analysis in 20 patients with Hunter disease. *Hum Mut* 1996; 7(1):76-8.

**Gort L, Chabás A, Coll MJ** Hunter disease in the Spanish population: Molecular analysis in 31 families. *J Inherit Metab Dis* 1998a; 21(6):655-61; a

**Gort L, Coll MJ, Chabas A.** Mutations in the iduronate-2-sulfatase gene in 12 Spanish patients with Hunter disease. *Hum Mutat* 1998b; Suppl 1:S66-8; b

**Gort L, Chabás A, Coll MJ.** A new polymorphism in the iduronate-2-sulphatase gene. Implications for the diagnosis of Hunter disease. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22(7):844



**Hartog C, Fryer A, Upadhyaya M.** Mutation analysis of iduronate-2-sulphatase gene in 24 patients with Hunter syndrome: Characterisation of 6 novel mutations *Hum Mutat* 1999; 14(1):87.

**Hopwood JJ, Bunge S, Morris CP, Wilson PJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A.** Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene. *Hum Mut* 1993; 2:435-442

**Karsten SL, Voskoboeva E, Tishkanina S, Pettersson U, Krasnopolskaja X, Bondeson ML.** Mutational spectrum of the iduronate-2-sulfatase (IDS) gene in 36 unrelated Russian MPS II patients. *Hum Genet* 1998; 103(6):732-5.

**Kato T, Kato Z, Kuratsubo I, Tanaka N, Ishigami T, Kajihara J, Sukegawa-Hayasaka K, Orii K, Isogai K, Fukao T, Shimosawa N, Orii T, Kondo N, Suzuki Y.** Mutational and structural analysis of Japanese patients with mucopolysaccharidosis type II. *J Hum Genet* 2005; 50(8):395-402. Epub 2005 Aug 30

**Lagerstedt K, Carlberg BM, Karimi-Nejad R, Kleijer WJ, Bondeson ML** Analysis of a 43.6 kb deletion in a patient with Hunter syndrome (MPSII): identification of a fusion transcript including sequence from the gene W and IDS gene. *Hum Mutat* 2000; 15:324-331

**Lagerstedt K, Karsten SL, Carlberg BM, Kleijer WJ, Tønnesen T, Pettersson U, Bondeson ML.** Double-strand breaks may initiate the inversion mutation causing the Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(4):627-33

**Li P, Bellows A B, Thompson J N** Molecular basis of iduronate-2-sulfatase gene mutations in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *J Med Genet* 1999; 36:21-27

**Li P, Huffman P, Thompson JN.** Mutations of the iduronate-2-sulfatase gene on a T146T background in three patients with Hunter syndrome. *Hum Mutat* 1995; 5(3):272-4.

**Lissens W, Seneca S, Liebaers I.** Molecular analysis in 23 Hunter disease families. *J Inherit Metab Dis.* 1997 Jul;20(3):453-6

**Lualdi S, Di Rocco M, Corsolini F, Spada M, Bembi B, Cotugno G, Battini R, Stroppiano M, Pittis MG, Filocamo M.** Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762(4):478-84.

**Lualdi S, Regis S, Di Rocco M, Corsolini F, Stroppiano M, Antuzzi D, Filocamo M.** Characterization of IDS gene-pseudogene recombinantions in eight patients with MPS type II revealed by a rapid PCR-based method. *Hum Mut* 2005; 25:491-497

**Martin R, Beck M, Eng C, Giugliani R, Harmatz P, Munõz V, Muenzer J.** Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Paediatrics* 2008; 121(2):377-86.

**Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF.** Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281:249-254

**Moreira Da Silva I, Froissart R, Marques Dos Santos H, Caseiro C, Maire I, Bozon D** Molecular basis of Mucopolysaccharidosis type II in Portugal: identification of four novel mutations. *Clin Genet* 2001; 60(4):316-8

**Mossman J, Blunt S, Stephens R, Jones E. E., Pembrey M.** Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. *Arch Dis Child* 1983; 58(11): 911-915

**Neufeld EF and Muenzer J.** The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds) *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8 ed, Vol III. McGraw-Hill, Medical Publishing Division*, p 3421. 2001.

