



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di ricerca in Genetica Medica XXIV Ciclo

**FAOD (Malattie ossidazione degli acidi grassi): Indagini Biochimiche
e Genetico-Molecolari in ambito di un programma di Screening
Neonatale**

Coordinatore: *Prof.ssa Paola Grammatico*

Dottorando: *Simone Pozzessere*

Relatore: *Professor Italo Antonozzi*

La ricerca si è resa possibile grazie al conferimento della borsa di studio -Anno 2011/2012- da parte della Fondazione Achille Lattuca

INDICE:

1. Introduzione
 - 1.1 Screening Neonatale
 - 1.2 Screening Neonatale Allargato
 - 1.2.1 Una nuova tecnologia per lo screening neonatale: la “tandem mass spectrometry”
 - 1.2.2 La visione attuale dei programmi di screening neonatale
 - 1.2.3 La diffusione dei programmi di screening metabolico allargato
 - 1.3 Biochimica della β -ossidazione
 - 1.4 Malattie metaboliche ereditarie
 - 1.4.1 Difetti dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi
 - 1.4.1.1 CUD
 - 1.4.1.2 CPT1
 - 1.4.1.3 CPT1
 - 1.4.1.4 MCAD
 - 1.4.1.5 Deficit di LCHAD α , di LCHAD β e della Proteina Trifunzionale
 - 1.4.1.5 VLCAD
 - 1.4.1.6 SCAD
2. Scopo della Tesi
3. Materiali e Metodi
 - 3.1 Spettrometria di massa in tandem (ESI-MS/MS)
 - 3.2 Analisi in FIA-ESI-MS/MS
 - 3.3 Definizione dei valori di cut-off
 - 3.4 Estrazione acidi nucleici
 - 3.5 Reazione a catena della Polimerasi
 - 3.6 Sequenziamento
 - 3.7 SnapShot (Analisi mutazioni prevalenti)
 - 3.8 Real Time (delezione esoni)
 - 3.9 Validazione dei Test molecolari
 - 3.9.1 Validazione metodo semiquantitativo per identificazione delezione di esoni
4. Risultati
 - 4.1 Messa a punto algoritmi diagnostici e di conferma
 - 4.1.1 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto VLCAD
 - 4.1.2 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto MCAD
 - 4.1.4 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto Lchad α -Lchad β
 - 4.1.4 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto CUD
 - 4.1.5 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto CPT1A
 - 4.2 Pazienti positivi per malattie delle β -ossidazione
 - 4.3 FOLLOW-UP pazienti positivi
5. Validazione bioinformatica e rapporto genotipo
6. Conclusioni
7. Bibliografia
 - 7.1 Tools Bioinformatici

1. INTRODUZIONE

1.1 Screening neonatale

Il termine “screening neonatale” definisce i programmi di medicina preventiva secondaria, attivati su larga scala nei primi giorni di vita, aventi per obiettivo la selezione precoce ed il tempestivo trattamento di neonati ad alto rischio per alcune patologie congenite, curabili, caratterizzate principalmente da un’importante mortalità precoce e/o da una morbilità severa dei soggetti affetti.

Nel 1963, un ricercatore americano, Robert Guthrie, mise a punto il primo esame di laboratorio che consentiva di misurare la concentrazione dell’amminoacido fenilalanina in una goccia di sangue, prelevata mediante puntura del tallone del neonato, fatta assorbire e quindi essicare su una speciale carta da filtro (“Guthrie card”) [26 Guthrie R, Susi A., 1963]. Questo esame, a basso costo ed eseguibile facilmente su larga scala, ha consentito di realizzare le prime campagne di screening neonatale per individuare i neonati affetti da fenilchetonuria (PKU), il più comune errore congenito del metabolismo, caratterizzato da un grave ritardo mentale.

In una successione temporale ormai storica, alla fenilchetonuria si aggiunsero, fra le patologie con indicazione assoluta per lo screening neonatale, l’ipotiroidismo congenito e, nei successivi quarant’anni, altre numerose malattie, principalmente genetiche, quali endocrinopatie, errori congeniti del metabolismo ed emoglobinopatie.

Tradizionalmente, i programmi di screening neonatale utilizzano come indicatori biologici di patologia marcatori, principalmente ematici, la cui misura quantitativa o valutazione qualitativa permette, con sufficiente efficienza, la selezione dei soggetti a maggior rischio presenti nella popolazione neonatale. In alcuni programmi, l’analisi di laboratorio è rivolta alla misura di substrati accumulati nei liquidi biologici, con differenti meccanismi: a) alterata utilizzazione o trasformazione, da deficit enzimatico, di un substrato in un processo biochimico (PKU: fenilalanina; galattosemia: galattosio; iperplasia surrenalica congenita: 17- α OH progesterone); b) ostruzione meccanica (fibrosi cistica: tripsina immunoreattiva); c) attivazione fisiologica di un fenomeno di “feedback” [(ipotiroidismo: ormone tiroideo-stimolante (TSH)]. In altri, è la carenza/riduzione di un substrato l’indicatore di una situazione di rischio (ipotiroidismo: tiroxina) o, ancora, è la presenza di metaboliti anomali, assenti in condizioni fisiologiche (emoglobinopatie). Infine, lo screening può essere condotto mediante la

misura o valutazione qualitativa di una specifica attività enzimatica (galattosemia: attività dell'enzima galattosio-1-P-uridiltransferasi).

1.2 Screening neonatale allargato

Alla fine degli anni '60, l'OMS, in un'ottica di valutazione centrata principalmente sulle malattie croniche dell'adulto, definì i principi ed i criteri per le patologie selezionabili come obiettivi dei programmi di screening di massa in età neonatale [62 Wilson JM, et al., 1968]. Questi criteri sono la base di ogni programma di screening e si possono così riassumere:

1. La malattia cercata deve costituire un problema sanitario importante per l'individuo e la società.
2. La malattia può essere identificata dallo screening ad uno stadio latente (pre-sintomatico) o ad uno stadio sintomatico precoce.
3. La storia naturale della malattia, inclusa l'evoluzione da forma latente a malattia dichiarata, deve essere conosciuta adeguatamente.
4. Deve essere disponibile un test di screening.
5. Il test di screening deve essere accettabile per la popolazione.
6. Un trattamento accettato ed efficace deve esistere per la malattia in questione.
7. Deve esistere un chiaro protocollo di trattamento (quali pazienti trattare).
8. Le strutture necessarie per la diagnosi ed il trattamento devono essere disponibili.
9. Il costo dei casi positivi (inclusa conferma diagnostica e trattamento) deve essere noto.
10. Lo screening deve essere un processo continuativo.
11. I costi dello screening devono essere bilanciati adeguatamente dai costi per la salute (prevenzione dell'handicap).

Questo modello è oggi pressoché universalmente considerato superato: le sue principali criticità sono quelle di non considerare il significato familiare dello screening neonatale, in particolare il valore dell'informazione genetica, e la valenza positiva che la comunicazione precoce postnatale di una malattia, anche incurabile, può avere nel

percorso di gestione familiare di una malattia congenita (problema della cosiddetta “odissea diagnostica”).

Dagli anni '60, l'evoluzione tecnologica ha offerto sempre maggiori possibilità di ampliare le tecniche di laboratorio applicate allo screening neonatale, fornendo la possibilità d'utilizzare – su larga scala – un numero sempre maggiore di biomarcatori per la selezione di malattie. Dagli anni '90 si afferma progressivamente la possibilità di superare il concetto “un marker, una malattia” per raggiungere il modello tecnico-organizzativo “più marcatori simultanei per molte malattie”: una nuova visione multiparametrica o di piattaforma analitica nell'esecuzione laboratoristica dello screening, che tende a modificare la struttura dei programmi di screening neonatale. La tecnologia che oggi meglio risponde a questa visione è quella di spettrometria di massa (“tandem mass spectrometry”), che fu sviluppata per merito dei ricercatori della Duke University e del “Newborn Screening Laboratory” (North Carolina, USA) sul finire degli anni '80 [44 Millington DS, et al, 1990].

1.2.1 Una nuova tecnologia per lo screening neonatale: la “tandem mass spectrometry”

La spettrometria di massa è una tecnica che identifica e quantifica le molecole in base alla loro massa o PM, caratteristica determinata dalla composizione elementare della molecola, mentre alla struttura atomica della molecola sono legate altre caratteristiche fisiche e chimiche della stessa (polarità, volatilità). Uno spettrometro di massa (MS) è costituito essenzialmente da una camera di ionizzazione o sorgente, un analizzatore di massa ed un rivelatore: l'insieme consente di analizzare le molecole in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

Il passo successivo, ossia l'applicazione delle tecniche in ESI-LC-MSMS al campione speciale, già usualmente utilizzato per lo screening neonatale, campione DBS (“dried blood spot”) o “Guthrie card”, ha permesso una potenziale drammatica espansione del numero di patologie tecnicamente affrontabili con politiche di screening neonatale, aprendo la possibilità di valutare simultaneamente, con la stessa azione tecnica, gruppi di malattie rare, singolarmente non rispondenti ai criteri di selezione delle patologie per i programmi di screening neonatale.

Si è resa tecnicamente possibile la selezione, in un'unica seduta analitica e su un unico campione biologico ("Guthrie card"), di numerosi errori congeniti del metabolismo (amminoacidopatie, difetti del metabolismo degli acidi grassi, acidemie organiche) [14 Chace DH, et al. 2003] [15 Chace DH, et al. 2005] [51 Rinaldo P, et al. 2004].

1.2.2 La visione attuale dei programmi di screening neonatale

Questa evoluzione tecnologica, unita alle criticità prima già emerse, ha reso necessario l'aggiornamento dei criteri utilizzati per l'inclusione delle singole patologie in un pannello generale di screening. Numerosi gruppi di lavoro internazionali ("National Academy of Sciences", USA; "Human Genetics Society of Australasia"; "Health Technology Assessments Programme", UK) hanno proposto successive revisioni ed integrazioni del contesto iniziale, definito sul finire degli anni '60, al fine di renderlo più adeguato al progresso tecnologico e scientifico, alla nuova definizione di salute (stato di completo benessere fisico, psichico e sociale e non solo mera assenza di malattia), alla migliore conoscenza di molte malattie metaboliche geneticamente determinate, alle migliorate opzioni di trattamento terapeutico efficace e alle nuove possibilità di diagnosi prenatale nelle famiglie a rischio. I punti principali di questa nuova visione possono essere così riassunti [1 American Academy of Pediatrics Newborn Screening Task Force; 2000]:

- lo screening neonatale è una responsabilità essenziale del sistema sanitario pubblico ed è un fattore critico per migliorare lo stato di salute del bambino ammalato;
- le politiche di screening neonatale dovrebbero essere prioritariamente guidate dalla valutazione di quale sia il miglior interesse per il bambino ammalato, con considerazione secondaria per gli interessi degli altri soggetti coinvolti (neonati "sani", famiglie, aree professionali, autorità politico-sanitaria);
- le raccomandazioni circa l'appropriatezza di una patologia per una sua inclusione in un programma di screening neonatale dovrebbero essere basate su criteri d'evidenza scientifica e di largo consenso professionale.

Nel 2002, negli USA, gli uffici governativi di “Maternal and Child Health Bureau” (MCHB), “Health Resources and Services Administration” (HRSA), “United States Department of Health and Human Services” (DHHS) hanno affidato all’ “American College of Medical Genetics” (ACMG), in collaborazione con l’ “American Academy of Pediatrics” (AAP), il compito di condurre un’ analisi globale sull’efficacia dei programmi di screening neonatale [2 American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group, 2006].

Il gruppo di lavoro interdisciplinare (che si è avvalso di una cooperazione internazionale) ha concentrato la propria azione sui seguenti punti:

- a) raccogliere le migliori evidenze della letteratura sull’idoneità, rispetto allo screening, di specifiche patologie
- b) elaborare raccomandazioni per la costituzione di un pannello uniforme di patologie idonee per lo screening neonatale
- c) analizzare tutte le altre componenti di un “sistema” di screening neonatale, che risultino critiche per il raggiungimento di esiti positivi nei soggetti interessati dai programmi stessi.

Per ogni condizione o patologia conosciuta e rilevata in età neonatale e pediatrica sono quindi stati definiti alcuni criteri fondamentali, sostitutivi di quelli dell’OMS, raggruppabili in tre principali categorie: disponibilità e caratteristiche dell’esame di screening, dei servizi diagnostici, dei trattamenti terapeutici relativi alle singole condizioni.

Ogni condizione è stata considerata in funzione di:

1. caratteristiche cliniche: incidenza della condizione, segni e sintomi clinicamente identificabili nelle prime 48 ore di vita, storia naturale in assenza di trattamento)
2. disponibilità e caratteristiche analitiche dell’esame di screening: disponibilità di un algoritmo analitico sensibile e specifico, applicabilità dell’esame sui campioni neonatali (“Guthrie card”), applicazione dell’esame in una

piattaforma analitica che offre alte capacità di volume analitico, costo economico contenuto, analisi multiple per singola condizione effettuabili nello stesso ciclo analiti, possibilità d'identificare condizioni secondarie multiple o altre condizioni

3. diagnosi, “follow-up”, trattamento e gestione medica complessiva: disponibilità, costo ed efficacia del trattamento, benefici familiari e sociali dell'identificazione precoce, prevenzione della mortalità per diagnosi e trattamento precoce, gestione in fase acuta, semplicità dell'intervento terapeutico.

In base ai risultati di questa prima fase d'analisi, ognuna delle condizioni valutate è stata assegnata ad una delle seguenti categorie in base al punteggio ottenuto:

1. pannello principale di condizioni (“core panel”)
2. condizioni secondarie (“secondary targets”): condizioni che nel processo di screening sono parte della diagnosi differenziale di una condizione del pannello principale
3. condizioni non appropriate (allo stato attuale delle conoscenze) per un programma di screening neonatale: inesistenza di un esame di screening idoneo ed affidabile, punteggio di valutazione insufficiente per altri criteri di valutazione

Sono state considerate 84 condizioni congenite candidate potenziali per un programma di screening neonatale e, ad ognuna di esse, è stato attribuito un punteggio di valutazione, derivante dalla somma dei punteggi attribuiti dal gruppo di lavoro, in base al grado di corrispondenza della singola condizione ai criteri prima rappresentati.

Per essere inclusa nel pannello principale ogni condizione deve rispondere ai seguenti criteri minimi (punteggio >1200):

- deve essere possibile l'identificazione in un periodo di tempo (24–48 ore di vita) nel quale non è comunemente individuabile clinicamente
- è disponibile un esame sensibile e specifico

- vi sono dimostrati benefici, derivanti da una precoce identificazione della condizione, da un tempestivo intervento medico, da un efficace trattamento.

In base a ciò, sono state selezionate 29 condizioni costitutive il pannello principale (Tab.1), ognuna delle quali, a giudizio degli esperti ed in base alle evidenze scientifiche disponibili, è caratterizzata da:

1. esame di screening specifico e sensibile
2. ben conosciuta storia naturale della malattia
3. disponibilità di un efficace trattamento terapeutico

Condizioni incluse nello screening neonatale: Pannello Primario	Acronimo	Marker
Fenilchetonuria	PKU	Phe
Deficit biosintesi cofattore bioterina	BIOPT (BS)	Phe
Deficit rigenerazione cofattore bioterina	BIOPT (REG)	Phe
Malattia urine a sciroppo d'acero	MSUD	Leu, Val
Tirosinemia tipo I	TYR I	SUAC, Tyr
Acidemia Argininosuccinica	ASA	ASA, Cit
Citrullinemia	CIT	Cit
Omcistinuria	HCY	Met
Tirosinemia tipo II	TYR II	Tyr
Deficit acil CoA deidrogenasi a catena media	MCAD	C8 (Profilo)
Deficit idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga	LCHAD	C16-OH (Profilo)
Deficit della proteina trifunzionale	TFP	C16-OH (Profilo)
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena molto lunga	VLCAD	C14:1 (Profilo)
Deficit di Carnitina palmitoiltransferasi II	CPT II	C16, C18 (Profilo)
Acidemia glutarica tipo II	GA II	C4, C18 (Profilo)
Deficit uptake della carnitina	CUD	C0, C4, C18 (Profilo)
Acidemia glutarica tipo I	GA I	C5DC
Acidemia Isovalerica	IVA	C5
Deficit 3-idrossi-3-metilglutaril CoA liasi	HMG	C5-OH
Deficit del Beta-chetotilasi	BKT	C5-OH
Acidemia Metilmalonica	MUT	C3
Acidemia Propionica	PA	C3
Deficit Multiplo carbossilasi	MCD	C3

(Tab.1: pannello principale screening neonatale allargato)

Il pannello secondario (Tab2) comprende 25 patologie (punteggio 1000-1200) derivate come “secondary targets” dalla diagnosi differenziale delle patologie precedentemente elencate.

Condizioni incluse nello screening neonatale: Pannello Secondario	Acronimo	Marker
Iperfenilalaninemia benigna	H-PHE	Phe
Deficit di Carnitina palmitoiltransferasi II	CIT II	Cit
Tirosinemia tipo II	TYR II	Tyr
Iper metioninemia	H-MET	Met
Deficit carnitina-acilcarnitina translocasi	CACT	C16, C18 (Profilo)
Acidemie Metilmaloniche	Cbl C,D	C3
Deficit del 3-Metil crotonil-CoA carbossilasi	3MCC	C5-OH
Deficit del 2-Metil butiril-CoA deidrogenasi	2MBG	C5
Aciduria 3-Metil glucaconica	3MGA	C5-OH
Aciduria 2-Metil 3-idrossi butirrico	2M3HBA	C5-OH
Encefalopatia Etilmalonica	EE	C4, C5
Argininemia	ARG	Arg
Iperglicinemia non chetotica	NKHG	Gly
Deficit di Carnitina palmitoiltransferasi I	CPT I	C16 (profilo)
Deficit dell'acil CoA deidrogenasi a catena corta	SCAD	C4
Deficit Isobutiril-CoA deidrogenasi	IBG	C4
Aciduria Malonica (Deficit malonil CoA decarbossilasi)	MAL	C3DC
Deficit chetoacil -CoA deidrogenasi a catena media	MCKAT	C8 (profilo)
Deficit Dienoil reductasi	DE-RED	C10:2
Difetti idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena corta	SCHAD	C4-OH

(Tab.2: pannello secondario screening neonatale allargato)

Le raccomandazioni conclusive, relative alla costituzione di un pannello di condizioni per lo screening neonatale, sono sintetizzabili nei seguenti quattro punti finali:

1. screening obbligatorio per tutte le condizioni elencate nel pannello principale
2. obbligo di selezione per tutte le condizioni del pannello secondario e vincolo di segnalazione per ogni altro risultato anomalo (non negativo) di potenziale rilevanza clinica (inclusa la condizione di “carrier” genetico)
3. massimizzazione dell’uso di piattaforme analitiche multiparametriche (quali le tecnologie MSMS per lo screening degli errori congeniti del metabolismo)
4. considerazione che l’insieme dei benefici realizzabili attraverso politiche di screening neonatale si estende anche ad azioni o trattamenti che vanno oltre la valutazione della mortalità o morbilità infantile.

1.2.3 La diffusione dei programmi di screening metabolico allargato

La “tandem mass spectrometry” ha introdotto un progresso rivoluzionario nello screening e nella diagnosi degli errori congeniti del metabolismo consentendo a molti laboratori di screening nel mondo di estendere i pannelli in uso, sia includendo *ex novo* i difetti dell’ossidazione degli acidi grassi e le acidemie organiche, sia aumentando enormemente il numero di amminoacidopatie selezionabili con il programma. E’ quindi iniziata l’era dei cosiddetti programmi di screening neonatale “esteso”o “allargato”.

In Italia, la legislazione nazionale in vigore (legge 104/1992, DPCM 09.07.1999) rende obbligatorio lo screening neonatale solo per PKU, ipotiroidismo congenito e fibrosi cistica, ma con possibilità per le singole regioni di attivare programmi integrativi per endocrinopatie congenite ed errori congeniti del metabolismo. In base a questa apertura normativa, negli ultimi anni sono state attivate iniziative regionali di screening neonatale esteso, a carattere istituzionale (Toscana) o come programmi pilota ad estensione geografica variabile (Liguria, alcune province venete, Lazio) [13 Cerone R, et al., 2007]. I dati raccolti dalla Società Italiana per gli Screening Neonatali evidenziano che dal 2005 al 2007 sono stati selezionati complessivamente mediante programmi estesi oltre 32 casi di errore congenito del metabolismo in oltre 148.000 neonati, con un incidenza complessiva di acidemie organiche, difetti

dell'ossidazione degli acidi grassi ed amminoacidopatie (iperfenilalaninemie PKU escluse) nei nati vivi pari a 1:4.632 [12 Cerone R, Caruso U., 2007].

Per una prima valutazione d'efficacia dei programmi di screening esteso in Italia, questo dato è confortante se confrontato con i risultati dello studio retrospettivo nazionale condotto negli anni 1985 –1997, in cui la selezione clinica per sintomi evidenziava un'incidenza delle stesse patologie pari a 1:6.200 [18 Dionisi-Vici C, et al., 2002].

Anche in termini d'economia sanitaria, l'analisi dei primi risultati ottenuti con i programmi di screening neonatale esteso sembra avere un indirizzo complessivamente favorevole. Alcuni autori evidenziano, in termini di analisi costo/benefici, che i programmi basati sulla tecnologia MS/MS per errori congeniti del metabolismo possono determinare un risparmio economico complessivo, se comparati agli alti costi assistenziali per i soggetti, a lunga sopravvivenza, diagnosticati in assenza di screening [21 Feuchtbaum L, et al. 2006] e che l'uso della tecnologia MS/MS (in confronto a quello di altre tecnologie) ha la capacità di determinare un maggiore livello di risparmio economico, proprio in funzione della caratteristica intrinseca di essere in grado di rilevare un pannello di patologie in un unico esame [11 Carroll AE, et al., 2006].

Va segnalato, tuttavia, che altre valutazioni hanno invece evidenziato benefici economici minori e riservati a programmi limitati nel numero di patologie sottoposte a screening [47 Pandor A, et al 2004].

Nonostante il prevalente favore nei confronti dei programmi di screening neonatale esteso, non deve però essere sottovalutata l'esistenza di problemi ancora aperti, connessi con l'attivazione di tali programmi. I principali punti di riflessione sono di seguito sinteticamente elencati in un ordine prioritario:

- la possibile selezione di patologie in cui l'intervento terapeutico, anche se precoce ed iniziato in un periodo pre sintomatico, non modifica del tutto la storia naturale della malattia;
- l'individuazione di varianti biologiche, a basso impatto clinico, o di patologie ad esordio tardivo, in cui non vi sono evidenze della necessità o dell'utilità di un intervento terapeutico;
- l'inevitabile, anche se contenuto, incremento di falsi positivi (soprattutto in particolari categorie, come ad es. i soggetti prematuri), con potenziali

ripercussioni negative (psicologiche, sociali, economiche) nell'ambito familiare;

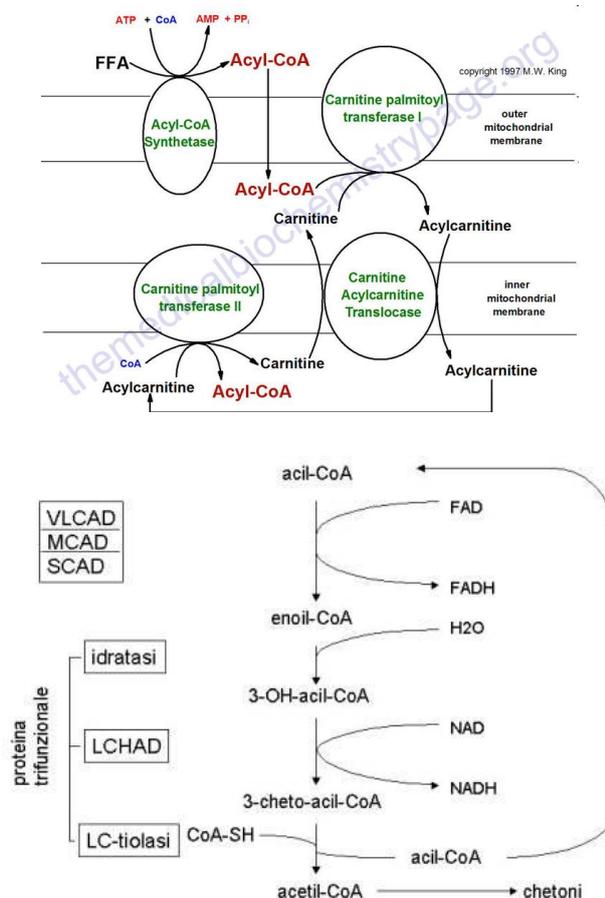
- il rischio che, in situazioni di falsa negatività (che, seppur rare, sono comunque presenti anche in programmi ad alta efficienza), il falso senso di sicurezza determinato dall'esistenza di un programma di screening mirato rallenti ulteriormente la diagnosi clinica della malattia. Rischio che si sta già tentando di eliminare grazie ad uno studio collaborativo in ambito internazionale (Region 4 Genetics Collaborative: <http://region4genetics.org/>).

1.3 Biochimica della β -ossidazione

La β -ossidazione mitocondriale svolge un ruolo importante nella produzione di energia, soprattutto durante i periodi di digiuno. Il percorso è complesso e comprende ben 20 singoli passaggi: assorbimento cellulare degli acidi grassi; la loro attivazione di acil-CoA esteri; trans-esterificazione acilcarnitine; traslocazione attraverso il membrana mitocondriale; riesterificazione di acil-CoA esteri, e la β -ossidazione mitocondriale che attraverso quattro passaggi enzimatici permette il progressivo accorciamento della catena carboniosa degli acidi grassi, attivati come esteri del coenzima-A, per la produzione dell'acetil-CoA (Fig.1).

La prima tappa consiste nella ossidazione dell'acido grasso con formazione di un doppio legame ad opera di deidrogenasi FAD dipendenti; a seconda della lunghezza dell'acido grasso, intervengono quattro specifici enzimi (VLCAD, MCAD, SCAD).

Le tre tappe successive sono mediate dalla acil-CoA idratasi, dalla 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi e dalla 3-chetoacil-CoA tiolasi; questi tre funzioni vengono svolte da un complesso multienzimatico chiamato **proteina trifunzionale**. Il ciclo ossidativo si ripete fino alla completa trasformazione dell'acido grasso in acetil-CoA.



(FIG.1 β -ossidazione mitocondriale: Trasporto dell'acil-CoA attraverso la membrana mitocondriale e sua trasformazione in acetil-CoA)

Digestione, mobilizzazione trasporto degli acidi grassi:

Le cellule che ricavano energia dall'ossidazione degli acidi grassi possono ottenere quegli acidi grassi da tre fonti: i grassi della dieta, i lipidi depositati nelle cellule ed i lipidi sintetizzati in un organo ed esportati in un altro. In media, il 40% o anche più dell'energia richiesta giornalmente dall'uomo è fornita dai triacilgliceroli della dieta.

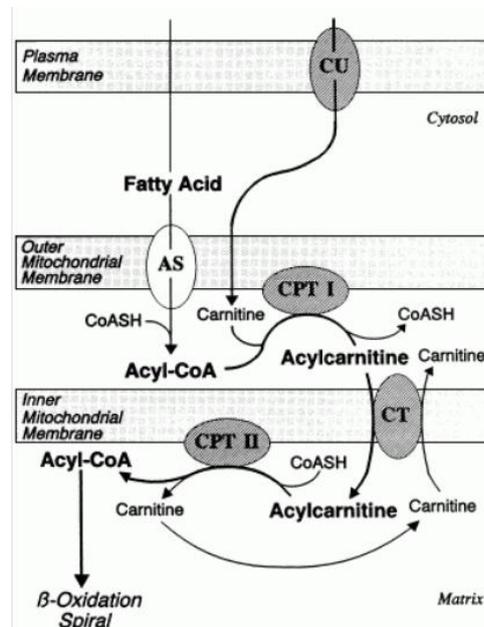
I grassi della dieta vengono assorbiti nell'intestino tenue ma prima che possano essere assorbiti attraverso la parete intestinale devono essere convertiti da particelle di grasso macroscopico insolubile in micelle finemente disperse.

L'ossidazione completa è possibile solo nel mitocondrio e, poiché la membrana interna è permeabile solo agli acidi grassi a catena corta e media, e non a quelli a catena lunga, questi ultimi riescono a passarla solo tramite il ciclo della carnitina.

IL Ciclo della Carnitina:

Il ciclo di carnitina è necessaria per il trasporto degli acidi grassi a catena lunga nella matrice mitocondriale, e comprende i seguenti enzimi:

- un trasportatore di carnitina presente sulla membrana plasmatica che mantiene la fornitura intracellulare di carnitina;
- un trasportatore esterno della membrana mitocondriale carnitina palmitoiltransferasi I (CPT1) che esterifica gli acidi grassi in acilcarnitine;
- il trasferimento trans membrana delle acilcarnitine mediato dalla carnitina / acilcarnitina traslocasi e la riesterificazione delle acilcarnitine per formare gli esteri di acil-CoA mediante CPT II nella matrice mitocondriale (Fig.2).



(Fig.2 Il ciclo della Carnitina: trasporto degli acidi grassi a catena lunga nella matrice mitocondriale)

Si ritiene che gli acidi grassi < 8 atomi di carbonio di lunghezza attraversano la membrana mitocondriale, come acidi grassi liberi senza la necessità di esterificazione da parte della carnitina, e quindi vengono attivati per formare acil-CoA esteri all'interno della matrice dalla acil-CoA catena media sintetasi.

Attività della Carnitina palmitoiltrasferasi (CPT1 e CPT2)

I CPT1 è incorporato nella membrana esterna mitocondriale. Nel fegato, è inibito da malonil-CoA, fornendo in tal modo il sito per la regolazione della ossidazione degli acidi grassi e della chetogenesi. Al contrario, CPT2 si trova sulla membrana mitocondriale interna e non è influenzato da malonil-CoA.

Carnitina / acilcarnitina traslocasi

Questo enzima facilita lo scambio di carnitina e di acilcarnitine attraverso tutta la membrana mitocondriale, facilita anche il trasporto unidirezionale sia della carnitina libera sia della acilcarnitina attraverso la membrana in modo che le concentrazioni di carnitina siano le stesse sia nella matrice citosolica sia in quella mitocondriale.

La Carnitina / acilcarnitina traslocasi è stata isolata nei mitocondri del fegato di ratto [29 Indiveri C, et al., 1990] ed ha una più alta affinità per le acilcarnitine a 12 – ed a 16- atomi di carbonio, ha invece una minore affinità per acilcarnitine a catena corta, e poco od alcuna affinità per carnitina libera [30 Indiveri C, et al., 1991].

Ciclo della beta-ossidazione e trasferimento degli elettroni

E' l'estere acil-CoA che entra nel ciclo della β -ossidazione mitocondriale. Con ogni ciclo della β -ossidazione, la lunghezza di una catena satura di acil-CoA è ridotta di due atomi di carbonio e viene rilasciata come acetil-CoA. Nella maggior parte dei tessuti, come i muscoli e il cuore, l'acetil-CoA è completamente ossidato in acidi tricarbossilici (TCA), in ultima analisi ad anidride carbonica e acqua. Nel fegato, e ad in misura molto minore nel rene, l'acetil-CoA prodotto dalla β -ossidazione è in gran parte convertito in corpi chetonici: β -idrossibutirrato e acetoacetato attraverso il ciclo della chetogenesi. Questi vengono poi trasportati per l'ossidazione finale da altri tessuti come il cervello e i muscoli.

Le acilcarnitine subiscono un ciclo della β -ossidazione tutte le volte fino a quando è possibile generare frammenti di acetil-CoA a due atomi di carbonio, ad esempio, il palmitoil (C16)-CoA subisce sette cicli della β -ossidazione.

Ogni ciclo della β -ossidazione è mediata da una sequenza di enzimi, che mostrano un certo grado di specificità per la lunghezza della catena degli acil-CoA. Per una tipica saturazione di una acil-CoA, come il palmitoil-CoA, la sequenza è di quattro fasi enzima (a) acil-CoA deidrogenasi, (b) 2-enoyl-CoA idratasi, (c) L-3-idrossiacil-CoA deidrogenasi, e (d) 3-ketoacyl-CoA (o 3-oxoacyl-CoA) thiolase.

Infine l'idrogeno prodotto dalla deidrogenasi viene trasferito nella catena respiratoria tramite una flavo proteina portatrice di elettroni contenente FAD (EFT) ed il coenzima EFT-Q-ossidoreduttasi, sul coenzima Q10.

L'acetil CoA risultante dal ciclo della β -ossidazione funge da substrato per la sintesi epatica di acetoacetato, del β -idrossibutirrato e dell'acetone nella formazione di corpi chetonici, utilizzati soprattutto durante il digiuno od in casi di deficit d'insulina dal

tessuto extraepatico (muscoli, cervello) come fonte energetica [63 Zschockej., Hoffman GF: Vademecum Metabolicum, 2005].

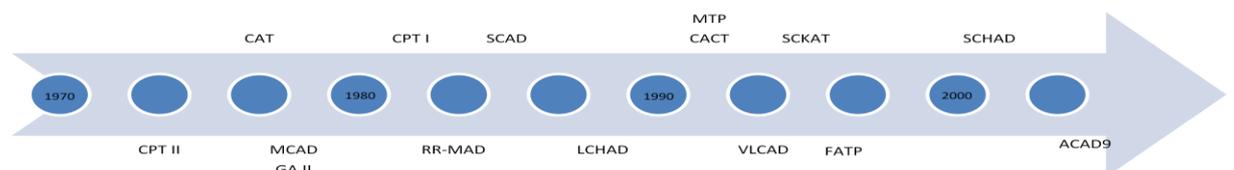
Il primo enzima del ciclo della β -ossidazione è associato alla membrana ed è l'*acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD)*, la reazione successiva viene catalizzata dalla *proteina trifunzionale mitocondriale (MTP)* che è un complesso multi enzimatico contenente quattro subunità di *LCHAD α* , che ha due domini: *3-idrossiacil-CoA deidrogenasi a catena lunga* ed *enoil-CoA idratasi a catena lunga*, e quattro subunità β , contenente il dominio *3-chetoacil-CoA tiolasi a catena lunga (LCHAD β)*. L'ossidazione dell'estere acilCoA a catena lunga è operata da questo complesso enzimatico associato alla membrana. Gli acilCoA lunghi 12-14 atomi di carbonio sono incanalati nella sezione ciclica localizzata nella matrice. Tale sezione consiste di diverse acil-CoA deidrogenasi: *acil-CoA deidrogenasi a catena lunga (LCAD)* *acil-CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)* e *acil-CoA deidrogenasi a catena corta (SCAD)* come anche *enoilidratasi (EH)* *3-idrossiacil CoA deidrogenasi (HAD)* e *3-chetoacil-CoA tiolasi*. Il prodotto finale, l'acilCoA, è mandato nel ciclo di Krebs. Gli equivalenti riducenti necessari per l'ossidazione del 3-idrossiacil-CoA sono presi dal NAD⁺ che viene ridotto a NADH e riossidato dal I complesso della catena respiratoria. Altrettanto, gli equivalenti riducenti per il processo di deidrogenazione convertono FAD, il coenzima dell'acil-CoA deidrogenasi, in FADH₂. Il FADH₂ è riossidato dal *trasportatore elettronico flavo proteina deidrogenasi (ETF_{FDH})*, che è all'interno della membrana mitocondriale. Alla fine gli equivalenti sono trasferiti da ETF_{FDH} per mezzo del coenzima Q al complesso III della catena respiratoria.

1.4 Malattie metaboliche ereditarie

Le malattie metaboliche ereditarie, che complessivamente colpiscono 1 neonato ogni 500 nati, rappresentano una difficile sfida nella pratica clinica del medico e del pediatra. Spesso queste patologie si presentano con eventi acuti, crisi potenzialmente mortali che richiedono un intervento di urgenza. Il decorso clinico e la prognosi dei bambini affetti da tali malattie possono dipendere da un trattamento precoce ed efficace, ma la grande varietà sia clinica che biochimica di difetti genetici rende difficile familiarizzare con le strategie diagnostiche e terapeutiche.

1.4.1 Difetti dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi.

I difetti della β -ossidazione degli acidi grassi, malattie ereditarie a trasmissione autosomica recessiva, sono conosciuti sin dal 1970 e alla lista dei disordini conosciuti ogni decade si sono aggiunti circa quattro nuovi deficit fino alla scoperta più recente del 2007 del deficit del membro 9 della famiglia acil-CoA deidrogenasi [24 Gregersen N, et al.; 2008] (Figura 3).



(Fig.3: Discovery rate dei difetti mitocondriali degli acidi grassi)

1.4.1.1 Deficit del trasportatore della carnitina (CUD)

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva

Incidenza: <1:100000

Gene: SLC22A5 5q31.2-32

Mutazioni più frequenti: Non conosciute

OMIM: 212140; 603377

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: Due forme; una precoce ad insorgenza tra i 3 ed i 30 mesi, una più tardiva con insorgenza tra 1-7 anni.

SINTOMI: Presentazione molto variabile. Il 50 % sviluppa attacchi multipli di encefalopatia acuta, con vomito, confusione e stupore fino al coma che si possono avere dalla nascita fino ai 30 anni. I neonati possono avere ipoglicemia ipochetonica, iperammonemia, alcuni possono mostrare cardiomiopatia dilatativa e debolezza muscolare. Morte infantile inaspettata. L'altro 50% possono avere tra 1-7 anni una cardiomiopatia dilatativa senza ipoglicemia [7 Bonnet D;1999]. Molti pazienti hanno anemia non responsiva alla terapia marziale. Altri possono avere epatopatia con steatosi ed accumulo di grassi nei muscoli [4 Angelini C;1987].

SEGNI FISICI: Nessun dismorfismo caratteristico

TRATTAMENTO: L'integrazione alimentare con carnitina è un trattamento curativo e salvavita.

Il trattamento, con carnitina e una dieta al fine di evitare il digiuno prolungato, scongiura gli episodi di ipoglicemia e dopo molti mesi risolve l'epatomegalia [36 Levitan MD;1987] [34 Lamhonwah AM; 2002].

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: I pazienti sviluppano attacchi di encefalopatia acuta con vomito, confusione e stupore progressivo fino al coma.

Alcuni pazienti, senza segni evidenti di ipoglicemia, hanno avuto un ritardo di sviluppo. La cardiomiopatia è progressiva e se non trattata porta a morte. D'altra parte se i pazienti non subiscono eventi stressanti rimangono asintomatici.

PROFILO MS/MS: Profilo acilcarnitine: Tutte molto basse

1.4.1.2 Deficit di CPT1

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva

Incidenza: <1:100000 (sono stati riportati 50 casi)

Gene: CPT 1A- 11q13.1-13.5

Mutazioni più frequenti: P479L etnia Inuit, Alaska.

OMIM: #255120; *600528

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: Di solito i sintomi insorgono tra i 8-18 mesi ma è stato descritto anche qualche caso di insorgenza nelle prime settimane di vita.

SINTOMI: Il deficit di carnitina-palmitoil transferasi 1A (CPT-1A) è un difetto congenito del metabolismo che interessa l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a catena lunga (LCFA) nel fegato e nei reni. È caratterizzato da attacchi ricorrenti di ipoglicemia ipochetonica da digiuno e dal rischio di insufficienza epatica. Esordisce tra la nascita e i 18 mesi di vita, con attacchi ricorrenti di ipoglicemia ipochetonica di gravità variabile, causati da digiuno o una malattia concomitante, che possono provocare gravi complicazioni neurologiche. I pazienti possono presentare anche encefalopatia epatica con perdita di coscienza, epilessia e andare incontro a coma o persino morte improvvisa. È possibile che la malattia evolva in insufficienza epatica. I pazienti possono sviluppare anche acidosi tubulare renale. Questo deficit è dovuto alle mutazioni nel gene CPT1A, che codifica per l'isoforma epatica dell'enzima CPT1, localizzato all'interno della membrana mitocondriale esterna, che ha la funzione di coniugare gli LCFA in carnitina. Questo permette il trasferimento degli LCFA dal citosol ai mitocondri, in cui avviene la loro ossidazione. L'enzima CPT1 ha 3 isoforme con espressione tessuto-specifica, codificate da diversi

geni: l'isoforma L, espressa nel fegato e nei reni, codificata dal gene CPT1A (11q13); l'isoforma M, sintetizzata nello scheletro e nel muscolo cardiaco, dal gene CPT1B (22qter); l'isoforma, espressa nel cervello, dal gene CPT1C (19q13). Non sono stati descritti casi clinici correlati al deficit delle isoforme muscolare o cerebrale. È stata descritta una variante genetica di CPT1A (P479L), molto comune in Alaska, che causa un'alterazione della proteina, nell'etnia Inuit della Groenlandia, e in alcuni Nativi Americani del Canada. Non è stata ancora stabilita la sua rilevanza e non è certo che si associ a una malattia grave. In un caso, un paziente adulto omozigote per la variante P479L presentava sintomi muscolari (crampi), anche se l'associazione con la variante appare poco probabile. Durante le crisi metaboliche, le analisi del sangue rivelano ipoglicemia, aumento dei livelli di carnitina e delle transaminasi epatiche nel plasma e lieve iperammoniemia. Le analisi delle urine mostrano diminuzione patologica dei livelli dei chetoni e aciduria dicarbossilica a catena media. Nei periodi di remissione e benessere, i livelli di carnitina libera e totale possono rimanere elevati, mentre gli altri test metabolici sono normali. La diagnosi è confermata dai test molecolari e dall'evidenza di un deficit dell'enzima CPT-1A (riduzione del 5-20% dell'attività normale di CPT1) nel fegato, nei linfociti o nelle colture di fibroblasti. La diagnosi differenziale si pone con i difetti degli acidi grassi e della chetogenesi, come il deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena media (MCAD), gli altri difetti dell'ossidazione degli acidi grassi a catena lunga, come il deficit di carnitina-palmitoil transferasi (CPT) 2, e la sindrome di Reye. È necessario un monitoraggio regolare degli enzimi epatici e della funzionalità del fegato. In presenza di un trattamento adeguato, la prognosi è buona e può essere evitato il danno neurologico da ipoglicemia ricorrente [40 M. Bennett, C. Stanley;2011].

SEGNI FISICI: Nessun dismorfismo caratteristico. Frequenti i deficit neurologici.

TRATTAMENTO: Evitare il digiuno. Supplemento di acidi grassi a catena media (MCT) ed evitare l'assunzione attraverso la dieta di acidi grassi a catena lunga.

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: La gran parte dei pazienti è sopravvissuta all'infanzia ed agli attacchi di ipoglicemia. Molti hanno subito danni neurologici permanenti. I casi deceduti si sono verificati in seguito agli attacchi ipoglicemici [32 Kerner J;1998].

PROFILO MS/MS: C0 (carnitina libera)- elevata/normale
C16 - C18:1- bassi
C0/C16 ratio- molto elevato
C0/C18 ratio- molto elevato

1.4.1.3 Deficit di CPT2

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva

Incidenza: <1:100000

Gene: CPT2 gene-1q32

Mutazioni più frequenti: La forma ad esordio in età adulta è associata nel 60% dei casi con la mutazione S113L. Le altre forme non hanno mutazioni frequenti.

OMIM: *600650; #255110

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: Nella forma classica l'esordio è di solito tra i 15 ed i 30 anni. Le altre forme hanno esordio durante il periodo neonatale o nella prima infanzia.

SINTOMI: Il deficit di carnitina-palmitoil transferasi 2 (CPT 2) è una malattia ereditaria del metabolismo che colpisce l'ossidazione

mitocondriale degli acidi grassi a catena lunga (LCFA). Sono state descritte tre forme di deficit di CPT 2: una forma miopatica, una forma infantile grave e una forma neonatale. Sono stati descritti oltre 300 casi della forma miopatica, che è quella più comune (86% dei pazienti; forma infantile grave 8%; forma neonatale 6%). La forma miopatica è la meno grave ed è caratterizzata da attacchi ricorrenti di rhabdmiolisi, dolore muscolare e debolezza, scatenati dall'esercizio fisico prolungato, dall'intolleranza al digiuno, da malattie virali o dalle temperature estreme. La forma infantile grave è caratterizzata da grave intolleranza al digiuno, che esita in alterazioni metaboliche, come l'ipoglicemia ipochetonica e l'encefalopatia epatica. La forma neonatale letale presenta i sintomi della forma infantile associati ad alcuni dismorfismi (ad es. displasia cistica renale). Il deficit di CPT 2 è causato da oltre 60 mutazioni diverse del gene CPT2, consistenti per lo più in sostituzioni aminoacidiche o piccole delezioni. La trasmissione è autosomica recessiva. La diagnosi viene posta inizialmente con la spettrometria in tandem massa delle acilcarnitine sieriche/plasmatiche, seguita dall'analisi delle mutazioni e dalla misurazione dell'attività dell'enzima CPT2 sui linfociti circolanti freschi, sul muscolo o sui fibroblasti. La diagnosi differenziale della forma miopatica si pone soprattutto con la malattia di McArdle, la distrofia muscolare di Duchenne, il deficit di citocromo C ossidasi (si vedano questi termini), il deficit di carnitina-acilcarnitina traslocasi (CACT) e il deficit dell'acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga (si vedano questi termini) per le forme neonatali e infantili. La diagnosi prenatale è possibile mediante una combinazione di test enzimatici e molecolari. Il trattamento mira ad evitare digiuni prolungati (>12 ore) e a mantenere una dieta povera in grassi e ricca in carboidrati. La forma miopatica del deficit di CPT 2 ha una buona prognosi. La forma infantile grave può portare a morte prematura durante la prima infanzia, di solito per aritmie cardiache parossistiche. La forma neonatale è spesso letale nei primi mesi di vita [39 M. Bennett, C. Stanley; Aprile 2010].

SEGNI FISICI: Lievi dismorfismi facciali. Nella forma neonatale è presente displasia renale.

TRATTAMENTO: Evitare il digiuno. Dieta ad alto contenuto di carboidrati ed a basso contenuto di grassi. MCT per fornire gli acidi grassi a catena media. L'integrazione con carnitina è controversa perché può aumentare gli acidi grassi a catena lunga e provocare aritmie [32 Kerner J:1998].

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: Nella forma classica/adulta la mioglobinuria può portare ad insufficienza renale. La morte può sopraggiungere nelle forme giovanili durante gli episodi di ipoglicemia ipochetonica, evento comune nelle forme infantili.

PROFILO MS/MS: C0 (carnitina libera)- bassa
C16 (palmitoyl carnitina) - elevata
C18:1 (linoleoyl carnitina) - elevata
C16/C2 o C18/C2 - elevata

1.4.1.4 Deficit di MCAD

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva
Incidenza:1:12000
Gene: ACADM 1p31
Mutazioni più frequenti: c.985A>G (K304E),
nell'80% dei casi descritti
OMIM: #201450; *607008

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: Tipicamente la malattia si manifesta tra i 3-24 mesi. Le manifestazioni cliniche sono variabili anche nella stessa famiglia e

persino con le stesse mutazioni. Il deficit di ACADM può essere causa del 3% delle morti improvvise infantili.