**Parkinson-Lawrence E, Turner C, Hopwood JJ, Brooks D.** Analysis of normal and mutant iduronate-2-sulphatase conformation. *Biochem J* 2005; 386(Pt 2):395-400

**Rathmann M, Bunge S, Beck M, Kresse H, Tytki-Szymanska A, Gal A.** Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): mutation "hot spots" in the iduronate-2-sulfatase gene. *Am J Hum Genet.* 1996 Dec;59(6):1202-9

**Ricci V, Filocamo M, Regis S, Corsolini F, Stroppiano M, Di Duca M, Gatti R.** Expression studies of two novel in CIS-mutations identified in an intermediate case of Hunter syndrome. *Am J Med Genet A* 2003; 120A(1):84-7

**Roberts SH, Upadhyaya M, Sarfarazi M, Harper PS.** Further evidence localising the gene for Hunter's syndrome to the distal region of the X chromosome long arm. *Journ Med Genet* 1989; 26(5):309-313

**Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A.** Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet* 2005; 14(21):3203-17

**Schwartz IV, Ribeiro MG, Mota JG, Toralles MB, Correia P, Horovitz D, Santos ES, Monlleo IL, Fett-Conte AC, Sobrinho RP, Norato DY, Paula AC, Kim CA, Duarte AR, Boy R, Valadares E, De Michelena M, Mabe P, Martinhago CD, Pina-Neto JM, Kok F, Leistner-Segal S, Burin MG, Giugliani R.** A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II. *Acta Paediatr Suppl* 2007; 96(455):63-70.

**Sukegawa K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T, Kuwata K, Orii T, Kondo N.** Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29:755-761

**Sukegawa K, Tomatsu S, Fukao T, Iwata H, Song XQ, Yamada Y, Fukuda S, Isogai K, Orii T.** Mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease): identification and characterization of eight

point mutations in the iduronate-2-sulfatase gene in Japanese patients. *Hum Mutat* 1995; 6(2):136-43

**Sukegawa K, Tomatsu S, Tamai K, Ikeda M, Sasaki T, Masue M, Fukuda S, Yamada Y, Orii T.** Intermediate form of mucopolysaccharidosis type II (Hunter disease): a C1327 to T substitution in the iduronate sulfatase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183(2):809-13

**Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokuryu M, Iwata S, Tomatsu S, Orii T, Kondo N.** Brother/sister siblings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation. *Clin Genet* 1998; 53(2):96-101

**Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Shimozaue N, Fukuda S, Isogai K, Nishio H, Matsuo M, Tomatsu S, Kondo N, Orii T.** Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele. *Hum Mutat* 1997; 10(5):361-367

**Timms KM, Bondenson ML, Ansari-Lari MA, Lagerstedt K, Muzny DN, Dugan-Rocha SP, Nelson DL, Pettersson U, Gibbs RA.** Molecular and phenotypic variation in patients with severe Hunter syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(3):479-86

**Timms KM, Hockett LE, Belmont JW, Shapira SK, Gibbs RA.** DNA deletion confined to the iduronate-2-sulfatase promoter abolishes IDS gene expression. *Hum Mutat* 1998; 11(2):121-6

**Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall LE, Hatton CE, Thornley M, Wraith JE.** Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II (Hunter's disease). *Arch Dis Child* 1998; 79(3):237-41

**Vellodi A, Young E, Cooper A, Lidchi V, Winchester B, Wraith JE.** Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease. *J Inher Metab Dis* 1999; 22(5):638-48

**Vellodi A.** Lysosomal storage disorder. *British Journal of Haematology* 2004; 128:413-431

**Villani GR, Balzano N, Grosso M, Salvatore F, Izzo P, Di Natale P** Mucopolysaccharidosis type II: identification of six novel mutations in Italian patients. *Hum Mut* 1997; 10(1):71-5.

**Villani GR, Daniele A, Balzano N, Di Natale P.** Expression of five iduronate-2-sulfatase site-directed mutations. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 15;1501(2-3):71-80

**Whitley CB, Anderson RA, Aronovich EL, Crotty PL, Anyane-Yeboah K, Russo D, Warburton D.** Caveat to genotype-phenotype correlation in mucopolysaccharidosis type II: discordant clinical severity of R468W and R468Q mutations of the iduronate-2-sulfatase gene. *Hum Mutat* 1993; 2(3):235-7

**Winchester B, Vellodi A, Young E.** The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem Soc Trans* 2000; 28(2):150-154

**Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcom S.** Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning. *Am Journ Med Genet* 1992; 44(6):834-838

**Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, Meldgaard Lund A, Malm G, Van der Ploeg AT, Zeman J.** Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr* 2008; 167(3):267-77