SINTOMI: Il deficit di MCAD è caratterizzato da intolleranza al digiuno prolungato durante il quale si sviluppano ipoglicemia o deficit di energia dovute al rapido esaurimento dei depositi di glicogeno; ricorrenti episodi di coma ipoglicemico; aciduria dicarbossilica a catena media; chetogenesi compromessa e bassi livelli di carnitina in plasma e tessuti. Il disturbo può essere grave, e anche fatale, nei pazienti giovani [43 Matsubara, Y., et al.;1986]. La miglior terapia risulta essere l'apporto di glucosio, in caso esso non sia assunto tramite la dieta, e l'evitare un digiuno prolungato. Il 50% dei piccoli pazienti muore durante il primo episodio [8 Brackett JC;1994]; quelli che sopravvivono possono subire gravi ritardi nello sviluppo, debolezza muscolare e paralisi cerebrale.

SEGNI FISICI: Nessun dimorfismo caratteristico.

TRATTAMENTO: Il trattamento è semplice ed efficace: evitare il digiuno oltre le quattro ore se in periodo neonatale o 12 ore per i bambini. E' d'obbligo l'integrazione con Glucosio e l'idratazione nei periodi di malattia. Non è provato che l'integrazione con Carnitina produce benefici ma diversi autori ne consigliano l'uso alla dose di 100mg/Kg/die per facilitare l'eliminazione di cataboliti tossici [45 Morris AAM; 2000].

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: Il 50% dei piccoli pazienti muore durante il primo episodio; quelli che sopravvivono possono subire gravi ritardi nello sviluppo, debolezza muscolare e paralisi cerebrale.

PROFILO MS/MS: C6 (hexanoyl carnitina)- elevato
C8 (octanoyl carnitina)- elevato
C10 (decanoyl carnitina)- elevato
C10:1 (decenoyl carnitine)- elevato
C8/C10 ratio >3

1.4.1.5 Deficit di LCHAD α , di LCHAD β e della Proteina Trifunzionale

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva

Incidenza: 1:75000

Gene: HADHA e HADHB sono localizzati su 2q23; Fanno parte della *proteina trifunzionale*.

Mutazioni più frequente: LCHAD α 1528G>Q (E510Q) il 56% dei pazienti con deficit di LCHAD α è portatore della mutazione prevalente.

OMIM: *600890 LCHAD; *143450 TFP

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: La malattia ha un ampio range di presentazione, dal periodo neonatale a diversi anni di età, il 15% ha presentazione neonatale e l'età media di insorgenza è di 6 mesi.

SINTOMI: Tali deficit hanno manifestazioni cliniche variabili, che si possono presentare nel neonato o nel bambino con la morte improvvisa, epatopatia (malattia Reyes), ipoglicemia ipochetotica, rabdomiolisi, miopatia, cardiomiopatia e con complicanze tardive, come la neuropatia periferica, retinopatia pigmentosa, la degenerazione della retina e la progressiva perdita visiva.

Al deficit di LCHAD α nel feto possono essere associati a gravi malattie nella madre come l' AFLP (fegato grasso acuto da gravidanza), ipertensione, emolisi, aumento degli enzimi epatici,

sindrome HELLP (sindrome da piastrine basse) La sindrome AFLP è caratterizzata da anoressia, nausea, vomito, dolori addominali e ittero nel terzo trimestre. Insufficienza epatica fulminante e può verificarsi la morte. La sindrome HELLP è più comune. In entrambe le sindromi, si verifica infiltrazione microvescicolare grassa del fegato materno [61 Wilcken, B. et al 1993][56 Treem W. R. et al; 2006].

SEGNI FISICI: Cardiomiopatia, retinopatia pigmentosa.

TRATTAMENTO: Per i neonati le poppate devono essere frequenti. Evitare lunghi periodi di digiuno, instaurare una dieta ricca in carboidrati ed a bassissimo contenuto di acidi grassi a lunga catena. Supplementazione con acidi grassi a catena media (MCT), carnitina e complessi vitaminici. L'acido docosaesaenoico sembra prevenire la degenerazione retinica [23 Gillingham MB, et al.; 2003].

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: Il 50% dei piccoli pazienti muore durante il primo episodio; non è evidenziabile una buona correlazione tra attività enzimatica e la gravità del fenotipo. La malattia può avere sia un andamento remittente/recidivante un andamento cronico. Anche se instaurata una terapia dietetica il 30% dei pazienti presenta episodi di decompensazione [5 Bartlett K; 2004].

PROFILO MS/MS: C16-OH (3-hydroxypalmitoyl carnitina)- elevato
C14:1-OH; C16; C18:1-OH or C18:1- possono
anche essere elevate

1.4.1.6 Deficit VLCAD

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva

Incidenza: >1:75000

Gene: ACADVL, VLCAD 17p11.2-p11.1

Mutazioni più frequenti: Non conosciute

OMIM: *201475

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: Variabile dal periodo neonatale all'età adulta, dipende dal fenotipo.

SINTOMI: il deficit di acil-CoA deidrogenasi (VLCAD) è un difetto congenito dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a catena molto lunga, trasmesso con modalità autosomica recessiva. La VLCAD è un enzima elettrone-trasferasi-flavoproteina (ETF)-dipendente, localizzato nella matrice interna mitocondriale. La forma grave della malattia è caratterizzata da episodi ricorrenti di ipoglicemia ipochetotica, spesso associata a cardiomiopatia ipertrofica con versamento pericardico o aritmia, che possono portare ad arresto cardio-respiratorio.

Durante la tarda infanzia e la maturità, la malattia si può presentare come intolleranza all'esercizio fisico, dolore muscolare, episodi ricorrenti di rabdomiolisi scatenata dal digiuno, raffreddore, febbre o esercizio prolungato [9 C.Vianey;2004].

SEGNI FISICI: Nessun dismorfismo caratteristico.

TRATTAMENTO: Si basa essenzialmente su di una dieta ad alto contenuto di carboidrati e ad un basso tenore di grassi con supplemento di acidi grassi a catena media (MCT). Va evitato il digiuno e sconsigliata la pratica di esercizi fisici prolungati. L'uso della Carnitina è controverso[45 Morris AAM;2000].

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: I pazienti che hanno la forma infantile della malattia, generalmente muoiono durante il primo anno di vita. I pazienti che hanno una forma infantile con coinvolgimento epatico sono destinati a morte se non trattati. Le forme adulte possono sfociare in insufficienza renale se la mioglobinuria non viene prevenuta.

PROFILO MS/MS: C14:1 (tetradecenoyl carnitina)- elevato
C14:1/C12:1 ratio >3

1.4.1.7 Deficit SCAD

INFORMAZIONI GENETICHE: Eredità: autosomica recessiva

Incidenza: tra 1:40000 e 1:100000

Gene: SCAD 12q22

Mutazioni più frequenti: Due mutazioni di suscettibilità alla malattia sono conosciute: G625A e C511T presenti nel 14% della popolazione normale. Il 69% dei pazienti affetti da aciduria etilmalonica sono omozigoti o eterozigoti composti per una di queste mutazioni.

OMIM: *606885; #201470

SEGNI, SINTOMI E TRATTAMENTO DELLA MALATTIA

ESORDIO: Al momento sono pochi i pazienti illustrati per questa malattia. La maggior parte è diventata sintomatica tra la prima settimana ed i primi 3 mesi di vita.

SINTOMI: Il deficit di acil-CoA deidrogenasi (SCAD) è una malattia ereditaria dell'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a catena corta. Attualmente sono stati identificati pochi pazienti. Lo SCAD è un enzima ETF-dipendente (flavoproteina trasportatrice di

elettroni), localizzato nella matrice mitocondriale interna. La malattia si può manifestare nelle prime settimane di vita con disturbi del tono muscolare, ipoglicemia o vomito. In molti casi l'espressione clinica è più tardiva e poco specifica: ipotonia, ritardo psicomotorio. Solo la valutazione dei parametri biochimici permette di sospettare la diagnosi: aumento dell'escrezione urinaria di acido etilmalonico e, occasionalmente, anche dell'acido metilsuccinico e della butirrilglicina. Spesso si riscontra un aumento della butirril-carnitina plasmatica. La diagnosi si basa sull'evidenza del deficit enzimatico, preferibilmente su biopsia muscolare. La diagnosi può essere anche confermata dallo studio molecolare del gene. Le anomalie genetiche comprendono molte delezioni e due mutazioni specifiche (625G>A e 511C>T) osservate frequentemente nella popolazione generale. Perciò, sembra che altri fattori genetici ambientali, al momento ancora sconosciuti, potrebbero svolgere un ruolo nei pazienti che mostrano i segni clinici della malattia [9 C.Vianey; 2004].

SEGNI FISICI: Nessun dismorfismo caratteristico.

TRATTAMENTO: Trattamento di supporto per i sintomi. Dieta a basso contenuto di grassi e supplemento di Carnitina e riboflavina hanno migliorato l'ipotonia ed il ritardo psicomotorio [33 Koeberl DD; 2004].

STORIA NATURALE SENZA TRATTAMENTO: E' molto variabile; dalla morte in età neonatale a soggetti che non sviluppano alcun sintomo. Alcuni pazienti con esordio precoce hanno recuperato completamente lo sviluppo psico-fisico. Non ci sono follow-up per dire quale evoluzione può avere a lungo termine.

PROFILO MS/MS: C4 (butyryl/ isobutyryl carnitina) - elevato

2. SCOPO DELLA TESI

Questa tesi di dottorato di ricerca si propone come obiettivi principali quelli di elaborare algoritmi diagnostici, messa a punto dei metodi di conferma molecolare e valutare la correlazione genotipo/fenotipo delle malattie della β -Ossidazione nell'ambito dello screening neonatale allargato.

- **Messa a punto di algoritmi diagnostici** per partecipare con la Società Italiana per lo studio delle **Malattie Metaboliche Ereditarie** e lo **Screening Neonatale (SIMMESN)** alla definizione di standard per i test di screening e di conferma, al fine di uniformare e aumentare l'efficacia del sistema screening neonatale allargato e per porre le basi di una elaborazione comune dello screening stesso.

In particolare ci si è soffermati sulla messa a punto e la validazione dei test di conferma genetici nell'ambito di un programma di screening neonatale esteso.

- **I test di conferma**, nel contesto di un programma di screening, qualsiasi esso sia, sono fondamentali ed ineliminabili in quanto permettono, nei casi risultati positivi allo screening, la distinzione tra i veri e i falsi positivi cosa che fa di essi uno strumento necessario per la conferma diagnostica; cosa ancor più vera se si considera che le malattie prese in esame in questo lavoro sono malattie rare di cui si sa poco o nulla sull'outcome se trattate presintomaticamente. E' necessario considerare che la diagnosi viene fatta dal centro clinico in bambini che (nella maggior parte dei casi) non hanno alcun segno clinico della malattia, sulla base di risultati di test di laboratorio. Tutto ciò ha anche un impatto emotivo considerevole nelle famiglie che vengono convocate per sottoporre il piccolo paziente alla serie di analisi e visite per arrivare alla diagnosi definitiva di malattia. E' evidente, in questo contesto, come avere degli algoritmi diagnostici efficaci e condivisi a livello nazionale ed internazionale rende l'intervento dello screening neonatale più efficace e probabilmente più accettato dalle famiglie.

L'analisi dei metaboliti mediante spettrometria di massa tandem è il metodo utilizzato per lo screening neonatale "esteso", definito così perché permette la diagnosi di molte malattie metaboliche con un unico test. Attraverso la spettrometria di massa

tandem si possono valutare i valori di singoli metaboliti, o “profili” metabolici di amminoacidi ed acilcarnitine.

Questo sistema di screening è impostato in modo tale da avere il massimo di sensibilità che si traduce in una tendenza ad azzerare il numero di falsi negativi. Tuttavia, quando si tende ad aumentare la sensibilità si penalizza la specificità ed è in questa ottica che va collocato il test di conferma genetico poiché esso permette di confermare i veri positivi.

Generalmente i test di conferma devono essere eseguiti con una metodica che utilizza principi analitici diversi da quelli del test di screening, a tal proposito l'analisi del DNA rappresenta uno strumento adeguato per la conferma di una diagnosi giacché è il più specifico tra i test di laboratorio. Nonostante le analisi molecolari del DNA risultino, rispetto ad altri metodi utilizzati nello screening neonatale, delle metodologie ancora piuttosto costose (anche se negli ultimi tempi il costo si sta notevolmente riducendo grazie alla diffusione di nuove tecnologie) esse rappresentano gli unici test di conferma in grado di garantire una affidabilità di diagnosi estremamente elevata.

Come per gli altri test di laboratorio, anche i test molecolari possono essere inseriti in un percorso tecnico/assistenziale solo quando ne è stata dimostrata la loro reale utilità. E' quindi necessario definire gli elementi di qualità di un test genetico derivanti dalla valutazione degli aspetti tecnici dell'esame. Tale valutazione deve necessariamente tener conto della complessità dei test genetici che è in genere maggiore degli altri test di laboratorio. Quindi si è valutato, nell'ambito della Tesi, la validità analitica e clinica dei test, tramite la determinazione di: precisione, accuratezza, sensibilità e specificità del test preso in esame.

Il problema che ci aspettavamo di dover affrontare è stato quello di far emergere una variabilità allelica corrispondente alla variabilità fenotipica; abbiamo quindi avuto la necessità di iniziare a valutare la correlazione genotipo/fenotipo delle patologie studiate e di raccoglierne i risultati così da avere, nel tempo, dati sufficienti per effettuare una predizione del fenotipo atteso.

Inoltre, come previsto, sono state identificate molte nuove mutazioni di cui non si conosce l'effetto patogenetico, ed è stato necessario organizzare un algoritmo di validazione bioinformatica per predire la patogenicità. Inoltre durante l'iter diagnostico, così come avevamo già notato in un precedente lavoro per i pazienti PKU [10 Calì F.;2010], si identificano alcuni pazienti con una sola mutazione ma con un forte sospetto

clinico/metabolico di malattia dovuto ad un problema di sensibilità del sequenziamento genico nell'identificazione di delezioni di esoni ed è stato necessario mettere a punto una tecnica molecolare per l'identificazione di questo tipo di mutazioni.

Infine un ultimo problema che abbiamo affrontato è stato quello dell'identificazione di delezioni esoniche. Infatti il sequenziamento genico non è in grado di identificare questo tipo di mutazioni negli eterozigoti composti a causa di un "mascheramento" provocato dall'allele WT; per ovviare a questo problema ed aumentare la sensibilità dei test molecolari, generalmente, si utilizza il Kit MLPA (MRC-Holland) per identificare la presenza di queste mutazioni nei pazienti con forte sospetto di malattia ma con l'identificazione di una sola mutazione. Purtroppo per i geni coinvolti nella patogenesi delle malattie della β -ossidazione non esiste un Kit commerciale di MLPA, quindi abbiamo messo a punto un test molecolare basato sull'utilizzo della Real Time PCR con studio semiquantitativo per la loro identificazione.

- Follow-up e consulenza genetica per le famiglie a rischio. I pazienti positivi allo screening neonatale sono seguiti dai centri clinici di riferimento: Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile - Università "Sapienza" di Roma (Prof. Vincenzo Leuzzi), Unità Malattie Metaboliche OPBG (Dr. Carlo Dionisi).

Questo ci ha permesso di avere una esperienza nell'evoluzione delle malattie della β -ossidazione in terapia presintomatica, nella correlazione genotipo/fenotipo e di migliorare, ove richiesto, la gestione dei piccoli pazienti e delle famiglie; infatti, dal momento che, le malattie della β -ossidazione hanno età di esordio e gravità variabili può essere difficile per la famiglia far fronte a questa realtà e contemporaneamente mettere in atto tutti gli interventi terapeutici e riabilitativi che possono essere utili. Il centro di riferimento, deve essere in grado di mettersi a disposizione per fornire informazioni complete anche successivamente alla comunicazione della diagnosi, dare un supporto emotivo alla famiglia, dare un aiuto dal punto di vista decisionale-organizzativo e coordinare i vari servizi terapeutici anche pensando che lo screening neonatale allargato si avvale di una conoscenza multidisciplinare per essere effettivamente utile.

Durante le varie fasi dello screening neonatale allargato si producono una notevole quantità di dati biochimici, genomici e clinici delle malattie delle β -Ossidazione che permettono di avere una visione "Trasversale" del "Sistema Malattia" per ogni singola condizione e per ogni singolo paziente.

Sommario dei punti considerati fondamentali nell'ambito di questo studio:

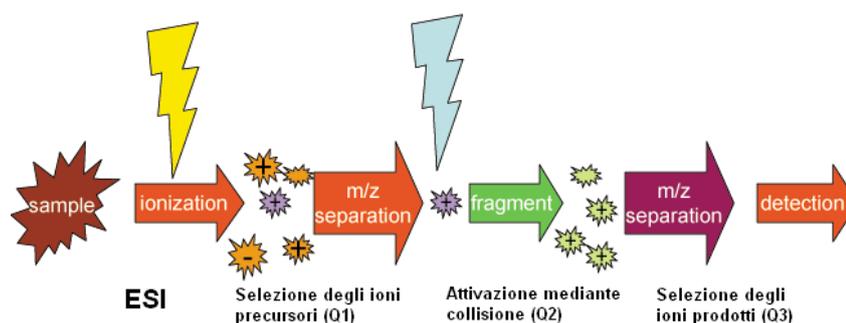
- Accrescere le nostre conoscenze dei meccanismi fisiopatologici di queste malattie e della loro evoluzione in pazienti in terapia presintomatica.
- Studi di Correlazione genotipo/fenotipo, così da poter identificare le mutazioni più "gravi" e suddividere la popolazione malata in pazienti affetti da varianti classiche/gravi della malattia e da varianti mild/lievi.
- Valutare la patogenicità delle eventuali nuove mutazioni identificate durante lo screening neonatale utilizzando tools Bioinformatici.
- Messa a punto di un test "Home Made" per l'identificazione di delezione esoniche nelle malattie della β -ossidazione, allo scopo di aumentare la sensibilità diagnostica del test molecolare

3. MATERIALI E METODI

3.1 Spettrometria di massa in tandem (ESI-MS/MS)

La spettrometria di massa viene utilizzata per la misurazione e la valutazione delle concentrazioni delle acilcarnitine in campioni di sangue neonatale prelevati dal tallone ed essiccati su carta da filtro. L'analisi quantitativa delle acilcarnitine viene utilizzata allo scopo di fornire profili delle concentrazioni di analiti utili allo screening neonatale per il riscontro delle alterazioni metaboliche causate dal deficit di alcuni enzimi. La misurazione delle acilcarnitine comporta l'estrazione, dagli spot di sangue essiccati, mediante una soluzione contenente standard interni marcati con isotopi stabili (deuterio) e analizzati mediante triplo quadrupolo (Figura 4). La risposta di ciascun analita, relativa al rispettivo standard interno, stabile e marcato con deuterio, è proporzionale alla concentrazione dell'analita. Con il kit utilizzato (NeoGram Amono Acids and Acylcarnitines) i dati vengono acquisiti grazie alla perdita neutra dello ione con valore m/z pari a 85. Durante la scansione la misurazione del prodotto di ciascun analita, generato tramite collisione, viene eseguita per un determinato periodo di tempo. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati viene eseguita mediante il software NeoGram.

Il sistema per la spettrometria di massa utilizzato prevede, come tecnica di ionizzazione del campione, l'elettrospray (Electro Spray Ionisation).



(Fig.4: Principio di funzionamento dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo)

3.2 Analisi in FIA-ESI-MS/MS

L'utilizzazione del metodo FIA (Flow Injection Analysis) prevede che il campione, dopo adeguata preparazione, venga iniettato direttamente senza una preliminare separazione cromatografica e trasportato nella sorgente di ioni da un solvente organico utilizzato come fase mobile. Il vantaggio di questa modalità è quello di ottenere un metodo analitico rapido ed utilizzabile su larga scala. Lo

strumento utilizzato in tutte le analisi è uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Perkin Elmer API 2000 con interfaccia TurboIonSpray, affiancato da autocampionatore e micropompe PE 200.

3.3 Definizione dei valori di cut-off

Attraverso l'analisi FIA-ESI-MS/MS si sono state definite anche le concentrazioni di riferimento dei campioni di neonati analizzati. I valori di riferimento e i cut-off degli analiti sono stati definiti attraverso la media, deviazione standard e percentili. Per tener conto del fatto che la distribuzione delle concentrazioni non sempre è di tipo gaussiano la gran parte dei valori di cut-off è stata fissata al 99,8° percentile, della distribuzione. Il 99,8° percentile delimita il 99,8% dei dati dal resto della distribuzione. Per determinare i valori di riferimento sono stati analizzati 26907 spot di sangue

3.4 Estrazione acidi nucleici

Si effettua un prelievo di sangue venoso di 5-10 ml in EDTA. I campioni devono essere conservati a 2-8°C o congelati.

L'estrazione degli acidi nucleici viene eseguita attraverso lo strumento QIASymphony SP (QIAGEN®), progettato per purificare in totale automazione gli acidi nucleici avvalendosi della tecnologia delle particelle magnetiche.

3.5 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

I Primer per l'amplificazione e per il sequenziamento sono stati creati con l'ausilio del software Primer3 (V. 0.4.0) ed analizzati con Primer Blast per escludere l'appaiamento con geni non specifici. Inoltre i primer sono stati studiati per escludere la presenza di SNPs nella loro sequenza.

I protocolli di amplificazione del DNA genomico tramite PCR eseguito nell'analisi degli esoni dei geni coinvolti nelle malattie della β -Ossidazione (MCAD, VLCAD, HADHA, HADHB, CUD, CPT1a, SCAD) sono i seguenti:

ACADM

Primer usati:

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato (bp)
1 for	5'CCCGTGTATTATTGTCCGAG ^{3'}	126
1 rev	5'TCCGACACCACAATACCCAT ^{3'}	
2 for	5'TCTCTTATCTGATTAATGTTTAAC ^{3'}	204
2 rev	5'CATATAAAGCTTCATATGTATAAG ^{3'}	
3 for	5'AGGACATTTTCCCTTGTTATC ^{3'}	193
3 rev	5'AATGTAAAAGATTTTCCCTCTT ^{3'}	
4 for	5'ATGTAATCAAACCTATCTGGATT ^{3'}	170
4 rev	5'CTCATATGCATTCCAGTATTA ^{3'}	
5 for	5'TGATGTACTACATATTACAATGT ^{3'}	202
5 rev	5'TAACTATCTCATTAAACAAGAGC ^{3'}	
6 for	5'TTACATATCCAATAAAAATGACTT ^{3'}	183
6 rev	5'TTTGTTCCCTTCTTAAGTGTG ^{3'}	
7 for	5'TAATCACTAACATTTAATTTTCATT ^{3'}	235
7 rev	5'AGATTTGAAGATAAAACAATTAAG ^{3'}	
8 for	5'GATATTATCACCATTATCCGG ^{3'}	188
8 rev	5'TAAAATAATATTTGGGGCCCTA ^{3'}	
9 for	5'AAAGCAAAAATTGATGCTGGC ^{3'}	253
9 rev	5'TAATGTAATAAATAAAAAGATCCTA ^{3'}	
10 for	5'TTTTAAAGATAACATGAATTTTG ^{3'}	201
10 rev	5'TATTAATGAAAATGAGTGTCTTT ^{3'}	
11 for	5'GTTTTCTCAATAAATATCCTTTAA ^{3'}	343
11 rev	5'ATGAATATTCTCTCTCCTTGC ^{3'}	
12 for	5'TGTACTAAAGATATTTAACCTAC ^{3'}	154
12 rev	5'GCTTGTGTTCTAGTTATTCAAT ^{3'}	

Condizioni PCR:

	Buffer10x	Dntp10mM	P1(20µM)	P2(20µM)	MgCl2	TAQ	H2O	DNA
Esoni 1-12	10µL	16µL	2µL	2µL	6µL	0.5µL	60.5µL	3µL

Condizione Amplificazione:

	T1Den	T den	T Ann	T ext	T final ext	N° cicli
EX 1-12	95°C x 10'	95°C x 1'	55°C x 1'	72°C x 1'	72°C x 7'	35

ACADVL

Primer usati:

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato (bp)
1 for	5' GCTGGGTCAGATCTCTAGCCAG 3'	335
1 rev	5' AAGGCTGCGGTGACTTACC 3'	
2 for	5' CGGAGAGATTCGGAGATGCAG 3'	212
2 rev	5' CGACTGAGCAGTAGGCAGGT 3'	
3 for	5' TCCCTTCCCTGAACTTGCTA 3'	205
3 rev	5' ACATTCCCACAGCAAAGGAC 3'	
4 for	5' CTTAGCCAGACCCAACCAGA 3'	151
4 rev	5' CCACCCAGCTCTGATTATCC 3'	
5 for	5' GTCCGGTAAGGGAAGGGATA 3'	206
5 rev	5' CATCTCCAAACACCTCACCA 3'	
6 for	5' GAGGTAAGGAATGACTCGG 3'	240
6 rev	5' AAGAGCTGAGTCTGCCAAGC 3'	
7 for	5' GTTGCCACACTCTCCTGTT 3'	237
7 rev	5' TAATCTGTGCCAAGCCCAGT 3'	
8 for	5' AGGGACTTTGAAGCTCATC 3'	216
8 rev	5' GAGGAGAAGGGGAGAAATGG 3'	
9 for	5' CCATTTCTCCCCTTCTCCTC 3'	250
9 rev	5' TGCCCCTCAGTCCTAAGCTC 3'	
10 for	5' GTGCATAAGGAGCGAAGGAG 3'	400
10 rev	5' GCTGGTAGGGGAGGAGTTTC 3'	
11 for	5' CTGCAGAACCACACTGAACC 3'	227
11 rev	5' CTGGGGGTTGTAGTCTGACC 3'	
12 for	5' GAGGCCAAGTCTGACAAAGC 3'	212

12 rev	5' AGACTGGTTTTGGGAGCTGA 3'	
13 for	5' CTCAGCTCCCAAACCAGTC 3'	175
13 rev	5' TATATGCCCGTGCTGAGATG 3'	
14 for	5' GGTGGGTAGGCACATCTCAG 3'	345
14 rev	5' GAAGAGGGTCCAGCAGTCAG 3'	
15 for	5' TAGAGGTGGGGAGGACAGTG 3'	223
15 rev	5' GCCTGAGAGGAAGAGGGAGA 3'	
16 for	5' CAGGGTGGTGTATGGCAACT 3'	229
16 rev	5' TACTGCCTTAAGAGATGGGGA 3'	
17 for	5' GAGTGGCGAGCTGGTAAGTG* 3'	*596
17 rev	5' GTGGGGGCATTAGTCTCAAG 3'	
18 for	5' GGCCAAGCTGATAAAACACA 3'	
18 rev	5' ATGAAAATAAATCTGGGCCG 3'	
19 for	5' TGGTCTCTCGAGGTGAGGA 3'	
19 rev	5' GAGAGGGAAGGAGGGGTTG* 3'	
20 for	5' CAAGATCCCTGAGTGAGGGC 3'	364
20 rev	5' GGGAAAGAACCGTCACACAG 3'	

Condizioni PCR:

	Buffer10x	Dntp10mM	P1(20µM)	P2(20µM)	MgCl2	TAQ	H2O	DNA
Esoni 1-20	10µL	16µL	2µL	2µL	3µL	0.5µL	63.5µL	3µL

Condizione Amplificazione:

		T1Den	T den	T Ann	T ext	T final ext	N° cicli
EX1 (protocollo touch down)	I STEP	95°C x 10'	98°C x 30''	68°C x 40''	72°C x 1,20'	72°C x 7'	15
	II STEP	98°C x 30''	55°C x 40''	72°C x 1,20'	72°C x 1,20'	72°C x 7'	30
EX2-3-4-5-6-7-8-9-11-12-13-16-20		95°C x 10'	98°C x 15''	58°C x 30''	72°C x 30''	72°C x 7'	35
EX10		95°C x 10'	98°C x 15''	58°C x 30''	72°C x 30''	72°C x 7'	40
EX14-15-17F19R		95°C x 10'	98°C x 15''	60°C x 30''	72°C x 30''	72°C x 7'	40

LCHAD α

primer usati:

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato (bp)
1 for	5' CAGGCTACGGGAGAAAAG 3'	307
1 rev	5' TCAGAAGGTCACGGGAAA 3'	
2 for	5' AAAGGTACTACAGAAATT 3'	154
2 rev	5' GCAACATAAATCCAAAAA 3'	
3 for	5' GCTTACATTGCTTTTTGG 3'	227
3 rev	5' TTGGGGAAATATGGGATA 3'	
4 for	5' TAGCATTTGATGGTGGTA 3'	267
4 rev	5' GCCTAAGAAACACACTAT 3'	
5 for	5' GATAGGATAAGTGTATAGTG 3'	284
5 rev	5' GATGAATGCCACCAATGA 3'	
6 for	5' TTAGACCCTTATCCATCT 3'	283
6 rev	5' CTACAATGAATGCCATA 3'	
7 for	5' CCTGATTTTTTCCCCCT 3'	290
7 rev	5' TGACCTCAAGTGATCTTC 3'	
8 for	5' ACTGGTCTAAGCCTGATTTG 3'	251
8 rev	5' CCTCATTTTGAATCTACAGC 3'	
9 for	5' ACTAACAAGGGAATCTAGGC 3'	258
9 rev	5' ATGGCAATAAGGAGGAGTGA 3'	
10 for	5' TCGCCAATCTATTCCAAC 3'	287
10 rev	5' CCATTAGGGTATTCTTAGC 3'	
11 for	5' ACCTGAACTGAAGGAATC 3'	328
11 rev	5' GACATAAGGGCTCAAATG 3'	
12 for	5' ACTTAGGCAATCTTCCAC 3'	335
12 rev	5' CAGGAAAAGGAATCCGTGA 3'	
13 for	5' GTTTCCTTTTCTTCCCATCT 3'	338
13 rev	5' CCAGCCTTTGAATAGTCCT 3'	
14 for	5' CCCAGGTGTCACTCATTAG 3'	279
14 rev	5' CATCCACTCCGTAATCCAC 3'	
15 for	5' GAAGGAATGCTCTCAGGT 3'	274
15 rev	5' CTGGAGGTAAAAGGAGTC 3'	

16 for	5' CTGGGAAAGGTAGAGTGT 3'	260
16 rev	5' AGACAAGAGCAGGAGTTG 3'	
17 for	5' TTTGGGGGGATTTGGGCT 3'	338
17 rev	5' GAGGGCTTCTGTA ACTCT 3'	
18 for	5' ACTCCCTCCCTGAGAACA 3'	222
18 rev	5' CTTTGGGCTGTCAGAGAA 3'	
19 for	5' CCTCCCCTTTTCCTCTTC 3'	239
19 rev	5' GGCTCCAGGCTAAAGTGA 3'	
20 for	5' CTCACTTTAGCCTGGAGC 3'	317
20 rev	5' CGGAGTTTGTCTTCTCGT 3'	

Condizioni PCR:

	BufferIII10x	Dntp10mM	Primer MIX*	MgCl2	TAQ	H2O	DNA*
Esoni 1-20	5µL	4µL	13µL	3µL	0.3µL	19.7µL	5µL

Condizione Amplificazione:

	T1Den	T den	T Ann	T ext	T final ext	N° cicli
EX 1-20	95°C x 10'	94°C x45''	55°C x 25'	52°C x 35''	72°C x 4'	35

LCHADβ

primer usati:

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato (bp)
1 for	5' TGCCTGGTTTTCCAG 3'	369
1 rev	5' ACCTTGTC CGAGGAGTTTCC 3'	
2 for	5' CCATGTTGGTGTTCCTATCATAA 3'	392
2 rev	5' AGCTCGTAGCTGGGAGGA 3'	
3 for	5' TCTCGCACAGATACTGAATGG 3'	243
3 rev	5' TGAAGGCAACAGAGATGTTCA 3'	
4 for	5' AAAAAGTAAAAGTCATCAGAC 3'	220
4 rev	5' TGAAAGTGTCTTAAAAGAAGGAAAAA 3'	
5 for	5' TGAAATGATGGACTGCCTTG 3'	285
5 rev	5' TGGCTAAAATAAGAACAAATTGC 3'	

6 for	5' CGCAGTGTTTTGTGTGATGA 3'	236
6 rev	5' TGAAATTCAAAGTGATTCTCCTATC 3'	
7 for	5' AACCGTTTCCAGATGACTATG 3'	238
7 rev	5' AAAGACAAAGGAGAATAATTAAC 3'	
8 for	5' AACTGTCATTCAGCTTTTTAATCA 3'	368
8 rev	5' CACCTATTACAGCATAGCAGAGTCC 3'	
9 for	5' CCTCTGCTTGTCTTGGACTTG 3'	400
9 rev	5' TGGAAAAATCACTCGGGATG 3'	
10 for	5' AAAGCATATTTCTGTGGAGAAGA 3'	299
10 rev	5' AACCTCTATTTCATAACACACACA 3'	
11 for	5' TGATGGATACAGTGAAGTAAGTGTG 3'	381
11 rev	5' TCCAAGGATACAACTGCTACC 3'	
12 for	5' GCGGAGGAAAAGGCTCTG 3'	299
12 rev	5' TCAAACCAGTGAATAAACAAATAAA 3'	
13 for	5' AAAAATCAAAGAATGAGTGAAAAGACA 3'	300
13 rev	5' AAAAATCAAAGAATGAGTGAAAAGACA 3'	
14 for	5' ACAGATGTGAGCCACTGTGC 3'	272
14 rev	5' TCCAATTATTAACGTGCTTTGAA 3'	
15 for	5' TGACCTAGACTTACTTTCTTTTGCAG 3'	382
15 rev	5' CATTCTAGTCATTCCAAGAAAATG 3'	
16 for	5' GGTGGATTCATCACCATTCA 3'	378
16 rev	5' CCAACTGCAAACCCTCATT 3'	

Condizioni PCR:

	Buffer10x	Dntp10mM	P1(20µM)	P2(20µM)	MgCl2	TAQ	H2O	DNA
Esoni 1-16	5µL	8µL	1µL	1µL	3µL	0.25µL	30.25µL	3µL
Esoni 14	5µL	5µL	5µL	5µL	14µL	5µL	19.25µL	5µL

CONDIZIONI AMPLIFICAZIONE:

	T1Den	T den	T Ann	T ext	T final ext	N° cicli
EX 1-2-5-10-14-15-16	95°C x 10'	95°C x 1'	60°C x 30''	72°C x 30''	72°C x 7'	30
Esoni 3-4-6-7-8-9-11-12-13	95°C x 10'	95°C x 1'	55°C x 1'	72°C x 1''	72°C x 7'	35

CUD

Primer usati:

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato (bp)
Promoter1 for	5' GGCTACCTCGGTCGTCCC 3'	227
Promoter 1 rev	5' GCGGCTGGCCTTACATAG 3'	
1A for	5' TATGTAAGGCCAGCCGC 3'	314
1A rev	5' CTATCAGGAACACGGAGGACAG 3'	
1B for	5' CCTCATCTTCTTCCTGCTCA 3'	400
1B rev	5' GTTCAAGGACCGCGACAG 3'	
2 for	5' GGCAGGATGTTCTGACTTCATT 3'	295
2 rev	5' TGGCTGAAAGAATACTACCAA 3'	
3 for	5' ACTGGATGGATCTTGAGAAAGC 3'	316
3 rev	5' AGAAAGGTAGGTGATGGGATGA 3'	
4 for	5' TTGTCTGTGATTCACAAAGATACCA 3'	353
4 rev	5' AATAGGGATTCATGGGTTGTTG 3'	
5 for	5' CTGCAACCTTATTCCCACCTAT 3'	313
5 rev	5' CTGTGAGCAGGGAGGACTTC 3'	
6 for	5' CTAAGATGCCAGGGATTCAAGT 3'	291
6 rev	5' AGGCTTTGAATTTTGTCTGAGG 3'	
7 for	5' ACAGGTTGGGAAAGATGTGG 3'	342
7 rev	5' TTGAGACAGCCTGGTAGACAGT 3'	
8 for	5' GTTTTGCTCTCAATAGCTGCAT 3'	343
8 rev	5' TTCCTGTTAACACGCAACCTC 3'	
9 for	5' CTGGGAGCATAAAGGGGTAGAT 3'	313
9 rev	5' GTGAGAGGGAGTTTGCAGTAG 3'	
10 for	5' CCAGGGAAGATATCCTCAGTTC 3'	274
10 rev	5' CCTTTTGTCACTGAAGGACTCG 3'	

Condizioni PCR:

	Buff.10x	dntp	P1(20µM)	P2(20µM)	MgCl2	TAQ	H2O	Adiuvante	DNA
Esone 2-3-4- 5-6-7- 8-9-10	2.5µL	4µL	0.5µL	0.5µL	1.5µL	0.25µL	15.5µL	/	0.25µL
Esone 1B	2.5µL	4µL	0.5µL	0.5µL	1.5µL	0.25µL	15.5µL	1µL(DMSO)	0.25µL
P1-Ex7	2.5µL	4µL	0.5µL(10µM)	0.5µL(10µM)	1.5µL	0.25µL	15.5µL	1µL(DMSO)	0.25µL
Esone 1A	2.5 µL (Buff. Taq 360)	2µL	0.5µL(10µM)	0.5µL(10µM)	1µL(Mg Taq 360)	0.125µL(Taq 360)	17.125µL	1µL(Enancher)	0.25µL

Condizioni Ammplificazione:

	T1Den	T den	T Ann	T ext	T final ext	N° cicli
EX P1-Ex10	95°C x 10'	95°C x 1'	60°C x 30''	72°C x 20''	72°C x 7'	35

CPT1A

Primer usati:

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato (bp)
Promoter1 for	5' CTGCAGGTGGCACCTAGGC 3'	235
Promoter 1 rev	5' GCCTTCGCGGTTTGCCTAG 3'	
Promoter2 for	5' AGTCACCCGCCTGCAGG 3'	296
Promoter2 rev	5' GCGTCCCCACCCGGTCC 3'	
1 for	5' AGTGTCTGGTCACACGTTCC 3'	281
1 rev	5' ACCTCAATAGCAGCCAGAGC 3'	
2 for	5' GCTGTCCACACCCTCTTCTC 3'	386
2 rev	5' GAACAGCATCAGGAGCTTCA 3'	
3 for	5' CTCTGACTTTCCCGGCTGTA 3'	399
3 rev	5' AAAAGGTTCGCAGGGGTGT 3'	
4 for	5' CTTTCGGATCTTTAACATAGCC 3'	383
4 rev	5' CCTACCAGGCACACCGC 3'	
5 for	5' AAGGCACAAGTGAGGCAAAC 3'	283
5 rev	5' GCCCTCAAATAGCGTCT 3'	
6 for	5' CTAGTTAGGACTGCGTTCCC 3'	364
6 rev	5' AGGAGCATGAGCCAATCC 3'	
7 for	5' GACAGTGTGCAGGATGTGCT 3'	291
7 rev	5' CCCGGCCACAACTGTATATT 3'	
8 for	5' TACTGACCTCGTGATCCGC 3'	296
8 rev	5' GACACTTCTTAATTCTGAGC 3'	
9 for	5' AGAGTCAGGGTACGGTCCG 3'	379
9 rev	5' AGTCCCGTGCCAGGATTCC 3'	
10 for	5' TGAAAACTGCAAAGGTTTGAT 3'	396
10 rev	5' TGCCACCTTCTTTCTTAGCA 3'	

11 for	5' TGAAGCAGAGAGGTGCAATG 3'	245
11 rev	5' CTGGCCAGGTTTGGATTTT 3'	
12 for	5' GCCTTAACAGCTGTGATTCAAACCT 3'	371
12 rev	5' CTTTCAGCCTCAGTGGTCTTCAACT 3'	
13 for	5' TTGTGTACTTCCCAGTACCG 3'	353
13 rev	5' CAGTCTTGGGCAGGTGTAGG 3'	
14 for	5' GAAGTCCACGTCTCCTTGC 3'	314
14 rev	5' AGAAGCTGGAGTGATGGCC 3'	
15 for	5' CGGTGGCTAACTTAGATCCG 3'	359
15 rev	5' CAGCTACACCCACAGACCC 3'	
16 for	5' GTCTTCCCAAAGCGACTCC 3'	243
16 rev	5' CATTACCCATCCCATCACC 3'	
17 for	5' AGCCCCGCCAGTGTTGC 3'	328
17 rev	5' CCATTTATGTGAAAATTCCCG 3'	
18 for	5' AAGCTTGAAATGTGGGGATG 3'	236
18 rev	5' CCCGAGCTAAGGTCAGGATT 3'	
19 (ISO2) for	5' TGAAGCAGAGAGGTGCAATG 3'	245
19 (ISO2) rev	5' CTGGCCAGGTTTGGATTTT 3'	

Condizioni PCR:

	Buffer10x	Dntp	P1(20µM)	P2(20µM)	MgCl2	TAQ	H2O	Adiuvante	DNA
	2.5µL	4µL	0.5µL	0.5µL	1.5µL	0.25µL	15.5µL	/	0.25µL

CONDIZIONI AMPLIFICAZIONE

	T1Den	T den	T Ann	T ext	T final ext	N° cicli
EX P1-Ex10	95°C x 10'	95°C x 1'	60°C x 30''	72°C x 20''	72°C x 7'	35

Controllo prodotti PCR

Il controllo degli amplificati (post-PCR e post-purificazione) è stato eseguito mediante lo strumento Qiaxcel (Qiagen). A differenza del tradizionale gel elettroforetico di agarosio, la separazione, in questo strumento, avviene in un capillare di una cartuccia preconfezionata.

Purificazione amplificati

La purificazione del DNA avviene attraverso una membrana di silice contenuta in colonnine Quiaquick PCR Purification Kit (Quiagen) che trattiene il DNA e permette il passaggio attraverso di essa solo dei primer in eccesso nella reazione di amplificazione.

3.6 Sequenziamento

Il metodo di sequenziamento da noi usato è una evoluzione del metodo di Sanger: il cosiddetto “cycle sequencing” con BigDye Terminator per sequenziare su analizzatore automatico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem).

Reazione di Sequenza

Il kit per la reazione di sequenza utilizzato è il kit BigDye® Terminator v1.1 (Applied Biosystem)

Purificazione di BDT

Dopo la reazione di sequenza i BigDye Terminator non incorporati e i Sali che possono competere per iniezione elettroforetica nel capillare vengono eliminati attraverso:

X-Terminator

Il kit di purificazione BigDye X Terminator 1 (Applied Biosystem)

Elettroforesi capillare

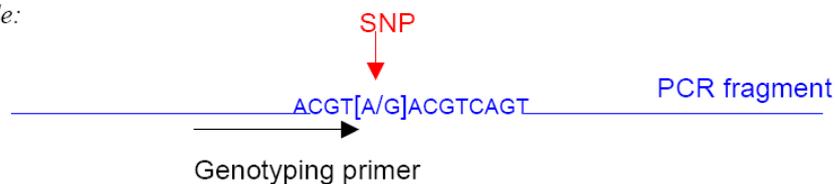
E' stata eseguita utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 GENETIC ANALYZER. L'analisi dei dati è stata effettuata con i software: Sequencing analysis v5.3.1 e SeqScape v2.5 (Applied Biosystem).

3.7 Analisi delle mutazioni prevalenti (SNaPshot®)

Il sistema SNaPshot è stato utilizzato per analizzare in multiplex le mutazioni più frequenti di MCADD ed usando come materiale di amplificazione DNA estratto da spot di sangue. Il kit ABI PRISM SnapShot Multiplex è disegnato in modo da essere utilizzato per la determinazione fino ad un massimo di dieci SNPs, localizzati in posizioni note su uno o dieci singoli amplificati. La chimica del kit si basa su una

reazione di estensione (Fig.5), con dideossinucleotidi fluorescenti, di un oligonucleotide non marcato complementare al template contenente il SNP. Ogni locus è stato amplificato mediante l'utilizzo di primer sonda appositamente progettati in modo tale da coprire la regione al 5' del SNP. La mix di reazione SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix contiene la DNA polimerasi di tipo Sequenase (DNA polimerasi del fago T4 modificata), Buffer e quattro ddNTPs marcati con differenti fluorocromi (A= verde; C= nero; G= blu; T= rosso).

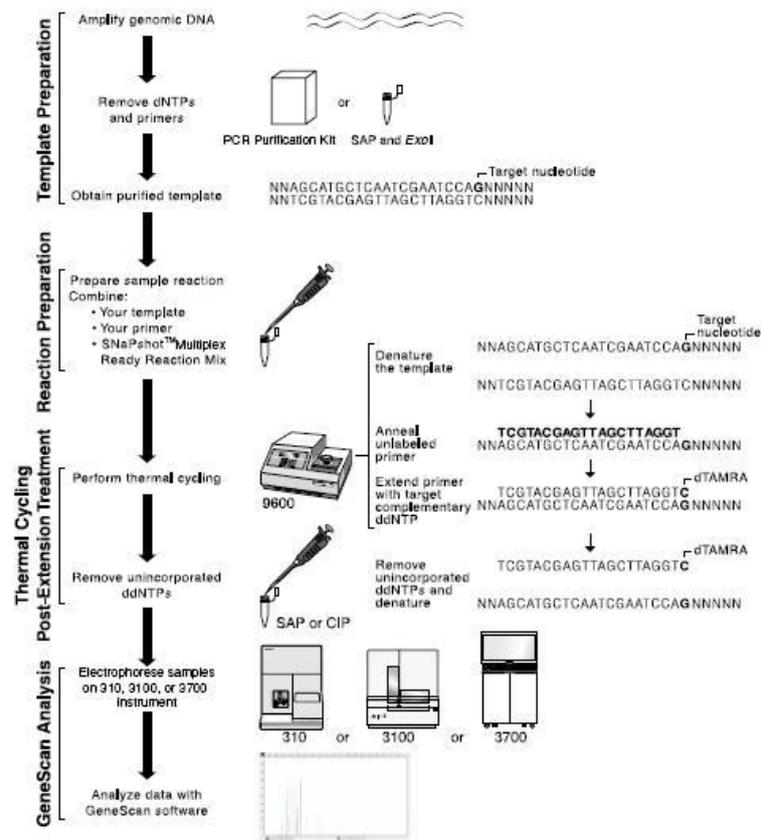
Principle:



(Fig.5: Principio di rivelazione di SNP sul quale si basa il sistema SNaPshot Multiplex)

Il protocollo seguito per l'analisi genotipica mediata da SNaPshot comprende 4 step (Fig.6):

- Preparazione del DNA stampo:
 - Amplificazione del DNA genomico
 - Purificazione del DNA stampo da dNTPS e primer in eccesso
 - Preparazione della reazione
 - DNA stampo + primer- sonda + SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix
- Reazione di estensione:
 - Denaturazione del DNA stampo
 - Ibridazione del primer-sonda non marcato con un filamento del DNA target
 - Estensione del primer grazie all'incorporazione di ddNTPs marcati
- Trattamento post estensione:
 - Rimozione dei ddNTPs non incorporati
 - Denaturazione
- Analisi mediante GeneScan:
 - Elettroforesi capillare sul sequenziatore ABI 310
 - Analisi dei dati con il software GeneScan



(Fig.6: Protocollo seguito per l'analisi con SNaPshot)

Reazione di amplificazione

Ciascun locus è stato amplificato mediante l'utilizzo di primer specifici progettati appositamente.

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

- ACADM (mutazione prevalente K329E)

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato(bp)
11 for	5' GTTTTCTCAATAAATATCCTTTAA 3'	342
11 rev	5' ATGAATATTCTCTCCTTGC 3'	

- Denaturazione iniziale: 95°C x 10'
- Denaturazione: 95°C x 1'
- Annealing: 55°C x 1'
- Estensione: 72°C x 1'
- Estensione finale: 72°C x 7'

Le fasi di denaturazione, annealing ed estensione sono state ripetute per 30 cicli.

La miscela di reazione (Vf = 100 µl) conteneva 15ng di DNA stampo, Primer Fw [20 µM], Primer Rw [20µM] dNTPs [10 µM], Taq polimerasi (250 U), MgCl₂ [25 µM], Buffer 10X.

- HADHA (mutazione prevalente: E510Q)

Esone	Primer	Lunghezza Amplificato(bp)
15 for	5' GAAGGAATGCTCTCAGGT 3'	274
15 rev	5' CTGGAGGTAAAAGGAGTC 3'	

- Denaturazione iniziale: 95°C x 10'
- Denaturazione: 94°C x 45''
- Annealing: 52°C x 25''
- Estensione: 72°C x 35''
- Estensione finale: 72°C x 4'

Le fasi di denaturazione, annealing ed estensione sono state ripetute per 30 cicli.

La miscela di reazione (Vf = 50 µl) conteneva 15ng di DNA stampo, Primer Fw [20 µM], Primer Rw [20 µM], dNTPs [10 µM], Taq polimerasi (250 U), MgCl₂ [25 µM], Buffer 10X.

Reazione di “primer extension”

I frammenti amplificati sono stati preparati per la reazione di primer extension mediante purificazione.

L'analisi viene effettuata utilizzando primer sonda da noi progettati:

ACADM K329E:5'-AAAAAAAAAATGCTGGCTGAAATGGCAATG -3'

HADHA E510Q:5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTGGACAAGATGCAGGTGCTG -3'

Utilizzando il kit SnapShot (Applied Biosystem) seguendo il protocollo standard fornito dalla azienda fornitrice.

La miscela di reazione è stata incubata a:

- 96°C per 10 sec.
- 50°C per 5 sec. 25 cicli.
- 60°C per 30sec.

La purificazione dei frammenti è stata ottenuta mediante aggiunta di 1 unità di CIP (Calf Intestinal Phosphatase) a 37°C per 1 ora. Successiva inattivazione dell'enzima attraverso incubazione a 75°C per 15 minuti.

Elettroforesi capillare (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)

Lo strumento è un analizzatore genetico automatizzato che consiste di un apparato in grado di effettuare l'elettroforesi capillare.

Lo strumento è in grado sia di determinare la composizione di basi del frammento preso in esame e sia di misurare e quantificare i frammenti di DNA.

I campioni amplificati e caricati sullo strumento vengono introdotti in un capillare, il quale contiene il polimero liquido POP-4 Polymer, utile per effettuare elettroforesi in condizioni denaturanti. I frammenti di DNA fluorescenti migrano attraverso il polimero e si separano in base al differente peso molecolare.

3.8 Real Time PCR per l'identificazione di delezioni di esoni

Per aumentare la sensibilità dei test molecolari in tutti quei casi positivi allo screening neonatale in cui è stata identificata una sola mutazione abbiamo messo a punto un test basato sull'utilizzo della PCR Real Time per l'identificazione di delezione di esoni.

La quantificazione relativa è stata eseguita utilizzando lo strumento 7500 Real Time PCR System della Applied Biosystems. La chimica utilizzata è stata il SYBR Green (Applied Biosystems). I primer scelti che permettono l'amplificazione di ciascun esone del gene di interesse sono quelli utilizzati anche per le reazioni di PCR. Ciascuna reazione richiede un volume finale di 50 µl composta da 25 µl di SYBR Green Master Mix, 0.5 µl (5µM) di primer forward e reverse del esone da riconfermare, 5 µl di (50 ng) DNA e 19 µl di H₂O.

GPR15 (Gene bank: NT005612) viene considerato il gene di riferimento interno per normalizzare le differenze tra i campioni in esame ed è analizzato simultaneamente in una provetta differente in ogni saggio. I campioni (WT) di controllo sono costituiti da pazienti sani non coinvolti dalla patologia in esame. Inoltre in ciascun saggio è incluso un bianco senza DNA per verificare eventuali inquinamenti. Ogni campione è stato analizzato in quadruplicato.

Le condizioni di RT-PCR sono : 50°C per 2'----- 95°C per 10" seguito da 40 cicli a 95°C per 15"-----Hold 60°C per 60'

I risultati ottenuti sono analizzati attraverso il metodo comparativo $\Delta\Delta C_t$ del software SDS V1.2.1(Applied Biosystem).

I valori $\Delta\Delta C_t$ che cadono sul range di 1 ± 0.15 sono indice di assenza di delezioni mentre i valori $\Delta\Delta C_t$ compresi nel range di 0.5 ± 0.15 dimostrano l'esistenza di una delezione. I risultati ambigui e borderline esigono la ripetizione dell'analisi.

3.9 Validazione dei test molecolari

Prima di essere utilizzato, ogni test molecolare è stato validato nel modo seguente:

- Blast Primer e sonde: I Primers e le sonde utilizzate sono prima state analizzate con Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) per escludere l'appaiamento con geni non specifici. Se il primer è

specifico per la sequenza di interesse è accettato e passa allo studio per la presenza di SNPs altrimenti viene rifiutato per essere ridisegnato.

- SNPs Primer e sonde: I primer e le sonde specifiche per la sequenza di interesse vengono studiati per la loro eventuale complementarietà con SNPs presenti nella sequenza di riferimento facendo uso del database dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) od utilizzando il tool SNPcheck (<http://ngri.man.ac.uk/>). Se non sono presenti SNPs o se sono presenti non nelle vicinanze della regione 3' il Primer o la Sonda vengono accettati altrimenti vengono rifiutati per essere ridisegnati.
- Sequenziamento: Per ogni esone amplificato è stato eseguito un sequenziamento genico su di un campione random. Se il QV di ogni base letta al sequenziatore automatico, utilizzando il software Sequencing Analysis Software v5.3.1(Applied Biosystems), raggiunge un valore maggiore di 25 (range valore 0-50) ed i picchi dovuti al “rumore di fondo” hanno un valore <5% di quelli principali il test è validato; in caso contrario il protocollo del test è rimandato in fase di set-up.
- Snapshot: Ogni sonda è testata su un campione WT e se disponibile su di un campione positivo per la mutazione indagata. Il test deve identificare in modo specifico le basi attese con valori di fluorescenza di almeno 1000 se presenti in omozigosi e 500 se presenti in eterozigosi; in caso di valori inferiori o di identificazione di basi aspecifiche il protocollo del test è rimandato in fase di set-up.

3.9.1 Validazione metodo semiquantitativo per identificazione delezione di esoni

I primer per le regioni di interesse oltre la fase di studio precedentemente descritta, vengono anche testati per escludere l'assenza di amplificati aspecifici tramite l'analisi di curva di dissociazione. Se accettati viene eseguito un test su di un campione negativo. Viene, quindi, eseguita l'analisi attraverso il metodo comparativo $\Delta\Delta C_t$ con il software SDS V1.2.1(Applied Biosystem): il valore RQ (Relative Quantification) dell'esone in esame e quello di uno sicuramente negativo (eterozigote

identificato tramite sequenziamento) deve essere uguale a 1 ± 0.15 ; in caso di valori differenti il test è rimandato in fase di set-up.

Una volta validato, il test è stato inserito tra le indagini molecolari di terzo livello ed eseguito in tutti quei casi in cui c'è un forte sospetto biochimico e clinico della malattia ma in cui è stata identificata una sola mutazione.

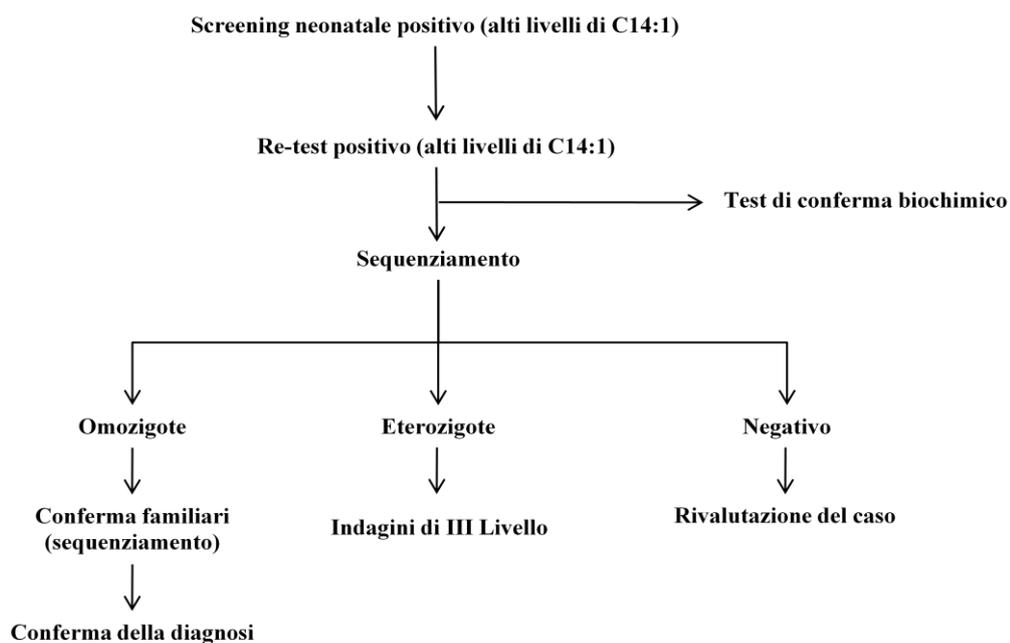
Tutti i test, una volta validati, vengono eseguiti ad ogni “mandata analitica”, oltre che su i campioni da analizzare, anche su di un campione “bianco”, un controllo negativo e se disponibile uno positivo per eseguire il “Performance monitoring” del test stesso.

4 RISULTATI

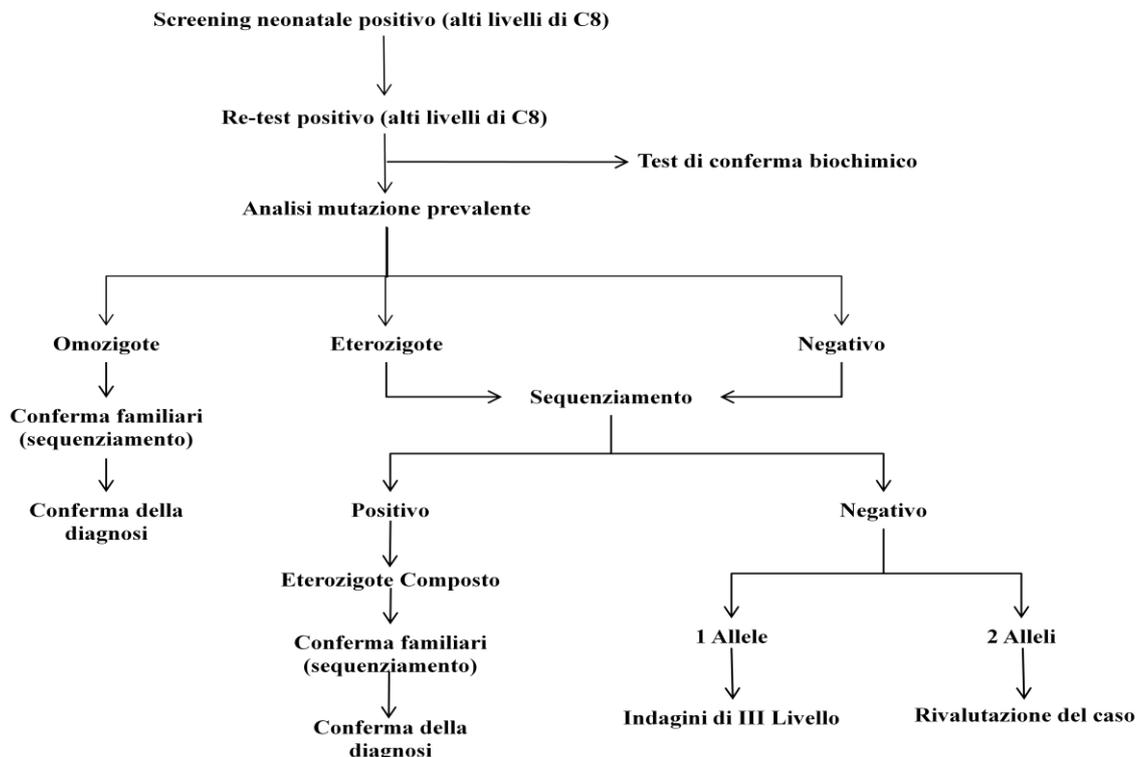
4.9 Messa a punto algoritmi diagnostici e di conferma

Le flow chart diagnostiche da noi proposte prevedono l'uso delle tecniche di analisi in ESI-MS/MS quali strumento di valutazione iniziale delle acil-carnitine negli spot di sangue dei campioni provenienti dallo screening neonatale sia nei liquidi biologici per la successiva conferma e follow-up della malattia in esame; inoltre si avvalgono di tecniche molecolari per la conferma genetica in caso di positività ad una delle malattie della β -ossidazione.

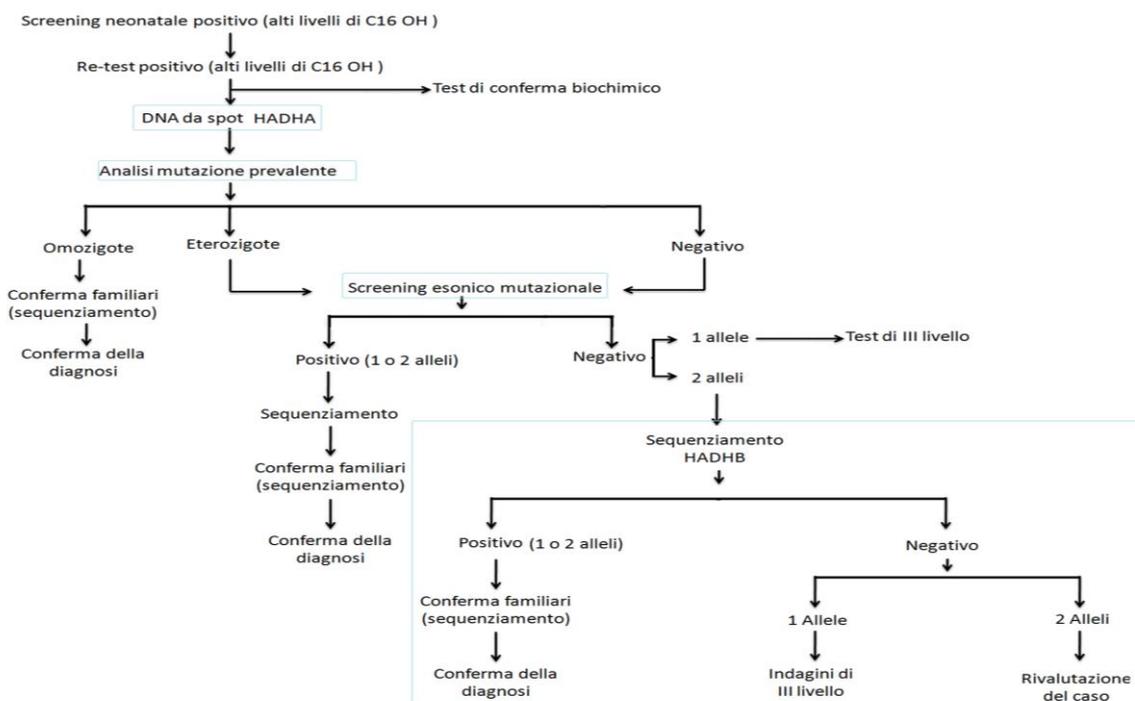
4.9.1 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto VLCAD



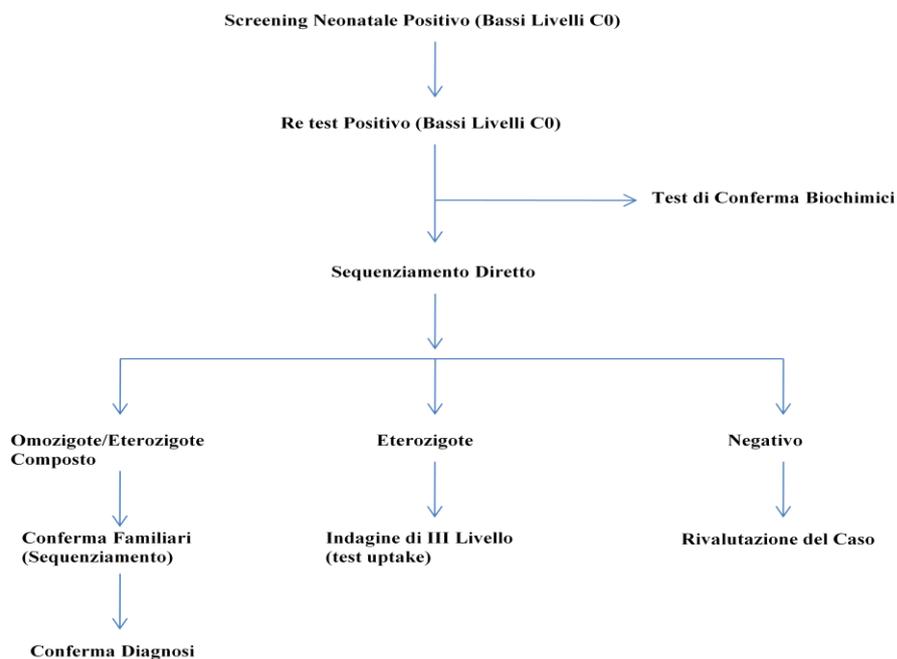
4.9.2 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto MCAD



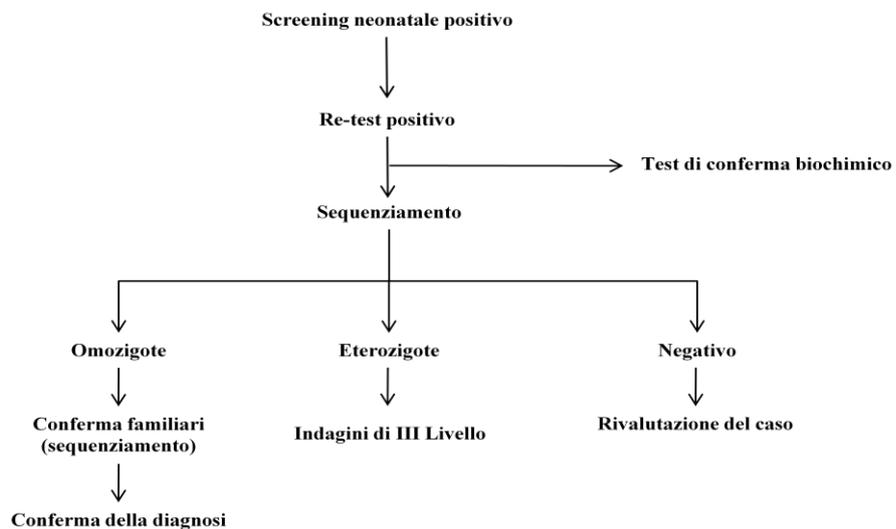
4.9.3 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto Lchad α -Lchad β



4.9.4 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto CUD



4.9.5 Flow chart diagnostica proposta in caso di sospetto CPT1A



4.10 Pazienti positivi per malattie delle β -ossidazione

Durante questo progetto di dottorato sono stati analizzati complessivamente 78305 campioni tramite MS/MS su spot di sangue.

Utilizzando le flow chart diagnostiche proposte in questo progetto di dottorato è stato possibile individuare e confermare sia biochimicamente sia molecularmente i seguenti 14 pazienti per malattie della β -ossidazione.

Pazienti VLCAD (Deficit Acil-CoA deidrogenasi a catena lunga)

Paziente	Acilcarnitine (marcatore primario): Valore iniziale (μM) Cut-off (μM)	GENE	Mutazioni Legenda: POLIMORFISMI/Verosimilmente polimorfismi MUTAZIONI VEROSIMILMENTE PATOGENETICHE MUTAZIONI CERTAMENTE PATOGENETICHE
W.G.	C14 1.57 (0.35)	ACADVL	Eterozigote Composto: - p.G294E (c.881G->A) - p.R366H (c.1097G->A)
D'.L.	C14 3.09 (0.35)	ACADVL	- Hz IVS 6 +1 G>A (c.477+1G>A) - Hz IVS 9 -27 C>T (c.753-27C>T) - Hz IVS 12 +25 G>A (c.1269+25G>A) - Om. c.-29G>T - Om. c.-33G>T

Pazienti MCAD (Deficit Acil-CoA deidrogenasi a catena media)

Paziente	Acilcarnitine (marcatore primario): Valore iniziale (μM) Cut-off (μM)	GENE	Mutazioni Legenda: POLIMORFISMI/Verosimilmente polimorfismi MUTAZIONI VEROSIMILMENTE PATOGENETICHE MUTAZIONI CERTAMENTE PATOGENETICHE
L.S.	C8 5.48 (0.33)	ACADM	Omozigote: - p.K329E (c.985 A>G)
Z.F. (Bambino gesù)	C8 4.76 (0.33)	ACADM	Eterozigote Composto: - p.K329E (c.985A>G) - p.D345Y (c.1033G>T)
B.Y.	C8 0.99 (0.33)	ACADM	

			<ul style="list-style-type: none"> - Hz. p.D181G (c.542 A-G) - Hz. p.T171T (c.522 C-A; rs 74090726) - HZ. DEL. EX1 (Fig.7)
M.A.	C8 11 (0.33)	ACADM	Omozigote: <ul style="list-style-type: none"> - p.K329E (c.985A>G)
Z.A.	C8 0.46 (0.33)	ACADM	<ul style="list-style-type: none"> - Hz. c.244-245 insT (W82fs.) - Hz. IVS2 -32G>C (rs.7524467) - Hz. IVS3 +10T>C (rs. 2275378) - Hz. IVS5 +32C>G (rs 2153126) - Hz. p.V387V (; c.1161 A-G; rs1061337)

Pazienti LCHAD (Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga)

Paziente	Acilcarnitine (marcatore primario): Valore iniziale (μM) Cut-off (μM)	GENE	Mutazioni Legenda: POLIMORFISMI/Verosimilmente polimorfismi MUTAZIONI VEROSIMILMENTE PATOGENETICHE MUTAZIONI CERTAMENTE PATOGENETICHE
F.M.	C16:1OH 4.03 (0.15)	HADHA	Eterozigote composto: <ul style="list-style-type: none"> - p.E510Q (c.1528G>C) - p.R291X (c.871C>T)
M.U.	C16:1OH 3.85 (0.15)	HADHB	Omozigote: <ul style="list-style-type: none"> - p.P294R (c.881 C>G)
La.S.	C16:1OH 3.03(0.15)	HADHA	<ul style="list-style-type: none"> - Hz. p.E510Q (c.1528G>C) - Hz. p.Y158Y (rs.11552518) - Hz. IVS 1 +55 C>T (c.67+53 C>T)

Pazienti SCAD (Deficit delle Acil-CoA a catena corta)

Paziente	Acilcarnitine (marcatore primario): Valore iniziale (μM) Cut-off (μM)	GENE	Mutazioni Legenda: POLIMORFISMI/Verosimilmente polimorfismi MUTAZIONI VEROSIMILMENTE PATOGENETICHE MUTAZIONI CERTAMENTE PATOGENETICHE
F.M.	C4 0.96 (0.867)	SCAD	<ul style="list-style-type: none"> - Om. p.G209S (c.625G>A; Rs1799958)

			(86% of wild-type activity; confers susceptibility to ethylmalonicaciduria) <ul style="list-style-type: none"> - Hz. p.R303R(c.993C>T; rs3915) - Hz. p.R107R (rs3914; c.321 T>C) - Hz. c.*21G>C (rs.3916)
L.A.	C4 1.67 (0.867)	SCAD	<ul style="list-style-type: none"> - Om. p.R107R (rs3914; c.321 T>C) - Om. p.G290S (Rs1799958;c.625G>A) - Om. p.R330R (rs3915; c.993C>T) - Hz. p.R46W (c.138 C>T) - Hz. IVS10+21 g>c (rs3916)

Pazienti CUD (Deficit del Trasportatore della Carnitina)

Paziente	Acilcarnitine (marcatore primario): Valore iniziale (μM) Cut-off (μM)	GENE	Mutazioni Legenda: POLIMORFISMI/Verosimilmente polimorfismi MUTAZIONI VEROSIMILMENTE PATOGENETICHE MUTAZIONI CERTAMENTE PATOGENETICHE
M.V.	C0 12 (>12.9)	SLC22A5	<ul style="list-style-type: none"> - Hz c.-149 G>A (Rs 57262206 Transport Activity- Carnitine transport activity in patient cultured fibroblasts: 33% of normal). - Hz. c.148 delT

Pazienti CPT1A (Deficit della Carnitina Palmitoiltransferasi)

Paziente	Acilcarnitine (marcatore primario): Valore iniziale (μM) Cut-off (μM)	GENE	Mutazioni Legenda: POLIMORFISMI/Verosimilmente polimorfismi MUTAZIONI VEROSIMILMENTE PATOGENETICHE MUTAZIONI CERTAMENTE PATOGENETICHE
B.U.(Bambino o Gesù)		CPT1A	Eterozigote composto: <ul style="list-style-type: none"> - p.R 339X (c.1015 C >T) - p.G465R (c.1393 G>A)

4.11 FOLLOW-UP pazienti positivi

I pazienti identificati durante lo screening neonatale sono seguiti direttamente dal nostro centro in collaborazione con il Prof. Vincenzo Leuzzi del Dipartimento di Scienze Neurologiche, Psichiatriche e Riabilitative dell'Età Evolutiva e dall' Unità Operativa di Patologia Metabolica dell'Ospedale pediatrico Bambino Gesù. I pazienti positivi sono stati sottoposti a terapia dietetica presintomatica , sono stati monitorati con esami ematici di routine, hanno effettuato il controllo biochimico delle acilcarnitine su spot di sangue, plasma ed urine ed il controllo biochimico degli acidi organici nelle urine.

Pazienti con Deficit Acil-CoA deidrogenasi a catena media*:

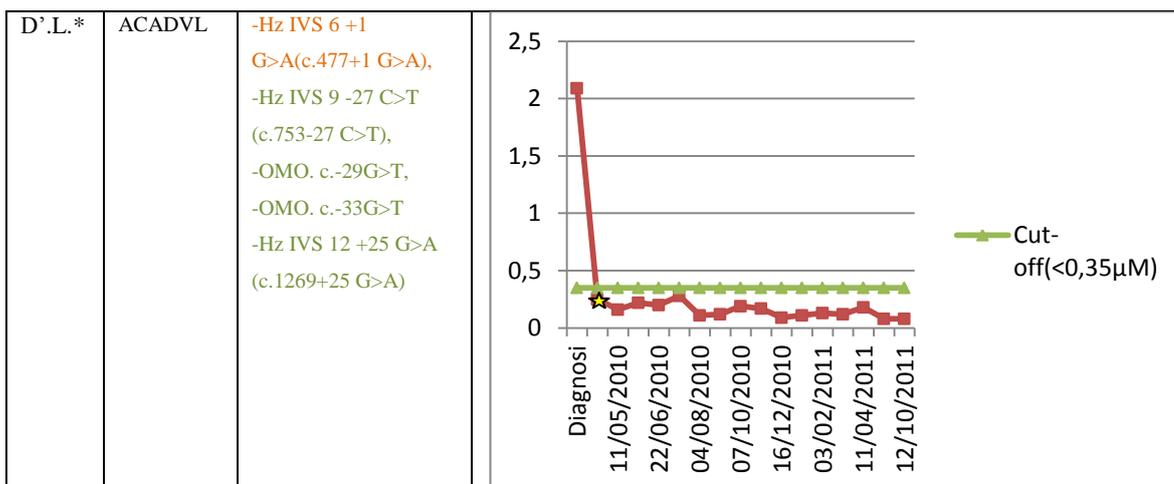
Paziente	Gene Coinvolto	Genotipo	Profilo Acilcarnitine (marcatore principale-C) in Follow-up
L.S.	MCAD	Omozigote: p.K329E (c.985A>G)	
B.Y. *	MCAD	-Hz. p.D181G (c.542 A>G) -Hz. p.T171T (rs 74090726 c.522 C>A) -Hz. DEL. EX1(Fig.7)	
M.A. *	MCAD	Omozigote p.K329E (c.985A>G)	

Z.A. *	MCAD	<p>-Hz. c.244-245 insT (W82fs.)</p> <p>-Hz. IVS2 -32G>C (rs.7524467)</p> <p>-Hz. IVS3 +10T>C (rs. 2275378)</p> <p>-Hz IVS5 +32C>G (rs 2153126)</p> <p>-Hz. p.V387V (rs1061337; c.1161 A-G)</p>	
Z.F.	MCAD	<p>p.K329E (c.985A>G)</p> <p>p.D345Y (c.1033G>T)</p>	

*Pazienti in follow-up presso il nostro centro. ★ Indica I controllo dopo l'inizio della terapia

Pazienti con Deficit Acil-CoA deidrogenasi a catena lunga*:

Paziente	Gene Coinvolto	Genotipo	Profilo Acilcarnitine (marcatore principale-C14) in Follow-up
W.G.*	ACADVL	<p>Eterozigote Composto:</p> <p>p.G294E (c.881G->A)</p> <p>p.R366H (c1097G->A)</p>	



*Pazienti in follow-up presso il nostro centro ★ Indica il controllo dopo l'inizio della terapia

Pazienti con Deficit dell'idrossiacil CoA deidrogenasi a catena lunga:

Paziente	Gene Coinvolto	Genotipo	Profilo Acilcarnitine (marcatore principale-C16-OH) in Follow-up
F.M.	HADHA	<p>Eterozigote composto p.E510Q (c.1528 G>C) p.R291X (c.871 C>T)</p>	
M.U.	HADHB	<p>OMOZIGOTE p.P294R (c.881 C>G)</p>	
La.S.	HADHA	<p>-HZ. p.E510Q (c.1528 G>C) -Hz. IVS 1 +55 G>T (c.67+53 C>T)</p>	

Pazienti con Deficit del Trasportatore della Carnitina*:

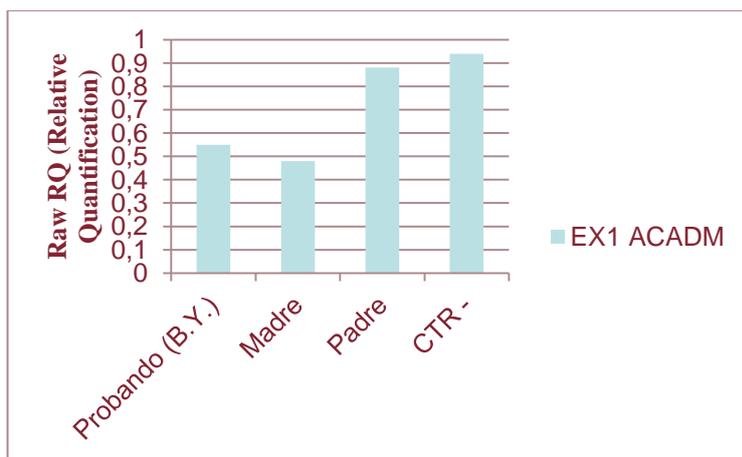
Paziente	Gene Coinvolto	Genotipo	Profilo Acilcarnitine (marcatore principale-C0) in Follow-up
M.V.*	SLC22A5	-Hz. c.-149 G>A Rs 57262206 (Transport Activity- Carnitine transport activity in patient cultured fibroblasts: 33% of normal). -Hz. c.148 delT	

*Pazienti in follow-up presso il nostro centro. ★ Indica il controllo dopo l'inizio della terapia

Pazienti con Deficit delle Acil-CoA a catena corta*:

Paziente	Gene Coinvolto	Genotipo	Profilo Acilcarnitine (marcatore principale-C4) in Follow-up
F.M.	ACADS	-Om. p.G209S (Rs1799958; c.625G-A) (86% of wild-type activity; confers susceptibility to ethylmalonicaciduria) -Hz. p.R303R (rs3915; c.993C-T) -Hz. p.R107R (rs3914; c.321 T-C) -Hz. c.*21G>C (rs.3916)	
L.A.*	ACADS	-Om. p.R46W (c.138 C-T) - Hz. p.R107R -Hz. p.G290S -Hz. p.R330R -Hz. IVS10+21 g>c (rs3916)	

*Pazienti in follow-up presso il nostro centro ★ Indica il controllo dopo l'inizio della terapia



(Fig.7 Real Time PCR per l'identificazione di delezioni di esoni. CTR- : Ex1 ACADM WT per delezione esone (Hz. al sequenziamento genico); Padre: WT per delezione esone 1 ACADM; Madre: Hz per delezione esone 1 ACADM; Probando: Hz. per delezione esone1 ACADM)

5 VALIDAZIONE BIOINFORMATICA E RAPPORTO GENOTIPO/FENOTIPO

Lo screening neonatale va collocato tra i test preclinici, o presintomatici, che permettono di individuare neonati affetti da malattie genetiche, i cui sintomi, non sono presenti alla nascita, ma che potrebbero comparire in un secondo momento.

Per quanto riguarda la formulazione degli algoritmi diagnostici uno dei problemi che ci siamo posti è stato quello di provvedere all'identificazione di procedure semplici, rapide, standardizzate che, da una parte, consentano l'accertamento diagnostico nel minor tempo e con la maggiore accuratezza possibile e, dall'altra, mettano al riparo i genitori dall'ansia da screening e gli operatori da possibili errori.

La messa a punto di test di screening e di conferma è sicuramente un'operazione laboriosa che richiede molto tempo ma garantisce, una volta stabilite le condizioni, delle risposte in un tempo relativamente breve (circa 20-30 giorni per i test molecolari e 2/3giorni per il test biochimico), ciò è reso possibile anche grazie all'utilizzo di tecnologie il più possibile automatizzate e sequenziatori "High-throughput" e della MS/MS per le analisi delle acilcarnitine e degli acidi organici.

Test Biochimici:

- Un problema già noto da tempo, che aveva sconsigliato lo screening dell'istidinemia [37 Levy HL, et al. 1974] è **la descrizione di non malattie**. Problema particolarmente rilevante nel caso dello screening esteso in cui sono descritte forme del tutto benigne e clinicamente silenti [35 Ledley FD, et al.1984][57 van Maldegem BT, et al; 2006].

Se da un lato la medicalizzazione di persone, nella fattispecie bambini, asintomatiche costituisce un problema, bisogna tener conto che, dal punto di vista clinico, un individuo che presenti dei deficit metabolici, anche se senza manifestazioni fenotipiche, è un individuo che potrebbe ammalarsi in un qualsiasi momento della sua vita e che l'eterogeneità fenotipica, propria di questi difetti, non permette, nella maggior parte dei casi, una previsione del grado di manifestazione clinica, il quale, spesso, si presenta in forma acuta e molto grave. Quindi, se da un lato vi è il rischio di creare una popolazione di malati-non malati, dall'altro vi è il vantaggio, indiscutibile, di poter prevenire qualsiasi sintomatologia attraverso una terapia mirata. Va, poi, considerato

che per la presenza, inevitabile nei programmi di screening, di falsi positivi, il numero di casi in attesa di definizione può raggiungere livelli tali da creare significative ricadute sui genitori come ansia, rifiuto del controllo e rifiuto del percorso diagnostico offerto; anche in questa ottica si pongono i test di conferma che, oltre ad avere le caratteristiche necessarie di accuratezza, sensibilità e specificità diagnostiche, devono essere effettuati in modo rapido, per quanto possibile per test così complessi.

Test molecolari:

Quando si intende introdurre nella pratica clinica l'uso di un test molecolare è necessario valutarne:

- validità analitica
- validità clinica

In particolare la validità analitica (affidabilità e accuratezza) dell'analisi è di competenza del laboratorio stesso. Per la valutazione della validità clinica sarebbe utile conoscere la popolazione di riferimento (per poter constatare ad esempio il valore predittivo del test) ma nell'ambito delle malattie rare questo è spesso impossibile. Per questo motivo, per la formulazione degli algoritmi proposti in questo lavoro, si è fatto riferimento ai dati presenti in letteratura. Si è valutata, ad esempio, la presenza, in letteratura, di mutazioni prevalenti responsabili dell'insorgenza della malattia e, al fine di ottenere un tempo di risposta rapido e di ottimizzare il rapporto costo/beneficio, si sono stabiliti appositi algoritmi in cui il primo test prevede l'analisi della sola mutazione prevalente.

Ove possibile si è provveduto, inizialmente, alla ricerca delle mutazioni prevalenti (K304E ed E510Q rispettivamente dei geni MCAD ed HADHA), mediante la tecnologia SNaPshot. Tale tecnica si è rivelata rapida, precisa e accurata.

In caso di negatività di questo test si procede al sequenziamento dell'intera parte esonica e delle giunzioni intraesoniche del gene di interesse; in caso di ulteriore negatività o dell'identificazione di una sola mutazione si è proceduto alla ricerca di delezione di esoni tramite una tecnica basata sull'analisi quantitativa relativa in Real Time PCR data la mancanza di un Kit per l'analisi in MLPA (la tecnica maggiormente utilizzata per questo tipo di analisi).

L'utilizzo degli algoritmi diagnostici da noi proposti ci ha portato ad identificare 12 pazienti affetti da malattie della β -ossidazione su 78000 campioni analizzati, con una incidenza delle malattie (come gruppo di malattie) di 1:6500. Inoltre 2 pazienti ci sono stati inviati da centri esterni per le conferme molecolari.

I 12 pazienti sono stati tutti caratterizzati genotipicamente, in caso di identificazione di nuove mutazioni sono stati utilizzati tools bioinformatici per predirne l'effetto patogenetico. In particolare è risultato interessante avere la possibilità di testare, per alcune mutazioni, il software commerciale ALAMUT: il software oltre a dare, con ottima precisione, [20 EuroGentest Unit 5; 2008] la nomenclatura della mutazione, usa anche i più comuni tools di bioinformatica per la predizione dell'effetto di una mutazione genomica (sift, Polyphen2, esfinder), il tutto supportato dai link ai database maggiormente usati (pubmed, hgmd, swissprot, ensemble) ciò permette di avere in tempi rapidi le informazioni presenti in letteratura riguardanti: il gene, la malattia e se presente la letteratura sulla mutazione trovata.

Follow- Up - Correlazione genotipo/fenotipo:

I piccoli pazienti sono stati sottoposti a terapia dietetica ed integrativa (supplemento di carnitina e/o MCT) ove richiesto, fin dalla prima visita, e sono stati effettuati esami urinari ed amacici di routine oltre, ovviamente, al monitoraggio delle acilcarnitine.

Pazienti MCAD:

Storia naturale:

Il deficit di ACADM è il più comune tra i difetti della β -ossidazione.

Prima dello screening neonatale la diagnosi era effettuata dopo il manifestarsi delle presentazioni cliniche che peraltro sono molto omogenee [27 Iafolla AK;1994] [48 Pollitt RJ; 1998] [60 Wilcken B.; 2010]: la mortalità era molto alta 16-25% ed i pazienti che sopravvivevano subivano comunque danni intellettivi; entro 6 anni insorgevano episodi di squilibrio metabolico. Come precedentemente descritto la malattia si presenta clinicamente con episodi di ipoglicemia ipochetonica durante uno stress catabolico (malattia, esercizio fisico severo). Approssimativamente la mutazione c.985 A>G, in omozigosi, rappresentava l'80% del genotipo dei pazienti malati e comunque per i

restanti casi la mutazione era presente in eterozigosi associata ad un'altra mutazione rara [52 Roe DS; 2006].

Outcome screening neonatale:

Attualmente l'outcome della malattia, grazie alla diagnosi tramite screening neonatale, inizia ad essere più chiaro ed è decisamente diverso da ciò che si osservava nei pazienti non provenienti dallo screening neonatale [60 Wilcken B.; 2010]:

- Il rischio di morte si attesta intorno al 4% contro il 16-25% della storia naturale, ma le morti si verificano nelle prime 72h quindi prima dell'identificazione tramite screening neonatale.
- Il rischio di morbidità fino all'età di 6 anni è molto basso.
- I disturbi cognitivi sono estremamente rari [58 Wilcken B; 2009].
- La prevalenza della mutazione più frequente, la c.985A>G, in omozigosi, è all'incirca del 40-60% [50 Pourfarzam M; 2001].

Per quanto riguarda la correlazione genotipo/fenotipo basandosi sulla mutazione grave più frequente (c.985 A>G) e su di una mutazione che mantiene una residua attività enzimatica (c.199T>C) si può suddividere la popolazione in due sottogruppi dal punto di vista biochimico [42 Maier EM; 2005]:

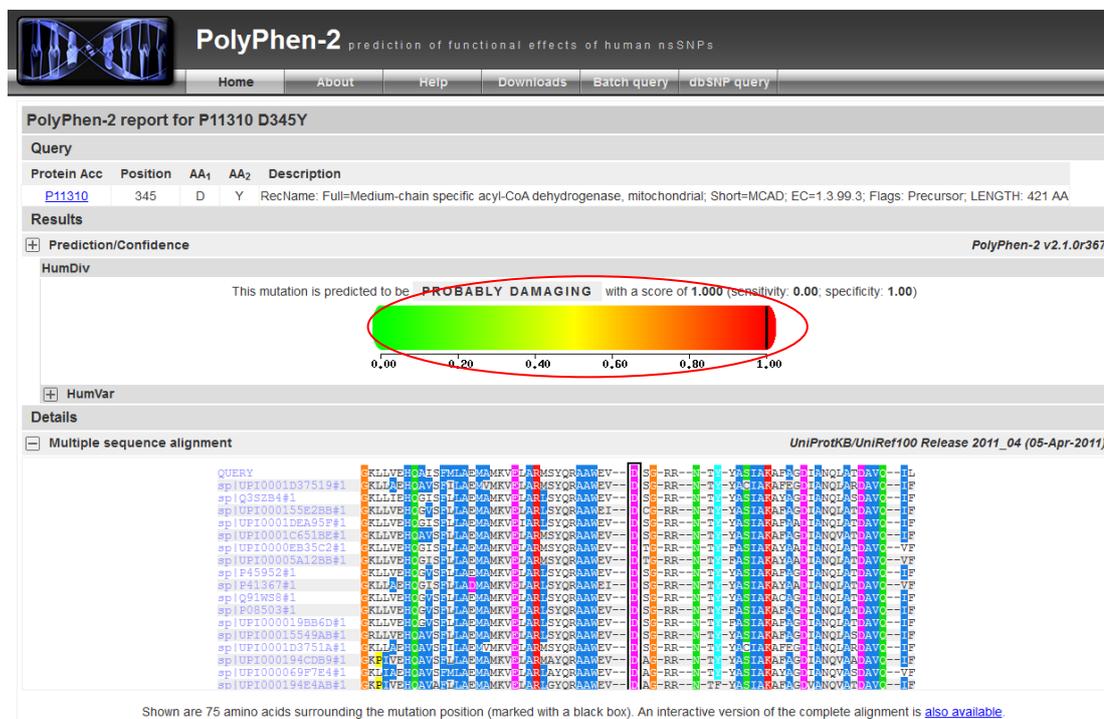
- GRAVE: Omozigote c.985 A>G oppure Eterozigote composto c.985A>G/mutazione rara.
- MILD: Eterozigote composto c.199T>C /mutazione rara oppure c.199T>C/ c.985A>G

Durante questo progetto di Dottorato abbiamo identificato 4 pazienti positivi per deficit di Acil-CoA deidrogenasi a catena media.

Fino ad oggi i nostri pazienti non ha evidenziato segni o sintomi della malattia e lo sviluppo psico-fisico risulta nella norma, i valori biochimici delle acilcarnitine si sono generalmente abbassati in tutti i pazienti in terapia dietetica ed in molti si sono normalizzati. Gli esami di routine del sangue e delle urine sono nella norma.

- Il Paziente L.S. è omozigote per la mutazione più comune p.K329E (c.985 A>G); non sono disponibili dati di follow-up perché il paziente non lo ha effettuato presso il nostro centro.
- Il paziente Z.F. è eterozigote composto per la mutazione p.K329E ed una mutazione non descritta p.D345Y (c.1033G>T).

La nuova mutazione è stata analizzata bioinformaticamente con i tools: Poliphen2 (Fig.8), Mupro (Fig.9), ALAMUT/SIFT (Fig.10) ed è risultata essere potenzialmente patogenetica della malattia .



(Fig.8 Poliphen2 output D345Y: potenzialmente patogenetica con score 1)

Structure stability prediction for mutation:

Mutation Request:

Name: D345Y

Sequence:

```
MAAGFGRCCRVLRISIRFHWRSQHTKANRQREPGLGFSFEFTEQQKEFQATARKFAREEI  
IPVAAEYDKTGEYPVPLIRRAWELGLMNTIIPENCGLGLGTFDACLI SEELAYGCTGVQ  
TAIEGNSLGMPIIIAGNDQQRKKYLGRMTEEPLMCAVCVTEPGAGSDVAGIKTKAEKKG  
DEYIINGQRMMITNGGKANWYFLARSDPDKAPANKAFTGFIVEADTFGIQIGRKEINM  
GQRCSDTRGIVFEDVKVPEKNVLIQDAGGFKVAMGAFDKTRFVVAAGAVGLAQRALDEAT  
KYALERRTFGKLLVEHQAI SFMLAEMAKVELARMSYQRAAWEVDSGRNITYASIAKAF  
AGDIANQLATDAVQILGGNGFNTYEPVEKLMRDAKIYQIVEGTSQIQRLIVAREHIDKYN
```

Position: 345

Original Amino Acid: D

Substitute Amino Acid: Y

Prediction Results:

1. Predicted both value and sign of energy change using SVM and sequence information only (Recommended)

delta delta G = (INCREASE stability)

2. Prediction of the sign (direction) of energy change using SVM and neural network with a smaller sequence window

Method 1: Support Vector Machine, use sequence information only.

Effect: DECREASE the stability of protein structure.

Confidence Score: -0.18060873

Method 2: Neural Network, use sequence information only.

Effect: DECREASE the stability of protein structure.

Confidence Score:

Reference:

J. Cheng, A. Randall, and P. Baldi. Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines. *Proteins*, vol. 62, no. 4, pp. 1125-1132, 2006.

(Fig.9 Mupro output D345Y: provoca diminuita stabilità della struttura proteica)

D345Y

SIFT ANALYSIS OUTPUT

Warning: This report is based on knowledge and data that are not firmly established. Consequently, medical decisions must not be made on the basis of this report.

ACADM Variation

Unclassified variant

Transversion from G to T in exon 11.

Missense substitution.

Asp at position 345 is changed to Tyr.

According to the HGVS recommendations, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM_000016.4:c.1033G>T**

DNA Level (genomic): **Chr1(NCBI 36):g.75999482G>T**

Protein Level: **p.Asp345Tyr**

Pathogenicity clues

- Highly conserved nucleotide (score: 1.0 [0-1])
- Highly conserved amino acid, up to *C. elegans* (considering 11 species)
- Large physicochemical difference between Asp and Tyr (Grantham dist.: 160 [0-215])
- This variation is in protein domains:

- Acyl-CoA dehydrogenase, type 1
- Acyl-CoA dehydrogenase, type 2, C-terminal

Data Sources — Genome assembly: NCBI 36 (March 2006) - Ensembl version 59 (Aug 2010) - dbSNP version 131 (March 2010) - Nucleotide conservation: UCSC 17 vertebrates

©Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 1.54e on 29/10/2010

(Fig.10 ALAMUT/SIFT Output D345Y: amminoacido WT conservato nelle specie, grande differenza fisico-chimica tra Asp e Tyr, la variazione si trova nel sito attivo della proteina)

Confrontando il genotipo ed il valore biochimico iniziale del marcatore primario di questo paziente (attualmente è seguito dall'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù) si può supporre una forma MILD della malattia confermando così anche gli studi bioinformatici che indicano la mutazione come potenzialmente patogenetica.

- Il paziente B.Y. eterozigote fino alle analisi di secondo livello è risultato in verità eterozigote composto grazie all'esecuzione del test di terzo livello (Real Time PCR per identificazione delezione di esoni) per la mutazione p.D181G (c.542A>G) e della delezione dell'Esone1 del gene ACADM (Fig.7); la prima è una mutazione nota [41 M. L. Couce et al.: 2011], la seconda invece non era stata ancora descritta.

Per lo studio bioinformatico delle delezioni di esoni non ci sono, al momento, tools in grado di predirne l'effetto patogenetico.

Facendo, però, il confronto fra genomica e valori biochimici, il nostro paziente ricade nel range della popolazione con fenotipo lieve della malattia facendo supporre che la mutazione p.D181G sia la mutazione patogenetica e che la delezione dell'esone 1 abbia scarsi effetti sulla funzionalità della proteina.

- Il paziente M.A. è omozigote per la mutazione più frequente p.K329E, ha un valore iniziale del marcatore primario compatibile con la forma classica della malattia. Attualmente in follow-up presso il nostro centro non mostra segni o sintomi della malattia. I valori biochimici del marcatore primario sono notevolmente diminuiti anche se non completamente normalizzati, le urine e gli esami del sangue di routine sono nella norma.

- Nel paziente Z.A. sono presenti tre polimorfismi ed una mutazione nota. Il paziente sembra essere solo eterozigote per la malattia, infatti anche facendo riferimento al lavoro precedentemente citato di Meier, si affermare che il paziente sia affetto da una forma LIEVE della malattia.

Pazienti VLCAD:

Storia naturale:

Anche se i sintomi della malattia sono ben noti (miopatia e cardiomiopatia), i sintomi predominanti sono pochi: tra i 2 e 6 anni di età la presentazione epatica della malattia è la più frequente ed entro i 12 anni circa si può presentare la rabdiomiolisi (la forma giovanile della malattia è quella grave); generalmente dopo questa età i sintomi classici della malattia sono decisamente non comuni ma possono essere presenti in grado lieve e manifestarsi come sensazione di stanchezza.

Ci sono pochi lavori che mettono in luce un chiaro rapporto genotipo/fenotipo tra la forma grave e l'insorgenza sintomatologica nell'infanzia [3 Andresen BS, et al.: 1999].

La malattia, come precedentemente detto, se è in forma grave e si presenta nell'infanzia ha una mortalità dell'80%, la presentazione in età adulta è tutt'altro che rara anche se i sintomi sono lievi.

Non è evidente una correlazione genotipo/fenotipo neanche per quanto riguarda la gravità dei sintomi.

Spiekerkoetter ha riportato in un lavoro i dati clinici di 30 pazienti [54 Spiekerkoetter U, et al. (2009)]; di questi 20 provenivano dallo screening neonatale, di cui solo 3 hanno presentato i sintomi, gli altri sono rimasti asintomatici fino all'età adulta. Gli altri 10 pazienti identificati, non da screening, hanno manifestato cardiomiopatia in un range di età tra 2 mesi e 36 anni (media 2.5 mesi), cardiomiopatia ed in sei pazienti anche ipoglicemia; 2 di questi pazienti sono deceduti, rispettivamente uno nel terzo e l'altro nel secondo mese di vita.

Outcome screening neonatale:

Anche in questo caso l'outcome nei pazienti identificati con lo screening neonatale è differente rispetto alla storia naturale della malattia [58 Wilcken B.; 2009]:

- VLCAD nelle forme severe ad insorgenza precoce aveva una grande mortalità, circa l'80%, attualmente la morte è un evento estremamente raro.
- I pazienti hanno grande giovamento dal trattamento dietetico.
- Rimane una non chiara correlazione genotipo/fenotipo, specialmente per quanto riguarda le varianti non severe, quindi rimane utile trattare tutti i pazienti positivi

anche se non è certo che tutti necessitano di una dieta rigida. Ma data l'efficacia e la semplicità della terapia risulta conveniente mettere in terapia dietetica ogni paziente positivo.

In questo lavoro abbiamo identificato 2 pazienti su 78000 analizzati con una incidenza della malattia di 1:38000 invece che di >1:75000.

Anche i nostri pazienti sottoposti non presentano segni o sintomi della malattia ed entrambi hanno un profilo delle acilcarnitine nei limiti della norma con l'instaurarsi della terapia dietetica. Gli esami urinari e di routine sono nella norma.

Al momento non abbiamo riscontrato una chiara correlazione genotipo/fenotipo tra i dati clinici-biochimici e genetici.

- Nel paziente W.G. abbiamo identificato due mutazioni note: p.R326H e p.G294E le quali secondo l'articolo di Andersen et al. [3 Andresen BS, et al.; 1999] appartengono ad un gruppo di mutazioni missenso che consentono all'enzima VLCAD di mantenere una certa attività enzimatica che, seppur minima, consente ai pazienti portatori di questa malattia di non essere affetti dalla malattia grave ed ad esordio precoce e di non avere sintomi, se seguiti in regime di follow-up. Questa affermazione è stata confermata anche grazie al genotipo della sorellina di W.G: abbiamo eseguito i test genetici di conferma anche alla piccola paziente, più grande del fratellino e non sottoposta a screening neonatale, ed è risultata essere portatrice dello stesso genotipo e che non aveva ancora sviluppato nessun segno o sintomo della malattia.
- Il paziente D'.L. è risultato portatore della mutazione IVS6+1G>A già descritta in letteratura come mutazione grave [55 Strauss, et al.;1995].
Le altre variazioni di sequenza identificate in questo paziente (IVS9-27C>T; IVS12+25 G>A) non sono descritte in letteratura, abbiamo quindi eseguito studi di bioinformatica utilizzando il software ALAMUT che hanno confermato per la mutazione IVS6+1G>A un fenotipo grave causato da uno skipping dell'esone 6 nell'mRNA (Fig.11), per la mutazione IVS9-27C>T (Fig.12) e IVS12+25G>A (Fig.13) il software non dà indicazioni sulla predizione di malattia e non indica un possibile effetto sullo splicing dell' mRNA e quindi li abbiamo considerati come

possibili polimorfismi. Per quanto riguarda le variazioni nella regione 5'-UTR c.-29G>T e c.-33G>T rimane il dubbio se queste due mutazioni sono in grado di alterare la trascrizione dell'mRNA.

Warning: This report is based on knowledge and data that are not firmly established. Consequently, medical decisions must not be made on the basis of this report.

ACADVL Variation

Unclassified variant

Splice site substitution.
This substitution is located in the donor splice site of intron 6.
The consequence of this change is not predictable, but a skip of exon 6 is very likely.

According to the HGVS recommendations, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM_000018.2:c.477+1G>A**
DNA Level (genomic): **Chr17(NCBI 36):g.7065102G>A**
Protein Level: **p.?**

Data Sources — Genome assembly: NCBI 36 (March 2006) - Ensembl version 59 (Aug 2010) - dbSNP version 131 (March 2010) - Nucleotide conservation: UCSC 17 vertebrates

©Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 1.54e on 29/10/2010

(Fig.11 Output ALAMUT IVS6+1G>A: può provocare uno skip dell'esone 6)

Warning: This report is based on knowledge and data that are not firmly established. Consequently, medical decisions must not be made on the basis of this report.

ACADVL Variation

Unclassified variant

Substitution in intron 8.
The consequence of this change is not predictable.

According to the HGVS recommendations, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM_000018.2:c.753-27C>T**
DNA Level (genomic): **Chr17(NCBI 36):g.7066193C>T**
Protein Level: **p.?**

Data Sources — Genome assembly: NCBI 36 (March 2006) - Ensembl version 59 (Aug 2010) - dbSNP version 131 (March 2010) - Nucleotide conservation: UCSC 17 vertebrates

©Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 1.54e on 29/10/2010

(Fig.12 Output ALAMUT IVS9-27C>T: l'effetto della sostituzione non è prevedibile)

Warning: *This report is based on knowledge and data that are not firmly established. Consequently, medical decisions must not be made on the basis of this report.*

ACADVL Variation

Unclassified variant

Substitution in intron 12.
The consequence of this change is not predictable.

According to the HGVS recommendations, this variation must be labelled:

DNA Level (cDNA): **NM_000018.2:c.1269+25G>A**
DNA Level (genomic): **Chr17(NCBI 36):g.7067798G>A**
Protein Level: **p.?**

Data Sources — Genome assembly: NCBI 36 (March 2006) - Ensembl version 59 (Aug 2010) - dbSNP version 131 (March 2010) - Nucleotide conservation: UCSC 17 vertebrates

©Interactive Biosoftware - Created by Alamut version 1.54e on 29/10/2010

(Fig.13 Output ALAMUT IVS12 +25 G>A: l'effetto della sostituzione non è prevedibile)

Pazienti LCHAD TFP:

Storia naturale:

Anche la storia naturale dei pazienti affetti da questo deficit enzimatico era grave: il 78% dei pazienti aveva sintomi acuti della malattia (epatopatia (malattia Reyes), ipoglicemia ipochetotica, rabdomiolisi, miopatia, cardiomiopatia) ed il 38% di questi andava incontro a morte [16 den Boer ME, et al.; 2002] nei primi 3 mesi dopo la diagnosi.

Outcome screening neonatale:

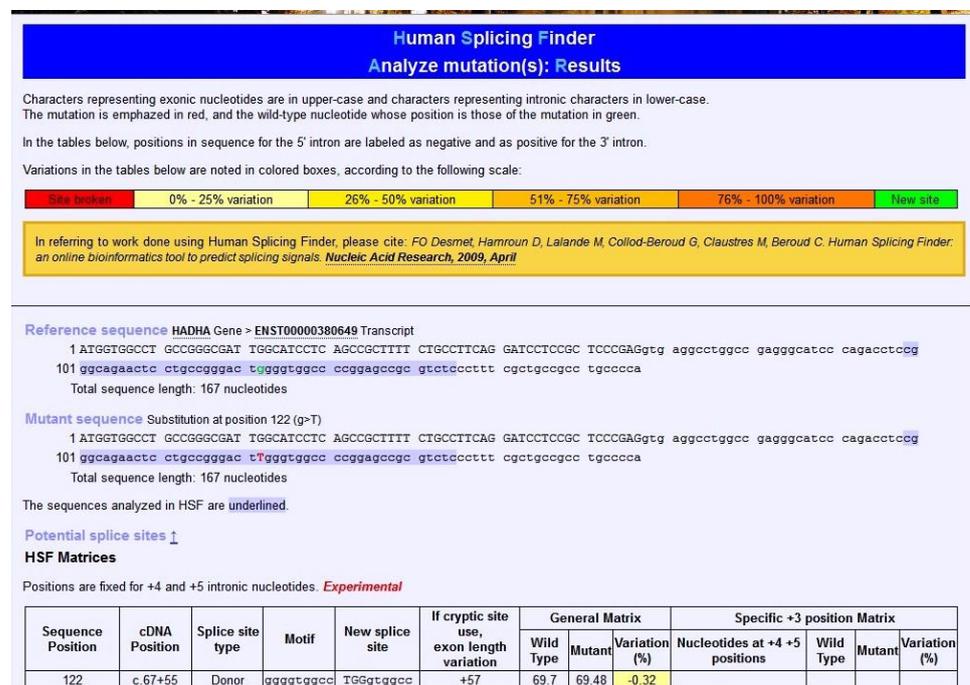
Nei pazienti provenienti da screening neonatale, l'outcome della malattia è decisamente diverso [60 Wilcken B.; 2010]:

- La malattia grazie alla terapia precoce ed al follow-up è ben gestita. Rimane però la possibilità del manifestarsi dei sintomi nella maggior parte dei pazienti; infatti permane il rischio della comparsa di una ipoglicemia ipochetonica e l'instaurarsi di rabdiomiolisi nonostante una buona compliance nel seguire la dieta a basso contenuto di acidi grassi a catena lunga e nell'evitare situazioni di catabolismo.

E' però importante sottolineare che, rispetto alla storia naturale, tutti i pazienti godono di un buono stato di salute durante la maggior parte della loro vita e che nessun paziente è deceduto durante il follow-up.

Per quanto riguarda questo lavoro, sono riportati tre pazienti (due ci sono stati inviati da strutture esterne per la conferma molecolare ed uno è stato identificato tramite screening neonatale). Uno è risultato essere portatore di mutazioni nel gene per la sub-unità beta della proteina trifunzionale, gli altri due per la sub-unità alfa.

- Il paziente F.M. è portatore della mutazione più frequente per questo gene p.E510Q che provoca una diminuzione dell'attività enzimatica [28 IJlst L, et al.; 1994] [53 Sims HF, et al.; 1995] e della mutazione p.R291X, mutazione non nota.
- Il paziente La.S. è portatore della mutazione p.E510Q e di una variazione nella sequenza intronica IVS1+55G>T, non nota; la variante valutata usando il tool (Human Splicing Finder) [17 Desmet FO, et al.; 2009] non crea variazioni di splicing dell'mRNA (Fig.14).



(Fig.14: Output Human Splicing Finder IVS1 +55 G>T: non altera i siti di splicing)

- Invece il paziente M.U. è omozigote per la mutazione, non nota, P294R del gene che codifica la sub-unità beta della proteina trifunzionale; gli studi

vita, si possono presentare anche l'ipoglicemia ipochetonica e coma. La terapia con carnitina porta ad una regressione sintomatologica della malattia con completa remissione della cardiomiopatia, se presente. In terapia cronica è pressoché nulla la manifestazione dei sintomi. [59 Wilcken B.;2008]. È da notare, comunque, che lo screening neonatale ha portato all'identificazione di molti adulti affetti da questo deficit, con valori delle acilcarnitine alterate (CO <12.9), ma completamente asintomatici.

Out come durante lo screening neonatale:

- Nessun segno o sintomo della malattia si verifica in pazienti provenienti da screening neonatale e seguiti in regime di follow-up.
- Non è chiaro se tutti i pazienti identificati con lo screening neonatale necessitano effettivamente di terapia; ma d'altro canto la terapia stessa si basa solo sul supplemento dietetico di carnitina per via orale, la quale da sola riesce a far regredire eventuali sintomi presenti ed al contempo prevenirli; quindi anche in questo caso, come per i soggetti con deficit di VLCAD, risulta utile dare il supplemento dietetico a tutti i pazienti positivi.

In questo lavoro su 78000, circa, spot di sangue, provenienti dallo screening neonatale, solo uno è risultato essere affetto da deficit del trasportatore, rispettando la frequenza riportata per la malattia (<1:100000).

Il nostro paziente è eterozigote composto, portatore di una mutazione nota: c.-149G>A che è riportata mantenere il 33% di attività enzimatica residua, nei fibroblasti dei pazienti positivi messi in coltura

[http://www.arup.utah.edu/database/OCTN2/OCTN2_display.php]; e di una mutazione non descritta precedentemente: c.148 del T (p.C50PfsX9).

Il nostro paziente è stato messo immediatamente in terapia con carnitene e, al momento, non ha sviluppato nessun sintomo della malattia. La terapia ha ripristinato immediatamente i livelli di CO anche se periodicamente sono tornati a valori di poco inferiori al cut-off. Non si sa se per una cattiva compliance della famiglia a far seguire al piccolo paziente l'integrazione alimentare di carnitina o se sono oscillazioni fisiologiche di cui ancora non ne conosciamo la causa.

Pazienti CPT1A:

Storia naturale:

Il deficit di Carnitine palmitoyl transferase type IA (la forma epatica dell'enzima) è un deficit estremamente raro, sono stati descritti 30 casi prima dello screening neonatale. Si manifesta con sintomi simili a quelle del deficit di ACADM: nei primi 2 anni di vita si presenta ipoglicemia ipoketonica fino al coma, se si instaura una situazione di forte stress metabolico. Fino ad ora sono state trovate due popolazioni dove questa malattia è frequente: la comunità degli Hutteriti ed i nativi dell'Alaska; tutti portatori di una stessa mutazione (c.1436C-T, P479L) [22 Gillingham and Koeller 2008- <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00653666>]. La maggior parte degli individui portatori di queste mutazioni in queste due popolazioni sono asintomatici.

Out come durante lo screening neonatale:

Grazie allo screening neonatale è in progressivo aumento il numero di pazienti affetti da questa patologia, ma non sono ancora presenti studi di follow-up ed inoltre si sa ancora poco se la terapia attuale (dietetica con supplemento di MCT) è effettivamente utile.

Il paziente identificato in questo lavoro è risultato essere portatore in eterozigosi per le mutazioni: p.R339X (c.1015 C >T) e p.G465R (c.1393G>A) entrambe mutazioni non descritte.

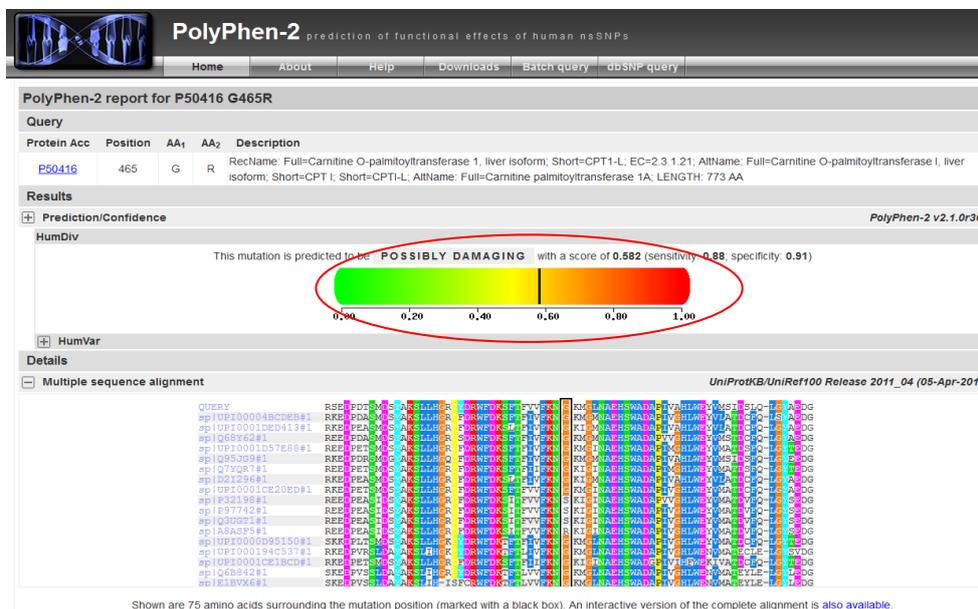
Per quanto riguarda la mutazione G465R, utilizzando il tool SIFT, il risultato è di un danno completo della funzionalità della proteina (Fig.16); il risultato è confermato utilizzando anche i tools Polyphen2 (Fig.17) e MuPro G465R (Fig.18).

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENST00000265641,R339X	ENSP00000265641	339	R	X	TOLERATED	0.00000265641	2.17	211
ENST00000265641,G465R	ENSP00000265641	465	G	R	DAMAGING	0	2.18	213

? - Indicates either ENSP or amino acid position not found.

*DAMAGING - Low confidence predictions with Median conservation above 3.25

(Fig.16: Output SIFT G465R: potenzialmente patogenetica)



(Fig.17 Output Polyphen2 G465R: potenzialmente patogenetica con score 0.6)

Structure stability prediction for mutation:

Mutation Request:

Name: G465R

Sequence:

```

MAEAHQAVAFQFTVTPDGDIDLRLSHEALRQIYLSGLHSWKKKFIKFKNGIITGVYPASP
SWLIVVGVMTTMYAKIDPSLGIIAKINRITLETANCMSSQTKNNVSGVLFGTGLWVALIV
IMRYSLSKVLVSYHGWMFTEHGKMSRATKIWMGMVKIIFSGRKKMPLYSFQTLSPRLPVPVAVK
DTVNRYLQSVRFELMKEEDFKRMTALAQDFAVGLGPRRLQWYLKIKSWATNYVSDWWEYEI
YLRGRGFLMVNSNYAMDLLYLPLTHIQARRAGNAIHAILLYARKILDREI KPTRLIGST
IPLCSAQWERMENSTRIPGEETDTIQHMRDSKHIVVYHGRGVFKVWLYHDGRLLKPREME
QQMQRILDNTSEPPQGEARLAALTAGDRVPWARCRQAYVFRGKFNKQSLDAVEKAAFFVTL
DETEEGYRSEDPTDSMDSYAKSLLHGRCYDRWFDKSFTFVVFKNGKMGMLNAEHSWADAPI
VAHLWEYVMSIDSLQLGYAEDGHCCKGDNFNPIPYPTRLQWDIEPGECQEVETISLNTANLL
ANDVDHSHSFFVAFGKGIKIKGRSFDPAFVQLALQLAHYKDMGKFCFLTYEASMTLRFREG
RLETVRSCTTESCDFVRAMVDFPAQTVVEQRLKLFKLASEKHQHMRYRLAMTSSGIDRHLEFCL
YVYSKYLAVESPFLEKVELSEFWRLSTSTPQQQVELFDLENNFEYVSSGGGFGVADDGY
GVSYILVGENLINFHISSEKFCPETDSHRFGRHLKEAMTDIITLFLGLSSNSKK
    
```

Position: 465

Original Amino Acid: G

Substitute Amino Acid: R

Prediction Results:

1. Predicted both value and sign of energy change using SVM and sequence information only (Recommended)

detai delta G = (INCREASE stability)

2. Prediction of the sign (direction) of energy change using SVM and neural network with a smaller sequence window

Method 1: Support Vector Machine, use sequence information only.

Effect: DECREASE the stability of protein structure.

Confidence Score: -0.016128301

Method 2: Neural Network, use sequence information only.

Effect: DECREASE the stability of protein structure.

Confidence Score:

Reference:

J. Cheng, A. Randall, and P. Baldi. Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines. *Proteins*, vol. 62, no. 4, pp. 1125-1132, 2006.

(FIG.18 Output MuPRO G465R: provoca diminuita stabilità della struttura proteica)

Pazienti SCAD:

Storia naturale:

I segni e sintomi, nella storia naturale, di questo deficit sono estremamente vari (disturbi del tono muscolare, ipoglicemia o vomito, ipotonia, ritardo psicomotorio) e la fisiopatologia di questa malattia non è ancora ben definita [31 Jethva R, et al.; 2008].

Out come durante lo screening neonatale:

- Attualmente con l'esperienza che si sta facendo grazie allo screening neonatale si sta notando che una parte dei pazienti affetti da deficit di SCAD rimangono asintomatici per tutta la vita senza la necessità di interventi terapeutici o dietetici, facendo presupporre ad una parte degli esperti che il difetto enzimatico è il risultato di una suscettibilità genetica di alcuni genotipi. [6 Bennett MJ.; 2010].

In questo progetto di dottorato abbiamo identificato due pazienti affetti da SCAD.

Entrambi i pazienti sono portatori per la variazione missenso p.G209S in omozigosi, comune nella popolazione generale osservata con maggior frequenza nei soggetti sintomatici e positivi allo screening ed è attualmente considerata, come precedentemente accennato, una variazione predisponente la malattia, in un'ottica di una patogenesi multifattoriale [57 van Maldegem BT, et al.; 2010].

- Il paziente F.M. è portatore anche di tre polimorfismi sinonimi (rs3915, rs3914, rs3916).
- Il paziente L.A è portatore della mutazione R46W(c.138C>T) in omozigosi e di due polimorfismi (rs3915, rs3914). Presenta valori alterati del marcatore primario senza sostanziali differenze nel corso del follow-up. All'esame delle urine presenta un persistente secrezione urinaria di acido etilmalonico e di acido metilsuccinico; Questo è interessante dal punto di vista diagnostico perché se confermato anche in altri soggetti affetti da malattia può essere indice di un fenotipo più grave e di una

possibilità, dal punto di vista laboratoristico, di differenziare un fenotipo lieve da un fenotipo più grave attraverso le analisi delle urine.

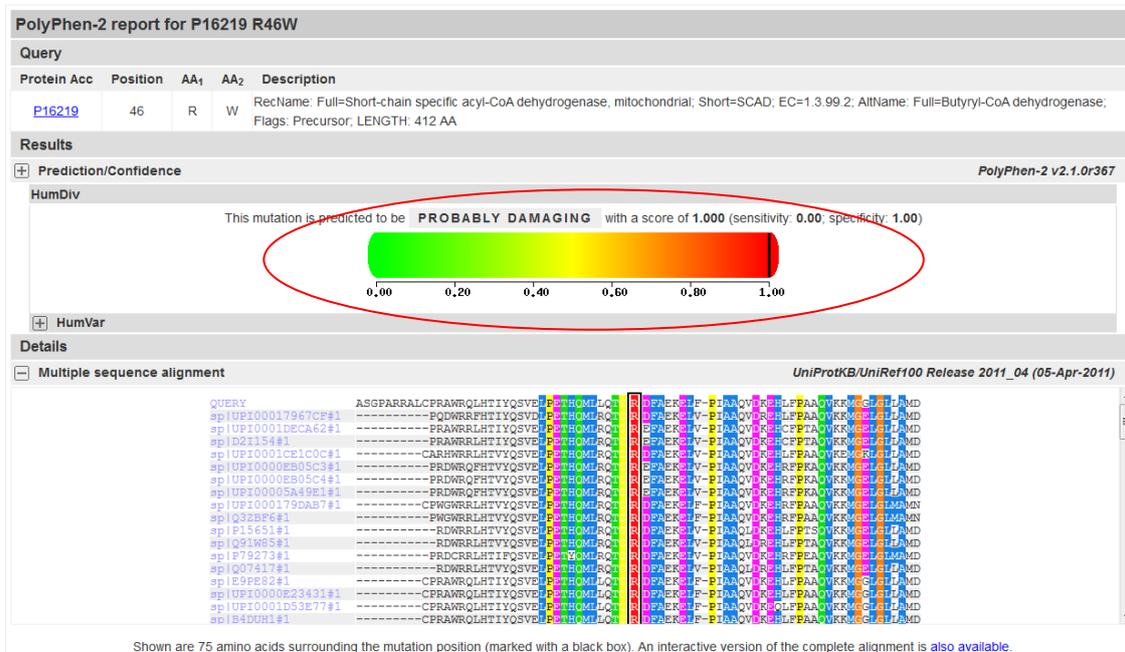
La mutazione p.R46W c.138 C>T presente in eterozigosi nel nostro paziente, è una mutazione già descritta in letteratura [46 Naito, et al.;1989], ma la abbiamo ugualmente valutata attraverso studi di bioinformatica: SIFT (Fig.19), polyphen2 (Fig.20), MuPro (Fig.21) confermando il cambio amminoacidico come possibile danno alla proteina e quindi un possibile effetto patogenetico della mutazione.

User Input	ENSP	Pos Ref Subst Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENST00000242592,R46W	ENSP00000242592	46 R W DAMAGING	0	2.89	352

? - Indicates either ENSP or amino acid position not found.

*DAMAGING - Low confidence predictions with Median conservation above 3.25

(Fig.19 Output SIFT R46W: potenzialmente patogenetica)



(Fig.20 Output polyphen2 R46W: potenzialmente patogenetica con score 1)

Structure stability prediction for mutation:

Mutation Request:

Name: R46W

Sequence:

```
MAAALLARASGFARRALCPRAWRLHTIYQSVLPETHQMLLQTCRDFAEKELFPIAAQV  
DKEHLFPAQVKKMGGLLLAMDVPEELGGAGLDYLAYAIAMEEISRGCASTGVIMSVNN  
SLYLGPIILKFGSKEQKQAWVTFPTSGDKIGCFALSEPONGSDAGAASTTARAEGDSWLN  
GKAWITNAWEASAARVFASTDRALQNKGISAFVLPMPPTGLTLGKKEKLGIRGSSSTAN  
LIFEDCRIPKDSILGEPGMGFKIAMQTLDMGRIGIASQALGIAQTALDCAVNYAENRMAF  
GAPLTKLQVIQFKLADMALALE SARLLTWRAAMLKDNKKPFKEAAMAKLAASEAATAIS  
HQAIQILGGMGVVTMPAERHYRDARITEIYEGTSEIQRLVIAGHLRSYRS
```

Position: 46

Original Amino Acid: R

Substitute Amino Acid: W

Prediction Results:

1. Predicted both value and sign of energy change using SVM and sequence information only (Recommended)

deta delta G = (INCREASE stability)

2. Prediction of the sign (direction) of energy change using SVM and neural network with a smaller sequence window

Method 1: Support Vector Machine, use sequence information only.

Effect: DECREASE the stability of protein structure.

Confidence Score: -0.84468621

Method 2: Neural Network, use sequence information only.

Effect: DECREASE the stability of protein structure.

Confidence Score:

Reference:

J. Cheng, A. Randall, and P. Baldi. Prediction of Protein Stability Changes for Single-Site Mutations Using Support Vector Machines. *Proteins*, vol. 62, no. 4, pp. 1125-1132, 2006.

(Fig.21 Output MuPRO R46W: provoca diminuita stabilità della struttura proteica)

6 Conclusione

Per concludere, in questo progetto di dottorato si è potuto mettere a punto e proporre delle flow-chart diagnostiche per le malattie della β -ossidazione nell'ambito dello screening neonatale, utilizzando test di prima istanza (biochimici) e di conferma (biochimici e molecolari) che hanno portato all'identificazione di nuovi casi; abbiamo avuto, quindi, la possibilità di acquisire dati ed esperienza in queste malattie che ci hanno permesso di averne una visione più ampia e multidisciplinare.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei tools bioinformatici, per lo studio delle nuove mutazioni, sembra che siano di qualche utilità nel predirne l'effettiva patogenicità. Generalmente facendo studi incrociati tra i vari tools i risultati sembrano concordare tra loro ed utilizzandoli con mutazioni precedentemente ben studiate, controlli positivi, confermano i dati sperimentali.

Inoltre, grazie ai test di conferma, è stato possibile per alcuni casi chiarire una correlazione genotipo/fenotipo così da determinare la distinzione tra varianti mild, lievi o gravi come nel Deficit Acil-CoA deidrogenasi a catena media. Oppure di creare le basi per una possibile distinzione tra predisposizione alla malattia e malattia, attraverso l'analisi dell'acido metilsuccinico nei pazienti con Deficit Acil-CoA deidrogenasi a catena corta.

Per le altre malattie purtroppo, allo stato attuale delle conoscenze, non è possibile fare una chiara correlazione genotipo/fenotipo.

Comunque, sia che si tratti di varianti gravi sia che si tratti di varianti lievi delle malattie, lo screening neonatale insieme al follow-up ed a una terapia precoce è utile al miglioramento delle condizioni dei pazienti affetti da queste patologie.

Di particolare importanza si rivelano il follow up ed i test di conferma molecolari.

Il follow-up perché dal un punto di vista clinico mantiene il livello di salute raggiunto grazie allo screening ed evita il manifestarsi dei sintomi delle malattie; dal punto di vista scientifico offre il feedback necessario per il "miglioramento continuo" delle indagini biochimiche, molecolari e della terapia.

I test di conferma molecolari perché permettono al clinico di porre la diagnosi definitiva di malattia, altrimenti impossibile dal momento che i pazienti provenienti da screening neonatale sono asintomatici. Inoltre permettono il counseling e di poter effettuare la diagnosi prenatale per le famiglie a rischio.

7 BIBLIOGRAFIA

1. American Academy of Pediatrics Newborn Screening Task Force. Serving the family from birth to medical home. Newborn screening a blue print for the future. A call for a national agenda on state newborn screening programs. *Pediatrics* **2000**;106(Suppl 2):389-422.
2. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System—Executive Summary. *PEDIATRICS* **2006**;117:S296–S307.
3. Andresen BS, Olpin S, Poorthuis BJ, Scholte HR, Vianey-Saban C, Wanders R, Ijlst L, Morris A, Pourfarzam M, Bartlett K, Baumgartner ER, deKlerk JB, Schroeder LD, Corydon TJ, Lund H, Winter V, Bross P, Bolund L, Gregersen N. Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am J Hum Genet.* **1999** Feb;64(2):479-94.
4. Angelini C, Trevisan C, Isaya G, Pegolo G, Vergani L. “Clinical varieties of carnitine and carnitine palmitoyltransferase deficiency”, *Clin Biochem.* **1987** Feb; **20**(1): 1-7.
5. Bartlett K, Eaton S. “Mitochondrial beta-oxidation”, *Eur J Biochem.* **2004** Feb;271(3):462-9.
6. Bennett MJ. Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis.* **2010** Oct;33(5):533-7. Epub **2009** Oct 10. Review.
7. Bonnet D, Martin D, deLonlay P, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M, Saudubray JM. “Arrhythmias and Conduction Defects as Presenting Symptoms of Fatty Acid Oxidation Disorders in Children”, *Circulation* **1999**; **100**(22): 2248-2253.
8. Brackett JC, Sims HF, Steiner RD, Nunge M, Zimmerman EM, deMartinville B, Rinaldo P, Slauch R, Strauss AW. “A Novel Mutation in Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Causes sudden Neonatal Death”, *J Clin Invest* **1994**; **94**: 1477-83.
9. C. Vianey-Saban. <http://www.orpha.net>, Marzo **2004**.
10. Cali F, Ruggeri G, Vinci M, Meli C, Carducci C, Leuzzi V, Pozzessere S, Schinocca P, Ragalmuto A, Chiavetta V, Micciche S, Romano V. “Exon deletions of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian hyperphenylalaninemics.” *Exp Mol Med.* **2010** Feb 28;42(2):81-6.

11. Carroll AE, Downs SM. Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* **2006**;117:S287-95.
12. Cerone R, Caruso U. SISN - Rapporto tecnico sui programmi di screening neonatale in Italia anno **2007**. [<http://www.sismme.it/sisn/documents/rapporto2008.pdf>].
13. Cerone R, Cassanello M, Caruso U, et al. Screening neonatale esteso per gli errori congeniti del metabolismo mediante tandem mass: l'esperienza italiana. *Minerva Pediat* **2007**;59:488-9.
14. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* **2003**;49:1797-817.
15. Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem* **2005**;38:296-309.
16. den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, IJlst L, Heymans HS, Wijburg FA. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics*. **2002** Jan;109(1):99-104.
17. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. **2009** May;37(9):e67.
18. Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, et al. Inborn errors of metabolism in the Italian paediatric population: a national retrospective survey. *J Pediatr* **2002**;140:321-7.
19. Dzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* **2010**;7(4):248-249.
20. EuroGentest, NGRL Manchester. Decision support for molecular diagnostic laboratories using Interactive Biosoftware Alamut v1.2. **2008**
21. Feuchtbaum L, Cunningham G. Economic evaluation of tandem mass spectrometry screening in California. *Pediatrics* **2006**;117:S280-6.
22. Gillingham and Koeller **2008**- <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00653666>
23. Gillingham MB, Connor WE, Matern D, Rinaldo P, Burlingame T, Meeuws K, Harding CO. "Optimal dietary therapy of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency", *Mol Genet Metab*. **2003** Jun;79(2):114-23.

24. Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon TJ, Bross P.: Mitochondrial fatty acid oxidation defects-- remain challenges. *J Inherit Metab Dis.* **2008** Oct;**31**(5):643-57
25. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large population of newborn infants. *Pediatrics* **1963**;**32**:338-43.
26. Hyams, J. S.; Jackson, S.; Turnbull, D. M. Acute fatty liver of pregnancy and long-chain hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Hepatology* **1994**; **19**: 339-345.
27. Iafolla AK, Thompson RJ Jr, Roe CR. Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical course in 120 affected children. *J Pediatr.***1994** Mar;**124**(3):409-15.
28. IJlst L, Wanders RJ, Ushikubo S, Kamijo T, Hashimoto T. Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the alpha-subunit of the mitochondrial trifunctional protein. *Biochim Biophys Acta.* **1994** Dec 8;**1215**(3):347-50.
29. Indiveri C, Tonazzi A, Palmieri F: Identification and purification of the carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* **1990**;**1020**:81.
30. Indiveri C, Tonazzi A, Prezioso G, Palmieri F: Kinetic characterization of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* **1991**;**1065**:231.
31. Jethva R, Bennett MJ, Vockley J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* **2008** Dec;**95**(4):195-200. Epub 2008 Nov 5.
32. Kerner J, Hoppel C. "Genetic Disorders of Carnitine Metabolism and Their Nutritional Management", *Ann Rev Nutr* 1998; **18**: 179-206.
33. Koeberl DD, "Diagnosis and management of new inborn errors of metabolism identified through tandem mass spectroscopy", SIMD National Conference, March 3, **2004**.
34. Lamhonwah AM, Olpin SE, Pollitt RJ, Vianey-Saban C, Divry P, Guffon N, Besley GT, Onizuka R, De Meirleir LJ, Cvitanovic-Sojat L, Baric I, Dionisi-Vici C, Fumic K, Maradin M, Tein I. "Novel OCTN2 mutations: no genotype-phenotype correlations: early carnitine therapy prevents cardiomyopathy", *Am J Med Genet* **2002** Aug **15**;111(3):271-84.
35. Ledley FD, Levy HL, Shih VE, Benjamin R, Mahoney MJ. Benign methylmalonic aciduria. *N Engl J Med.***1984**;**311** :1015 –1018.

36. Levitan MD, Murphy JT, Sherwood WG, Deck J, Sawa GM. "Adult onset systemic carnitine deficiency: favorable response to L-carnitine supplementation", *Can J Neurol Sci* **1987** Feb;**14**(1):50-4.
37. Levy HL, Shih VE, Madigan PM. Routine newborn screening for histidinemia: clinical and biochemical results. *N Engl J Med.* **1974**;**291** :1214 –1219.
38. Loeber JG. Neonatal screening in Europe: the situation in 2004. *J Inher Metab Dis* **2007**;**30**:430-8.
39. M. Bennett and C. Stanley. <http://www.orpha.net>, April **2010**.
40. M. Bennett and C. Stanley. <http://www.orpha.net>, March **2011**.
41. M. L. Couce et al.: *J Inher Metab Dis.REPORTS*: 2011, Vol.1 pp131-136.
42. Maier EM, Liebl B, Röschinger W, Nennstiel-Ratzel U, Fingerhut R, Olgemöller B, Busch U, Krone N, v Kries R, Roscher AA. Population spectrum of ACADM genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Mutat.* **2005** May;**25**(5):443-52.
43. Matsubara, Y.; Kraus, J. P.; Yang-Feng, T. L.; Francke, U.; Rosenberg, L. E.; Tanaka, K. Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1986**; **83**: 6543-6547.
44. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* **1990**;**13**:321-4.
45. Morris AAM, Lenoard JV. "Improving the Outcome for Fatty Acid Oxidation Disorders", *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2000**; **31**(4): 367-370.
46. Naito, E., Indo, Y., Tanaka, K. Short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: demonstration of molecular heterogeneity and identification of point mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**; **45** (suppl.): A208.
47. Pandor A, Eastham J, Beverley C, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of neonatal screening for inborn errors of metabolism using tandem mass spectrometry: a systematic review. *Health Technol Assess* **2004**;**8**:1-121.
48. Pollitt RJ, Leonard JV. Prospective surveillance study of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the UK. *Arch Dis Child.* **1998** Aug;**79**(2):116-9.

49. Pollitt RJ. Introducing new screens: Why are we all doing different things. *J Inherit Metab Dis* **2007**;30:423-9.
50. Pourfarzam M, Morris A, Appleton M, Craft A, Bartlett K. Neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Lancet*. **2001** Sep 29;358(9287):1063-4.
51. Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D. Recent developments and new applications of tandem mass spectrometry in newborn screening. *Cur Opin Pediatrics* **2004**;16:427-33.
52. Roe DS, Yang BZ, Vianey-Saban C, Struys E, Sweetman L, Roe CR. Differentiation of long-chain fatty acid oxidation disorders using alternative precursors and acylcarnitine profiling in fibroblasts. *Mol Genet Metab*. **2006** Jan;87(1):40-7.
53. Sims HF, Brackett JC, Powell CK, Treem WR, Hale DE, Bennett MJ, Gibson B, Shapiro S, Strauss AW. The molecular basis of pediatric long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with maternal acute fatty liver of pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1995** Jan 31;92(3):841-5.
54. Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennermann JB, Karall D, de Klerk H, Knerr I, Koch HG, Plecko B, Röschinger W, Schwab KO, Scheible D, Wijburg FA, Zschocke J, Mayatepek E, Wendel U. Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. *J Inherit Metab Dis*. **2009** Aug;32(4):488-97. Epub 2009 Apr 29.
55. Strauss AW, Powell CK, Hale DE, Anderson MM, Ahuja A, Brackett JC, Sims HF. Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995** Nov 7;92(23):10496-500.
56. Treem, W. R.; Rinaldo, P.; Hale, D. E.; Stanley, C. A.; Millington, D. S.; Van Maldegem BT, Duran M, Wanders RJ, et al. Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in shortchain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *JAMA* **2006**; **296**: 943–952.
57. van Maldegem BT, Wanders RJ, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. **2010** Oct;33(5):507-11. Epub 2010 Apr 29. Review.

58. Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Bowling F, Carpenter K, Christodoulou J, Cowley D, Ellaway C, Fletcher J, Kirk EP, Lewis B, McGill J, Peters H, Pitt J, Ranieri E, Yapfite-Lee J, Boneh A. Expanded newborn screening: outcome in screened and unscreened patients at age 6 years. *Pediatrics*. **2009** Aug;**124**(2):e241-8.
59. Wilcken B. Disorders of the carnitine cycle and detection by newborn screening. *Ann Acad Med Singapore*. **2008** Dec;**37**(12 Suppl):71-3.
60. Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis*. **2010** Oct;**33**(5):501-6
61. Wilcken, B.; Leung, K.-C.; Hammond, J.; Kamath, R.; Leonard, J. V., Pregnancy and fetal long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Lancet* **1993**; **341**: 407-408.
62. Wilson JM, Junger G. Principles and practice of screening for diseases. *Bol Oficina Sanit Panam* **1968**;**65**:281-393.
63. Zschockej., Hoffman GF: Vademecum Metabolicum. 2005

7.2 Tools Bioinformatici

- Alamut (<http://www.interactive-biosoftware.com/alamut.html>)

E' un decision-support software, sviluppato dalla Interactive Biosoftware, programmato per interpretare le mutazioni identificate (es. nomenclatura, effetti di mutazioni in siti di splicing, predizione di affetti di sostituzioni amminoacidi che) in modo veloce ed esaustivo integrando le informazioni dei più importanti database ([RefSeq](#), [dbSNP](#), [Uniprot](#), [InterPro](#), the [UCSC Genome Browser Database](#), and [PubMed](#), [Ensembl](#)) il tutto eseguito in maniera automatica.

- ConSeq (<http://conseq.tau.ac.il/>)

Valuta, a partire da una sequenza polipeptidica in formato FASTA, la funzione dei tutti gli amminoacidi di una data proteina e ne prevede l'esposizione al solvente, dopo aver effettuato un MSA.

- GeneAtlas(<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>)

E' una piattaforma informatica dell'Università René Descartes di Parigi creata nel 1978. Contiene informazioni genetiche e fenotipiche (22381 geni e 4233) . Dando la possibilità di ricercare i geni coinvolti in determinati disordini o i disordini correlati a determinati geni. Le sequenze esoniche sono state lette tenendo come riferimento la sequenza nucleotidica di GeneAtlas.

- GeneCards (<http://www.genecards.org/>)

E' un database integrato che contiene informazioni genomiche, proteomiche e trascrittomiche; ortologie; relazioni tra malattie; SNPs; espressione genica; funzione genica.

- HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)

E' un database che raccoglie dati sulle mutazioni riportate come causa di alterazioni di geni nucleari in malattie ereditarie. Sono contenute solo mutazioni riscontrate sul DNA e non sulla proteina.

- HSF (<http://www.umd.be/HSF/>)

Human Splicing Finder è un tool per valutare i siti di splicing.

- MUpro (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/mutation.html>)

Valuta, mediante pattern allenati con macchine a vettori di supporto (SVM o macchine kernel) e reti neurali, il cambiamento di energia libera associato alla mutazione di un dato amminoacido in una proteina.

- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

- *PubMed*: è un database offerto dall' U.S.National Library of Medicine che contiene articoli di divulgazione scientifica a partire dal 1950.
- *OMIM*: (Online Mendelian Inheritance in Man) è un database che contiene informazioni correlate ai disordini mendeliani conosciuti e più di 12000 geni. Focalizzando l'attenzione sulle relazioni esistenti tra genotipo e fenotipo.
- *GeneBank (Nucleotide)*: è un database delle sequenze nucleotidiche geniche.
- *Genome*: è un database che contiene sequenze genomiche, cromosomi interi, mappe fisiche, mappe geniche di contigs, mappe fisiche e geniche integrate.
- *SNP*: è un database che contiene tutti gli SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) noti.
- *Gene*: è un database che contiene informazioni di sequenza centrati sui singoli geni.

- Orphanet (<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=IT>)

Portale, finanziato dal consiglio europeo per le malattie rare, di informazioni al pubblico sulle malattie rare e farmaci orfani con accesso libero utilizzato per la stima della prevalenza.

- Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>)

[20 dzhubei IA, et al.;2010].

- SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)

Prevede se la sostituzione di un amminoacido influisce sulla funzione delle proteine basandosi sull'omologia di sequenza e sulle proprietà fisiche degli amminoacidi.

- SNPs check (<http://ngsl.man.ac.uk/>)

Tool utilizzato per verificare la complementarità con SNPs delle sequenze dei primers e delle sonde.

